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

На правах рукописи

Бобылёв Александр Геннадьевич

АМИЛОИДНАЯ АГРЕГАЦИЯ МЫШЕЧНЫХ БЕЛКОВ СУПЕРСЕМЕЙСТВА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

1.5.2. – Биофизика

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук

Научный консультант: д.б.н. Вихлянцев Иван Милентьевич

г. Пущино

2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ 8
ВВЕДЕНИЕ 11
Актуальность темы исследования 11
Цель и задачи диссертационной работы 13
Методология и методы диссертационного исследования 14
Научная новизна 15
Положения, выносимые на защиту 16
Степень достоверности результатов 17
Апробация результатов работы 18
Личный вклад автора 18
Степень разработанности проблемы 20
Теоретическая значимость работы 21
Практическая значимость работы 21
Публикации 21
Структура и объем работы 22
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 23
1.1. АГРЕГАЦИЯ БЕЛКОВ 23
1.1.1. Процесс агрегации белков 23
1.1.2. Механизмы агрегации 25
1.1.3. Факторы, влияющие на агрегацию 27
1.1.3.1. Особенности структуры белка 27
1.1.3.2. Гликирование и гликозилирование 29
1.1.3.3. Дезаминирование 30
1.1.3.4. Химическое воздействие 30
1.1.3.5. Температура 30
1.1.3.6. Условия раствора 31
1.1.3.7. Различные соединения 33
1.1.3.8. Перемешивание 33
1.1.3.9. Воздействие света 34

1.1.3.10. Высушивание и концентрирование 35
1.1.3.11. Воздействие ультразвуком 35
1.1.4. Стадии агрегации белка 35
1.1.4.1. Олигомеризация / зародышеобразование 37
1.1.4.2. Экспоненциальный рост и фаза насыщения 39
1.1.5. Энергетический ландшафт сворачивания и агрегации белков 41
1.1.6. Амилоидная агрегация, особенности 44
1.1.7. Полиморфизм амилоидных агрегатов 47
1.1.8. Методы изучения амилоидной агрегации белков 49
1.2. РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ АМИЛОИДНЫХ БЕЛКОВ 58
1.2.1. Амилоидные фибриллы при различных заболеваниях 58
1.2.2. Классификация амилоидозов 59
1.2.3. Функциональные амилоиды 64
1.3. МУЛЬТИДОМЕННЫЕ МЫШЕЧНЫЕ БЕЛКИ СУПЕРСЕМЕЙСТВА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ 78
1.3.1. Обоснование выбора объекта исследования 78
1.3.2. Титин: структура и функции 80
1.3.2.1. Роль титина в мышечных клетках 80
1.3.2.2. Структура титина и его функции 82
1.3.2.3. Гладкомышечные изоформы титина 85
1.3.3. Миозин-связывающий белок С 86
1.3.4. Изучение агрегации титина и С-белка 89
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 92
2.1. Экспериментальный материал 92
2.2. Выделение и очистка мышечных белков 92
2.2.1. Выделение титина из желудков курицы 92
2.2.2. Выделение С-белка из скелетных мышц кролика 93
2.2.3. Выделение актина из скелетных мышц кролика 95
2.3. ДСН гель-электрофорез титина и С-белка 96
2.4. Масс-спектрометрия образцов титина и С-белка 97
2.5. Вестерн-блот анализ очищенных образцов титина и С-белка 98

2.6. Лиофилизация титина, С-белка и их агрегатов 98
2.7. Условия формирования агрегатов титина и С-белка 99
2.8. Динамическое рассеяние света 100
2.9. Просвечивающая электронная микроскопия 101
2.10. Атомно-силовая микроскопия 102
2.11. Флуоресцентный анализ с красителем тиофлавином Т 103
2.12. Круговой дихроизм 103
2.13. Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье 104
2.14. Синхротронное малоугловое рентгеновское рассеяние 105
2.15. Рентгеновская дифракция 106
2.16. Дифференциальная сканирующая калориметрия 106
2.17. Исследование цитотоксичности 107
2.18. Конфокальная микроскопия 107
2.19. Световая микроскопия 108
2.20. Исследование влияния амилоидных агрегатов титина на адгезию фибробластов 108
2.21. Расчет идентичности аминокислотной последовательности и неструктурированных участков титина и С-белка 109
2.22. Статистическая обработка данных 110
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ 111
3.1. ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИИ И ДИНАМИКИ АГРЕГАЦИИ ГМТ И С-БЕЛКА 111
3.1.1. Идентификация ГМТ и С-белка 111
3.1.1.1. ДСН-гель электрофорез, вестерн-блоттинг и ВЭЖХ-МС/МС С-белка 111
3.1.1.2. ДСН-гель электрофорез, вестерн-блоттинг и ВЭЖХ-МС/МС гладкомышечного титина 113
3.1.2. Исследование динамики агрегации ГМТ и С-белка методом ДРС 114
3.1.2.1 Исследование динамики агрегации $ГМТ_{НМИ}$ 114
3.1.2.2 Исследование динамики агрегации $ГМТ_{ВМИ}$ 116
3.1.2.3 Исследование динамики агрегации С-белка 119
3.1.3. Исследование морфологии агрегатов ГМТ и С-белка 121

3.1.3.1. Исследование морфологии агрегатов $ГМТ_{НМИ}$ методами ПЭМ и АСМ 121
3.1.3.2. Исследование морфологии агрегатов $ГМТ_{ВМИ}$ методами ПЭМ и АСМ 123
3.1.3.3. Исследование морфологии агрегатов С-белка методами ПЭМ и АСМ 126
3.2. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И АМИЛОИДНЫХ СВОЙСТВ ГЛАДКОМЫШЕЧНОГО ТИТИНА И СКЕЛЕТНОМЫШЕЧНОГО С-БЕЛКА 128
3.2.1. Исследование амилоидных свойств ГМТ и С-белка 128
3.2.1.1. Исследование агрегатов С-белка и ГМТ методом рентгеновской дифракции 128
3.2.1.2. Исследование связывания агрегатов С-белка и ГМТ с красителем ТТ 129
3.2.2. Исследование изменения вторичной структуры ГМТ и С-белка при агрегации 131
3.2.2.1. Исследование изменения вторичной структуры ГМТ и С-белка при агрегации методом КД 131
3.2.2.2. Исследование вторичной структуры ГМТ методом ИК-Фурье спектроскопии 133
3.2.3. Исследование структуры ГМТ и С-белка методом СМУРР 136
3.2.3.1. Исследование структуры $ГМТ_{НМИ}$ методом СМУРР 136
3.2.3.2. Исследование структуры $ГМТ_{ВМИ}$ методом СМУРР 137
3.2.3.3. Исследование структуры С-белка методом СМУРР 139
3.2.4. Исследование денатурационной стабильности $ГМТ_{ВМИ}$ методом ДСК 142
3.3. ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ОБРАЗОВАНИЯ ОЛИГОМЕРОВ ГМТ И С-БЕЛКА 143
3.3.1. Изучение олигомеров С-белка 143
3.3.2. Изучение олигомеров ГМТ 145
3.4. ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ФОРМИРОВАНИЯ

ДВУХ ТИПОВ АМИЛОИДНЫХ АГРЕГАТОВ ГМТ$_{НМИ}$ 149
3.4.1. Сравнительное изучение морфологии двух типов агрегатов ГМТ$_{НМИ}$ 149
3.4.1.1 Изучение морфологии двух типов агрегатов ГМТ$_{НМИ}$ методом ПЭМ 149
3.4.1.2 Изучение морфологии двух типов агрегатов ГМТ$_{НМИ}$ методом АСМ 150
3.4.2. Сравнительное изучение обратимости агрегации ГМТ$_{НМИ}$ 152
3.4.3. Изучение амилоидной природы двух типов агрегатов ГМТ$_{НМИ}$ 154
3.4.3.1. Исследование агрегатов ГМТ$_{НМИ}$ методом рентгеновской дифракции 154
3.4.3.2. Исследование связывания агрегатов ГМТ$_{НМИ}$ с красителем ТТ 155
3.4.4. Изучение вторичной структуры двух типов агрегатов ГМТ$_{НМИ}$ 156
3.4.5. Изучение структуры двух типов агрегатов ГМТ$_{НМИ}$ методом СМУРР 158
3.5. СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АМИЛОИДНЫХ АГРЕГАТОВ ГМТ И С-БЕЛКА 159
3.5.1. Идентификация рефлексов, полученных методом рентгеновской дифракции 159
3.5.2. Особенность основных «амилоидных» рефлексов, полученных для агрегатов исследуемых белков 163
3.6. РАСЧЕТ ИДЕНТИЧНОСТИ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ МЕЖДУ ПАРАМИ ДОМЕНОВ И НЕСТРУКТУРИРОВАННЫХ УЧАСТКОВ ГМТ И С-БЕЛКА 164
3.6.1. Расчет идентичности аминокислотной последовательности между парами доменов титина и С-белка 164
3.6.2. Расчет идентичности аминокислотной последовательности между парами доменов I-зоны N2B и N2BA-изоформ титина 167
3.6.3. Расчет неупорядоченных участков в молекуле титина и С-белка 169
3.7. ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АМИЛОИДНЫХ АГРЕГАТОВ ГМТ И С-БЕЛКА НА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК 171
3.7.1. Изучение цитотоксического действия амилоидных агрегатов ГМТ и С-белка 171
3.7.2. Изучение влияния амилоидных агрегатов ГМТ на актиновый

цитоскелет гладкомышечных клеток 173
3.7.3. Изучение влияния поверхности, покрытой амилоидными агрегатами ГМТ, на адгезию фибробластов 175
3.7.4. Изучение морфологии и наноструктуры поверхностей, покрытых амилоидными агрегатами ГМТ, методом АСМ 178
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ 180
4.1. ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ АГРЕГАЦИИ, МОРФОЛОГИИ И СТРУКТУРЫ АГРЕГАТОВ ГМТ И С-БЕЛКА 180
4.2. ВОЗМОЖНАЯ ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ АГРЕГАТОВ ТИТИНА И С-БЕЛКА В ОРГАНИЗМЕ И МЕХАНИЗМЫ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА ОТ ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ АГРЕГАЦИИ ЭТИХ БЕЛКОВ 197
4.2.1. Связь механической жесткости со структурными особенностями амилоидных агрегатов 197
4.2.2. Агрегационные свойства титина *in vitro* и *in vivo*. Механизмы защиты клеток от агрегации титина 202
4.3. ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АМИЛОИДНЫХ АГРЕГАТОВ ГМТ 204
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 209
ВЫВОДЫ 211
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 212

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

AA – амилоид, образованный из сывороточного белка А

Aβ2M – амилоид, образованный из β2-микроглобулина

AFib – амилоид, образованный из фибриногена А

AGel – амилоид, образованный из гелсолина

AH – амилоид, образованный из тяжелой цепи иммуноглобулина

AL – амилоид, образованный из легкой цепи иммуноглобулина

ALECT2 – амилоид, образованный из Фактор-2 хемотаксиса лейкоцитов

ALys – амилоид, образованный из лизоцима

ASem1 – амилоид, образованный из Семеногелина 1

ATTR – амилоид, образованный из транстиретина

CH2 – домен иммуноглобулина М

CH3 – домен иммуноглобулина М

Fab (*англ.* – fragment antigen binding) – участок связывания антигена

Fc (*англ.* – fragment crystallizable region) – кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина

FnIII – фибронектин-подобный домен

His – гистидин (аминокислота)

IAPP – островковый амилоидный полипептид

Ig – иммуноглобулин-подобный домен

IL (*англ.* – interleukin) – интерлейкин

ISA (*англ.* – International Society of Amyloidosis) – Международное общество амилоидоза

mAb (*англ.* – monoclonal antibody) – моноклональные антитела

Met – метионин (аминокислота)

N2A – скелетная N2A-изоформа титина с м.м. 3300-3700 кДа

N2B – сердечная N2B-изоформа титина с м.м. 3000 кДа

N2BA – сердечная N2BA-изоформа титина с м.м. 3200-3350 кДа

Off pathway – сворачивание белка «вне пути» (белок утрачивает нативную конформацию и формирует неправильно свернутые структуры с последующей агрегацией)

On pathway – сворачивание белка «на пути» (белок приобретает нативную конформацию)

pN – пиконьютон

PQC (*англ.* – protein quality control) – контроль качества белка

RMS – среднеквадратичный параметр шероховатости (среднеквадратичное отклонение профиля шероховатости)

Rh – гидродинамический радиус

T2 – протеолитический фрагмент титина, связанный с миозиновыми нитями в А-диске саркомера, м.м. 2000-2300 кДа.

Trp – триптофан (аминокислота)

TTN – ген титина

VEGF R2 – рецептор фактора роста сосудистого эндотелия, тип 2

АСМ – атомно-силовая микроскопия

АТФ – аденозин-5'- трифосфат

АТФаза – аденозинтрифосфатаза

БА – болезнь Альцгеймера

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВНС – вегетативная нервная система

$ГМТ_{ВМИ}$ – высокомолекулярная изоформа титина гладких мышц (м.м. ~1500 кДа)

$ГМТ_{НМИ}$ – низкомолекулярная изоформа титина гладких мышц (м.м. ~500 кДа)

ДРС – динамическое рассеяние света (лазерная корреляционная спектроскопия)

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия

ДСН – додецилсульфат натрия

ДТТ – дитиотреитол

ИК-Фурье – инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье

кДа – килодальтон

КК – Конго красный

крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия

ЛММ – легкий меромиозин

мкм – микрометр

мМ – миллимоль

м.м. – молекулярная масса

мРНК – матричная (информационная) РНК

МСК ПЗЧ – Мезинхимальные стволовые клетки пульпы зуба человека

нм – нанометр

НПВО – нарушенное полное внутреннее отражение

Па – паскаль

ПААГ – полиакриламидный гель

ПНС – периферическая нервная система

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

РНК – рибонуклеиновая кислота

С-белок – миозин-связывающий белок С

СМУРР – синхротронное малоугловое рентгеновское рассеяние

ТТ – тиофлавин Т

ТЦМ – тяжелые цепи миозина

УФ – ультрафиолет

Ф-актин – фибриллярный актин

ФМСФ – фенилметилсульфонил фторид

ФСБ – фосфатный солевой буфер

ЦНС – центральная нервная система

ЭГТА – этиленгликоль бис- (β-аминоэтиловый эфир) N,N,N',N-тетрауксусная кислота

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Пространственная структура белков имеет важное значение для выполнения ими своей функции и, следовательно, для функционирования живой клетки (Tsytlonok et al., 2013; Tian, Best, 2016). Однако в ряде случаев белки и пептиды утрачивают свою нативную конформацию, что приводит к их неправильному сворачиванию и последующей агрегации. Нарушение сворачивания белков является универсальной проблемой, затрагивающей как фундаментальные аспекты биофизики, так и прикладные области биотехнологии и биомедицины. В частности, белковая агрегация признана одной из ключевых проблем при разработке и промышленном производстве терапевтических белковых препаратов (Singh et al., 2015; Wang, 2015; Ross, Wolfe, 2016).

Помимо технологических аспектов, неправильное сворачивание и агрегация белков ассоциированы с рядом патологических состояний, включая системные амилоидозы, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, диабет II типа и другие (Dobson, 2003; Knowles et al., 2014). Однако известны и функциональные амилоиды, в частности, таковые найдены у бактерий, у беспозвоночных животных (белок CPEB у Aplysia) и млекопитающих (белок Pmel17 в меланосомах) (Fowler et al., 2006; Si et al., 2003). И патологические, и функциональные амилоидные агрегаты имеют специфическую кросс-β структуру, обладают способностью связываться с тиофлавином Т и Конго красным (Sunde et al., 1997; Eisenberg, Jucker, 2012). При этом патологические амилоиды имеют высокую стабильность – устойчивы к ферментативному расщеплению, тогда как функциональные амилоиды способны к дезагрегации. Причины этих различий, по-видимому, скрываются в особенностях структурных изменений, которые происходят при агрегации тех или иных белков. Для выяснения подобных структурных изменений и для более детального фундаментального понимания механизмов белковой агрегации требуется

комплексный *in vitro* подход с использованием ряда современных биофизических методов.

Современные представления описывают амилоидогенез как спектр процессов, включающих не только формирование фибрилл, но и менее упорядоченных агрегатов, имеющих частично амилоидные свойства. В этом контексте особый интерес представляют иммуноглобулин-подобные домены (Ig-домены), широко представленные в белках суперсемейства иммуноглобулинов (Williams, Barclay, 1988), к которому относятся и некоторые мышечные белки, в частности, титин и миозин-связывающий белок С (С-белок), являющиеся объектами исследования в данной работе. Эволюционно Ig-домены сформировались как модули для белок-белкового взаимодействия и сборки стабильных надмолекулярных комплексов. Примерами служат иммуноглобулины адаптивного иммунитета, а также некоторые мышечные белки, формирующие основу саркомерного цитоскелета. Благодаря своей универсальной структуре Ig-домены обеспечивают специфическое связывание, но одновременно обладают «липкой» природой, что делает их склонными к агрегации. Однако молекулярные механизмы этой агрегации остаются не ясными.

Мультидоменные мышечные белки, такие как титин, миозин-связывающий белок С и некоторые другие (Н-белок, миомезин, обскурин), состоят из Ig-доменов и подобных им фибронектин III-подобных (FnIII) доменов. В поперечно-полосатых мышцах эти белки являются важными структурными компонентами актинсодержащих и миозинсодержащих нитей, участвующими в формировании высокоупорядоченной саркомерной структуры, а также в запуске и регуляции мышечного сокращения. В гладких мышцах предполагается аналогичная роль титина в поддержании структурно-функциональной целостности сократительного аппарата гладкомышечных клеток, несмотря на отсутствие точных данных о локализации этого белка. В ряде работ продемонстрирована способность отдельных доменов титина к агрегации *in vitro* в условиях, приближенных к физиологическим (Borgia et al., 2013; Wright et al., 2005). Предполагается, что при растяжении саркомера разворачивание

Ig-доменов титина раскрывает скрытые гидрофобные участки, что может способствовать агрегации (Rief et al., 1997; Minajeva et al., 2001).

Научный интерес изучения агрегационных свойств вышеуказанных мышечных белков связан еще и с тем, что в ряде исследований высказано предположение, что укороченные молекулы титина, экспрессирующиеся при развитии дилатационной кардиомиопатии, могут не встраиваться в саркомер, а накапливаться в виде внутриклеточных агрегатов, которые могут проявлять цитотоксичность и нарушать процесс «контроля качества белка» по механизму «пептидного яда» (Herman et al., 2012; Schafer et al., 2017; Fomin et al., 2021; Kellermayer et al., 2024). Предполагается, что и укороченная форма миозин-связывающего белка С, обнаруженная при развитии гипертрофической кардиомиопатии, также может участвовать в процессе формирования белковых агрегатов, нарушающих работу убиквитин-протеосомальной системы в клетке (Sarikas et al., 2005; Zolk et al., 2006; Mearini et al., 2008).

Однако несмотря на приведенные данные, указывающие, в частности, на высокую склонность титина и миозин-связывающего белка С (С-белка) к агрегации, до сих пор не установлено, образуются ли *in vivo* амилоидные агрегаты этих белков, а если образуются, то являются ли они функциональными или патологическими? Таким образом, вопросы о типе белковых агрегатов (амилоидные/неамилоидные, патологические/функциональные) мультидоменных мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов, структурных изменениях в этих белках при агрегации, а также о роли подобной агрегации в мышечных клетках остаются открытыми. Ответы на эти вопросы, скорее всего, скрываются в особенностях структурных изменений, которые происходят при агрегации вышеуказанных белков.

Цель диссертационной работы заключалась в проведении комплексного *in vitro* исследования агрегационных свойств гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка для выяснения типа белковых агрегатов и структурных изменений при агрегации исследуемых белков.

Задачи диссертационной работы

1. Исследовать динамику агрегации гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка методом динамического рассеяния света;

2. Исследовать морфологические особенности агрегатов гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка методом электронной и атомно-силовой микроскопии;

3. Исследовать амилоидную природу агрегатов гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка методом спектрофлуориметрии с использованием красителя тиофлавина Т, а также методом рентгеновской дифракции;

4. Используя различные методы структурного анализа (круговой дихроизм, инфракрасную спектроскопию с преобразованием Фурье, синхротронное малоугловое рентгеновское рассеяние), исследовать изменения структуры титина и С-белка при их агрегации;

5. Исследовать влияние агрегатов титина и С-белка на выживаемость гладкомышечных клеток аорты крысы и фибробластов человека.

Методология и методы диссертационного исследования

Диссертационная работа выполнена с использованием широкого набора современных научных методов биофизики и биохимии, таких как: динамическое рассеяние света, просвечивающая электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия, флуоресцентная спектроскопия с красителем тиофлавин Т, круговой дихроизм, ИК-Фурье спектроскопия, рентгеновская дифракция, малоугловое рентгеновское рассеяние с использованием синхротронного излучения, дифференциальная сканирующая калориметрия, конфокальная микроскопия, выделение и очистка мышечных белков, ДСН-гель-электрофорез, вестерн-блот анализ, методы биоинформатического анализа, которые являются адекватными и соответствуют поставленным целям и задачам. Полученные данные проанализированы с использованием современных методов статический обработки.

С целью проведения комплексного *in vitro* исследования агрегационных свойств титина и С-белка было проведено их выделение из мышечной ткани с последующей очисткой методами гель-фильтрационной и ионообменной хроматографии. Выбор С-белка был сделан на основании того, что он является основным компонентом поперечного саркомерного цитоскелета в миофибриллах сердечной и скелетных мышц позвоночных животных. Выбор гладкомышечного титина – более

низкомолекулярного аналога титина поперечно-полосатых мышц (в которых этот белок является основным компонентом продольного саркомерного цитоскелета) был сделан с целью минимизации методических сложностей при исследовании гигантских молекул данного белка. Миозин-связывающий белок С (С-белок), а также актин были получены из скелетных мышц кролика. Эксперименты с использованием данного лабораторного животного были одобрены Комиссией по биоэтике и биологической безопасности (Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, разрешение № 30 от 10 сентября 2019 г.) в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента. Животные были предоставлены виварием ИТЭБ РАН. Титин был получен из гладкомышечной ткани желудков курицы. Куриные желудки были предоставлены птицефабрикой, расположенной недалеко от города Пущино (ООО «Шепиловская птицефабрика»), имеющей все необходимые лицензии на работу с животными, в частности, с курами. Для исследования цитотоксичности агрегатов гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка были использованы культуры клеток фибробластов и гладкомышечных клеток, полученные в Лаборатории фармакологической регуляции и клеточной резистентности ИТЭБ РАН.

Научная новизна

Впервые показано, что гладкомышечный титин и скелетномышечный миозин-связывающий белок С (С-белок) формируют амилоидные агрегаты с аморфной морфологией. Агрегаты образуются за относительно короткие временные интервалы (в течение 5-10 мин для С-белка, 20 мин для изоформы гладкомышечного титина с м.м. 1500 кДа и в течение 60 мин для изоформы гладкомышечного титина с м.м. 500 кДа). Методами структурного анализа выявлено, что формирование амилоидной кросс-β структуры в агрегатах титина и С-белка происходит на этапе их олигомеризации, т.е., на самой начальной стадии процесса агрегации. Высказано предположение о наличии внутри олигомеров титина и С-белка участков с кросс-β структурой, которые способствуют в дальнейшем формированию более крупные агрегатов.

Впервые обнаружено, что при формировании амилоидных агрегатов титина и С-белка не происходит изменений в их вторичной структуре. В частности, процент

компонентов вторичной структуры (α-спирали, β-участки и неупорядоченная структура) остается неизменным при агрегации исследуемых белков. Учитывая, что у большинства белков при формировании амилоидных агрегатов происходят изменения во вторичной структуре, направленные на увеличение количества β-участков, указанное выше свойство исследуемых мышечных белков ставит их в ряд уникальных объектов, имеющих отличительные особенности амилоидной агрегации.

Показано, что процесс агрегации титина является обратимым, в частности, при помещении агрегатов титина в раствор с более высокой ионной силой (~0.6 М) наблюдалась их дезагрегация. На основании полученных данных предложена гипотеза о возможной функциональной роли амилоидной агрегации титина и других белков, состоящих из Ig- и FnIII-доменов, в мышечных клетках *in vivo*.

При исследовании двух типов амилоидных агрегатов гладкомышечного титина, различающихся по морфологии, способности к дезагрегации и по степени связывания красителя тиофлавина Т, не было выявлено различий на структурном уровне. Сделан вывод, что формирование гладкомышечным титином амилоидных структур происходит в первые часы агрегации (появляется четвертичная кросс β-структура), а дальнейшее укрупнение агрегатов происходит за счёт взаимодействия между собой сформированных амилоидных надмолекулярных структур.

Впервые показано, что амилоидные агрегаты гладкомышечного титина нарушают адгезию гладкомышечных клеток и фибробластов человека. Выдвинуто положение, что нарушение адгезии клеток связано с топологическими особенностями поверхности, которую формировали амилоидные агрегаты белка и на которой находились клетки. Посчитанные значения среднеквадратичной шероховатости поверхности, формируемой амилоидными агрегатами титина гладких мышц, были сопоставимы с описанными в литературе значениями антиадгезивных поверхностей, которые формируют некоторые специально для этого созданные полимеры. Таким образом, впервые предложен новый механизм влияния белковых амилоидных агрегатов на адгезию и выживаемость клеток. Непосредственного цитотоксического действия амилоидных агрегатов гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка выявлено не было.

Положения, выносимые на защиту

1. Гладкомышечный титин и скелетномышечный С-белок формируют *in vitro* амилоидные аморфные агрегаты с четвертичной кросс-β структурой.

2. Процесс амилоидной агрегации титина является обратимым.

3. Формирование амилоидных агрегатов гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка происходит без изменений во вторичной структуре белков.

4. Гладкомышечный титин формирует два типа аморфных амилоидных агрегатов.

5. Амилоидные агрегаты гладкомышечного титина не проявляют цитотоксического действия, но нарушают адгезию клеток.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов диссертационной работы определяется применением большого количества современных биофизических методов исследования, использованием высококачественных расходных материалов и современного передового оборудования. Все эксперименты проводились не менее чем в трёх независимых повторах. Результаты, полученные в экспериментах по цитотоксичности, статистически оценивались с использованием критерия Манна-Уитни (U) при доверительной вероятности $P \leq 0{,}05$. Представленные данные отражают средние значения (M) и стандартные ошибки (m). Одним из важных признаков достоверности является согласованность данных, полученных при анализе вторичной структуры белков с использованием двух физически различных методов – кругового дихроизма и инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье. Применение совокупности методов электронной и атомно-силовой микроскопии, флуоресцентного анализа, динамического светорассеяния, кругового дихроизма, ИК-Фурье спектроскопии и синхротронного малоуглового рентгеновского рассеяния обеспечило верификацию полученных результатов при исследовании структурной организации белков. Достоверность положений, выносимых на защиту, подтверждается их соответствием экспериментально установленным

закономерностям, описанным в серии публикаций и воспроизведённым с использованием независимых методов анализа.

Апробация результатов работы

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» (Пущино, 2016, 2019); Всероссийских конференциях «Экспериментальная и теоретическая биофизика (Пущино, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022); форуме «Наука будущего – наука молодых» (Нижний Новгород, 2017); Международных Пущинских школах-конференциях молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022); XXX зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2018); Отчетной годовой конференции ИТЭБ РАН (Пущино, 2018); 47-ой Европейской мышечной конференции (Budapest, Hungary, 2018); 42-ой Европейской мышечной конференции (Amsterdam, Netherlands, 2013); 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).

Личный вклад автора

Автором разработана концепция исследования, сформулированы цели и задачи работы. Автор принимал непосредственное участие в планировании экспериментов, проведении исследований, анализе и интерпретации результатов, а также в написании и подготовке научных публикаций.

Эксперименты по выделению, очистке и подготовке исследуемых белков, а также исследования с использованием электронной микроскопии и флуориметрии были выполнены автором самостоятельно или при его непосредственном участии и руководстве.

Автор лично участвовал в получении и анализе данных, полученных методами атомно-силовой микроскопии, динамического светорассеяния, инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье, кругового дихроизма, рентгеновской дифракции, а также лично участвовал в экспериментах, проводимых на клеточных культурах.

Исследования методом малоуглового рентгеновского рассеяния с использованием синхротронного излучения проведены на Фотонной фабрике Национальной лаборатории физики высоких энергий (Цукуба, Япония). Исследования молекул и олигомеров гладкомышечного титина методом АСМ осуществлялись совместно с лабораторией биофизики и радиационной биологии Семмельвейского университета (Будапешт, Венгрия).

Ряд работ выполнен в кооперации с профильными лабораториями:

Исследования цитотоксичности – в Лаборатории фармакологической регуляции и клеточной резистентности ИТЭБ РАН (рук. к.б.н. Кобякова М.И.).

ИК-Фурье спектроскопия – совместно с Лабораторией новых методов в биологии ФИЦ ПНЦБИ РАН (рук. к.ф.-м.н. Пермяков С.Е.).

Рентгеновская дифракция – с группой структурных исследований макромолекулярных комплексов Института белка РАН (рук. к.ф.-м.н. Габдулхаков А.Г.).

Биоинформатический анализ – с Лабораторией биоинформатики Института белка РАН (рук. д.ф.-м.н. Галзитская О.В.).

Исследования методом ДСК – с группой термодинамики белка Института белка РАН (рук. д.ф.-м.н. Потехин А.С.).

Исследования структуры белковых агрегатов методом АСМ проводились совместно с сотрудниками Лаборатории ЯМР-исследований биосистем ИТЭБ РАН (рук. к.б.н. Тимченко М.А.) и Лаборатории физики белка Института белка РАН (рук. д.ф.-м.н., проф., чл.-корр. РАН Филькенштейн А.В.).

Исследования микроструктуры поверхности агрегатов титина методом АСМ, проводились совместно с сотрудниками Лаборатории наноструктур и нанотехнологий ИТЭБ РАН (рук. д.х.н. Шляпников Ю.М.).

Исследования процесса агрегации белков методом динамического светорассеяния проводились совместно с сотрудниками сектора оптической микроскопии и спектроскопии Института биофизики клетки РАН – обособленного подразделения ФИЦ ПНЦБИ РАН (рук. д.ф.-м.н. Пеньков Н.В.).

Степень разработанности проблемы

Исследования агрегационных свойств мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов, в том числе титина и С-белка, начались в середине 80-х годов прошлого века (Kimura et al., 1984; Bennett et al., 1985; Koretz et al., 1993). В частности, в 1993 году в работе (Koretz et al., 1993) впервые была показана способность титина, выделенного из скелетных мышц кролика, формировать *in vitro* пучки линейных фибрилл. Амилоидные свойства титина и других белков при этом не изучались. Первые исследования типа белковых агрегатов (амилоидные/неамилоидные), формируемых мышечными белками суперсемейства иммуноглобулинов, были инициированы в начале XXI века сотрудниками ИТЭБ РАН под руководством д.б.н. Подлубной З.А. Они впервые показали, что титин, С-белок, Х-белок и Н-белок, выделенные из скелетных мышц кролика, способны формировать различные типы агрегатов, некоторые из которых проявляли способность связывать такие «амилоидные» красители, как Конго красный и тиофлавин Т (Марсагишвили и др., 2005; Подлубная, Марсагишвили, 2008; Marsagishvili et al., 2005). На основании этих данных авторы сделали вывод об амилоидной природе агрегатов исследуемых мышечных белков. Однако исследования, направленные на выявление четвертичной кросс-β-структуры в агрегатах мышечных белков, проведены не были. За пределами понимания также оставался вопрос о структурных изменениях, происходящих в молекулах исследуемых белков при формировании агрегатов.

Известны также исследования, посвященные изучению особенностей агрегации отдельных Ig-доменов титина (Wright et al., 2005; Borgia et al., 2015). Было обнаружено повышение способности к агрегации отдельных доменов титина в случае увеличения более 40% идентичности их аминокислотных последовательностей. Авторы высказали предположение о возможных негативных последствиях подобной агрегации в мышечных клетках.

Таким образом, описанные литературные данные характеризуют мышечные белки суперсемейства иммуноглобулинов как интересные объекты для изучения процесса белковой агрегации.

Теоретическая значимость работы

Полученные результаты о формировании амилоидных агрегатов исследуемыми мышечными белками расширяют представления о процессе белковой агрегации и, в частности, об особенностях амилоидной агрегации белков суперсемейства иммуноглобулинов на структурном уровне. Полученные данные углубляют представления о возможных различиях между функциональными и патологическими амилоидными агрегатами, показывая на примере мультидоменных мышечных белков механизм формирования нетоксичных амилоидных агрегатов, способных дезагрегировать. Эти знания необходимы для построения молекулярных моделей разных типов амилоидной агрегации, что позволит в дальнейшем находить способы влияния на процесс амилоидообразования.

Практическая значимость работы

Практическая ценность работы заключается в том, что полученные данные о структурных изменениях в исследуемых мышечных белках при агрегации *in vitro* могут быть использованы в биомедицине, например, для увеличения эффективности белковых лекарственных препаратов путём снижения возможной агрегации их белковых компонентов. Результаты исследования по влиянию амилоидных агрегатов на адгезию клеток могут быть использованы в биомедицине для создания специальных антиадгезивных материалов в качестве покрытия для вживляемых электродов или электростимуляторов.

Публикации

Основные положения диссертации опубликованы в 29 печатных работах, в том числе в 20 статьях в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных МИНОБРНАУКИ России для опубликования результатов диссертаций (входят в базы данных WoS, Scopus, РИНЦ и RSCI).

Структура и объём работы

Диссертация состоит из разделов: Список использованных сокращений, Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение результатов, Заключение, Выводы, Список литературы. Общий объём диссертации составляет 301 страница. Диссертация содержит 52 рисунка и 8 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 717 наименований.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. АГРЕГАЦИЯ БЕЛКОВ

1.1.1. Процесс агрегации белков

Белки участвуют практически во всех биологических процессах. Типичная клетка млекопитающего экспрессирует от 10 000 до 20 000 различных белков. Белки синтезируются на рибосомах в виде цепочек аминокислотных последовательностей и в последующем укладываются в уникальные трехмерные структуры. Правильная структура белка необходима для выполнения своих биологических функций (Balchin et al., 2016). Исследования процесса сворачивания белков и поддержания целостности их нативной структуры в различных условиях, под влиянием внешних и внутренних факторов, являются проблемами первостепенной важности с биологической и медицинской точек зрения. Сворачивание белка – это спонтанный процесс, который регулируется гидрофобными взаимодействиями, внутримолекулярными водородными связями, силами Ван-дер-Ваальса и другими электростатическими взаимодействиями (Dill, 1990; Pace et al., 1996; Nick Pace et al., 2014). Для обеспечения правильного сворачивания белка в нативную структуру в аминокислотной последовательности белка заложена информация еще на уровне первичной структуры полипептидной цепи (догма Анфинсена) (Anfinsen, 1973; Socolich et al., 2005). Сам процесс сворачивания белка включает в себя большое количество стадий и промежуточных конформаций, характеризующийся различными термодинамическими состояниями с локальными минимумами свободной энергии (Adamcik, Mezzenga, 2018). Однако из-за недостаточно высокой стабильности структуры белка, небольшие изменения, вызванные, к примеру, мутациями, могут приводить к нарушению формирования белком правильной структуры (Gershenson et al., 2014; Balchin et al., 2016). Неправильно свернутая молекула может взаимодействовать с другими неправильно свернутыми молекулами посредством межмолекулярных взаимодействий, приводящих к образованию неупорядоченных или высокоупорядоченных агрегатов (Dobson, 2003; Selkoe, 2003; Chiti, Dobson, 2006;

Chiti, Dobson, 2009; Chiti, Dobson, 2017). Образование токсичных белковых агрегатов связано с развитием разных патологий, включая и амилоидозы (Buxbaum, Linke, 2000; Dobson, 2004(a); Dobson, 2004(b); Knowles et al., 2014). Таким образом, контроль качества белка и поддержание протеомного баланса имеют решающее значение для здоровья клеток и организма. Чтобы обеспечить правильное функционирование всех белков для поддержания протеостаза (Balch et al., 2008), все живые организмы выработали широкий спектр механизмов для обеспечения системы внутриклеточного «контроля качества белка» (protein quality control – PQC). Туда входят молекулярные шапероны, которые опосредуют сворачивание белков и конформационную репарацию, убиквитин-протеасомная система и аутофагия, которые удаляют окончательно неправильно свернутые белки и агрегаты. Важно отметить, что эффективность работы систем протеостаза снижается во время старения (Labbadia, Morimoto, 2015), что способствует возникновению хронических заболеваний, вызванных агрегацией белков.

Агрегация белков была признана одной из основных проблем при разработке и коммерциализации успешных лекарственных препаратов на основе белков и пептидов (Singh et al., 2015; Wang, 2015; Ross, Wolfe, 2016). В этой связи проблемой может стать как обратимая самоассоциация, так и фактически необратимая агрегация. Однако в редких случаях самоассоциация белков потенциально может приносить пользу и использоваться для стабилизации белков и доставки лекарств (Srinivasan et al., 2013).

Агрегация белка наблюдается на всех этапах разработки и производства белковых продуктов, таких как экспрессия белка (Paul et al., 2015; Ishii et al., 2015), очистка (Arakawa et al., 2017), приготовление (Pindrus et al., 2015), розлив готового продукта (Nayak et al., 2011), лиофилизация (Roughton et al., 2013) и хранение (Connolly et al., 2015). Агрегация белков также может происходить в процессе приёма (Shi et al., 2017; Pardeshi et al., 2017; Giannos et al., 2018) или после приёма (Filipe et al., 2012(c); Nilsson, 2016) белковых продуктов.

Неблагоприятное влияние агрегации белков на здоровье и безопасность пациентов обусловлено повышенной цитотоксичностью белковых агрегатов (Ow, Dunstan, 2014). Агрегаты ряда различных белков более иммуногенны, чем их мономерные аналоги (Joubert et al., 2016; Ratanji et al., 2016; St Clair et al., 2017), а

другие нет (Filipe et al., 2014). Эти противоречивые результаты могут быть связаны с различиями в размерах, типах, морфологии, структуре или количестве агрегатов в этих исследованиях, как показано для амилоидных агрегатов IgG (Filipe et al., 2012(a); Freitag et al., 2015; Bessa et al., 2015; Telikepalli et al., 2015; Abdolvahab et al., 2016; Boll et al., 2017; Uchino et al., 2017; Daniels, Randolph, 2018).

1.1.2. Механизмы агрегации

Сворачивание белка – очень сложный процесс и недостаточно изученный. Были предложены три классические модели для описания механизмов образования промежуточных продуктов сворачивания «на пути» («On-pathway») к нативному состоянию белка (Рис. 1 А) (Daggett, Fersht, 2003).

1. Каркасная или иерархическая модель предполагает, что на начальном этапе «на пути» сворачивания происходит образование вторичных структур (α-спираль, β-лист и повороты) внутри полипептидной цепи за счет образования внутримолекулярных водородных связей. Вторичные структуры затем образуют промежуточные формы. Этот процесс уже управляется с помощью гидрофобных взаимодействий.

2. Модель «гидрофобного коллапса» предполагает, что гидрофобные взаимодействия между неполярными остатками инициируют сворачивание через спонтанный коллапс полипептида в компактное состояние («расплавленную глобулу») с гидрофобным ядром, которое быстро разрушается до образования вторичных структур.

3. Механизм зародышеобразования представляет собой гибрид иерархической модели и модели гидрофобного коллапса, в которых гидрофобные третичные взаимодействия консолидируются одновременно с образованием локальных ядер, управляемых последовательностью нативных вторичных структур. Таким образом, согласно этой модели, третичная структура возникнет как необходимый результат вторичной структуры и гидрофобного сворачивания.

Во многих случаях правильно сложенные функциональные белки требуют присутствия более одной субъединицы и, таким образом, формирование

четвертичной структуры белка является неотъемлемой частью процесса сворачивания (Рис. 1 В). Даже если межмолекулярные взаимодействия ответственны за формирование функционального свернутого белка, этот процесс все же считается частью сворачивания «на пути».

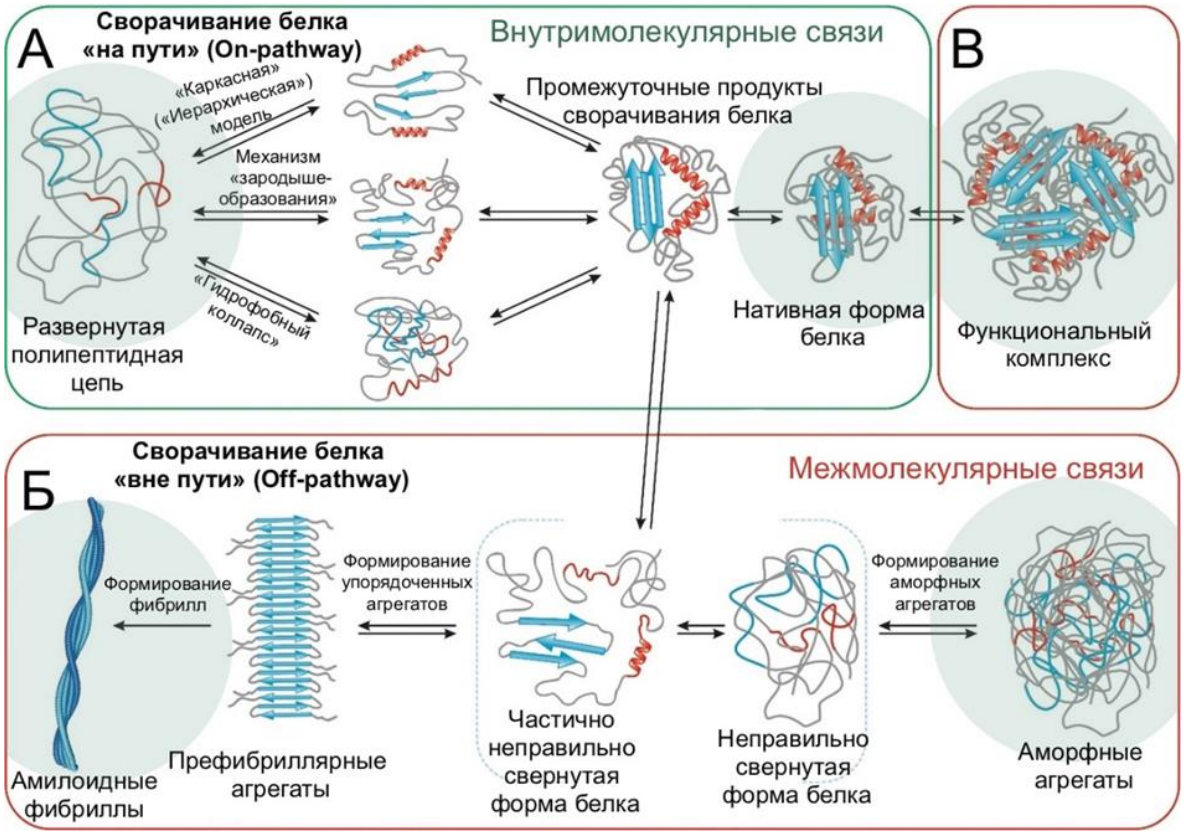


Рис. 1. А – Схема сворачивания белка «на пути». Преобладают внутримолекулярные взаимодействия, и развернутая полипептидная цепь складывается в нативную конформацию через промежуточные состояния. Проиллюстрированы также три модели сворачивания для развернутой полипептидной цепи: каркасная модель, модель гидрофобного коллапса и модель нуклеации-конденсации, которая представляет собой комбинацию двух других моделей. Б – Укладка полипептидных цепей «вне пути» сворачивания. Промежуточный продукт сворачивания полипептидной цепи образует неправильно свернутые или частично неправильно свернутые состояния, между молекулами которых начинают преобладать межмолекулярные взаимодействия. Агрегация происходит по одному из двух путей: неупорядоченная агрегация, приводящая к образованию аморфных агрегатов без определенной формы, или упорядоченная агрегация, приводящая к сборке упорядоченных фибриллярных агрегатов, то есть амилоидных фибрилл. В – Межмолекулярные взаимодействия между правильно сложенными полипептидными цепями приводят к образованию функциональных комплексов нативных белков (четвертичная структура белка) (Adamcik, Mezzenga, 2018).

Неправильно свернутые структуры белков представляют собой нарушение сворачивания «на пути» (Dobson, 2003; Selkoe 2003; Chiti, Dobson, 2006; Chiti, Dobson, 2017). Во время сворачивания «на пути» для стабилизации внутри свернутого белка действуют гидрофобные силы. В случае неправильно свернутых белков гидрофобные силы инициируют сворачивание «вне пути» («off-pathway»), приводя к агрегации неправильно свернутых белков. В большинстве случаев это происходит за счет межмолекулярных неспецифических взаимодействий между агрегированными неправильно свернутыми белками, что приводит к образованию аморфных агрегатов, которые определяются как супрамолекулярная сборка полипептидных цепей без определенной формы (Рис. 1 Б) (Adamcik, Mezzenga, 2018).

Агрегаты неправильно свернутых белков не всегда образуют неупорядоченные структуры. Сворачивание «вне пути» может также приводить к формированию высокоупорядоченных агрегатов (Рис. 1 Б). Классическим примером высокоупорядоченного агрегата неправильно свернутого белка является амилоидная фибрилла.

Следует отметить, что в последние несколько десятилетий было разработано множество моделей агрегации белков (Andrews, Roberts, 2007(a); Morris et al., 2009). Основные модели процесса агрегации, описанные выше, могут удовлетворительно описать данный процесс для многих белков в определенных условиях. Однако универсальной модели агрегации не существует по ряду причин, среди которых, в первую очередь, такие: построение модели зависит от аминокислотной последовательности белка, стадии агрегации, состава раствора, в котором данный белок или пептид находится (Wang, Roberts, 2018).

1.1.3. Факторы, влияющие на агрегацию

1.1.3.1. Особенности структуры белка

Понимание причин агрегации белков в организме и факторов, влияющих на этот процесс, крайне важно. Также важно учитывать факторы, влияющие на агрегацию при работе с белками *in vitro*, тем более что большинство исследований агрегации белков,

в том числе и амилоидной, происходит *in vitro*. Также необходимо учесть, что агрегация белков является важной проблемой, в том числе, и при получении и хранении лекарственных средств. Поэтому следует уделить внимание факторам, которые влияют на агрегацию белков в целом.

Первичная структура белка

Последовательность аминокислотных остатков и относительное количество гидрофобных аминокислот белка потенциально имеют сильное влияние на скорость агрегации и стабильность агрегатов (Berryman et al., 2011; Scherzer-Attali et al., 2012; Barz, Urbanc, 2014; Ow, Dunstan, 2014). Гидрофобные аминокислоты могут образовывать области склонные к образованию агрегатов (Kumar et al., 2012; Buck et al., 2013(a); Buck et al., 2013(b); Meric et al., 2017). Также считается, что низкая склонность к агрегации характерна для мультидоменных белков, у которых идентичность в аминокислотной последовательности между соседними доменами составляет менее 40% (Wright et al., 2005). Однако склонность белков к агрегации регулируется не только определенными последовательностями пептидов, склонных к агрегации, но и амфифильными свойствами аминокислотной последовательности олигопептидов (Thangakani et al., 2012; Liaw et al., 2013). Также известно, что замена одной аминокислоты или введение дополнительной в конкретное место может значительно увеличить скорость агрегации белка (Brubaker et al., 2011; Raimondi et al., 2011).

Вторичная структура белка

Вторичная структура белка может влиять на его агрегацию. Было обнаружено, что индуцированная лиофилизацией агрегация ряда белков связана с процентным содержанием β-листов в складчатых структурах, но не с общей площадью неполярной поверхности (Roughton et al., 2013). Вторичная структура также может влиять на скорость тиол-дисульфидного обмена, потенциально влияя на скорость химически опосредованной агрегации в белках с открытыми дисульфидными связями (Huh et al., 2013; Chandrasekhar et al., 2014).

Третичная структура белка

Третичная структура также может иметь сильное влияние на агрегацию белков. Склонные к агрегации области, такие как «горячие точки», могут быть важны для усиления агрегации белков, однако агрегация может быть минимальной, если они должным образом скрыты от воздействия растворителя, а также окружены заряженными остатками или пролинами (Thangakani et al., 2012). Анализ повышенной склонности к пространственной агрегации был предложен для идентификации любых пространственных областей антител, склонных к агрегации (Chennamsetty et al., 2009(b)). Четырнадцать таких склонных к агрегации мотивов размером от одного до семи аминокислотных остатков были идентифицированы в IgG1 (Chennamsetty et al., 2009(a)).

1.1.3.2. Гликирование и гликозилирование

Гликирование белка может преобразовывать положительный поверхностный заряд в нейтральный или отрицательный заряд, или может увеличивать его открытую гидрофобную поверхность, как показано на примере Aβ-пептида (Jana et al., 2016), лизоцима (Adrover et al., 2014), цитохрома C (Oliveira et al., 2013) и IgG (Leblanc et al., 2016; Banks et al., 2009). Однако избыточное гликирование напротив может обеспечить защиту белка от агрегации, как показано на примере бычьего сывороточного альбумина (Liu, Jing, 2016). Сниженная склонность к агрегации, вероятно, связана с гидратацией белка, индуцированной сахаром, и стерическими препятствиями (Liu, Zhong, 2012). Следовательно, преднамеренное химическое гликозилирование белка является вариантом минимизации агрегации белка, как показано для α-химотрипсина (Flores-Fernández et al., 2010). Гликозилирование белков также важно для стабильности многих белков (Planinc et al., 2016). Гликозилирование в домене CH2 антител mAb стабилизирует как домен CH2, так и всю молекулу mAb (Latypov et al., 2012; Sedlak et al., 2015). Следовательно, дегликозилирование mAb может нарушать третичную структуру домена CH2 и дестабилизировать как Fab-, так и Fc-области для ускорения термически индуцированной агрегации (Wang et al., 2013(a)). Также тип гликановых структур в белках может изменять тенденцию к

агрегации белков, влияя в целом на его конформационную стабильность (Buck et al., 2013(a); Buck et al., 2013(b)).

1.1.3.3. Дезамидирование

Было показано, что дезамидированные белки обладают повышенной тенденцией к агрегации (Takata et al., 2008; Shi et al., 2013). Усиление агрегации белка при дезамидировании может быть связано с дестабилизацией белка (Shi et al., 2013) и/или усилением межбелковых взаимодействий (Pande et al., 2015). С другой стороны, введение отрицательного заряда посредством дезамидирования может потенциально изменить общие электростатические белок-белковые взаимодействия, что приведет к снижению агрегации белка (Wang et al., 2017(a)).

1.1.3.4. Химическое воздействие

Было показано, что белки, подвергшиеся окислению, имеют повышенную тенденцию к агрегации (Torosantucci et al., 2014; Adem et al., 2014; Kryndushkin, Rao, 2016). Усиленная агрегация белка наблюдалась во многих случаях в присутствии окислителя, такого как перекись водорода (Koudelka et al., 2012; Fazeli et al., 2014; Hada et al., 2016; Cheng et al., 2016) или металла (Mozziconacci et al., 2016(a); Mozziconacci et al., 2016(b)).

1.1.3.5. Температура

Температура влияет на агрегацию белков, а также на скорость диффузии белка, белок-белковые взаимодействия, растворимость белков/агрегатов, конформационную стабильность и химическую деградацию (Wang, Roberts, 2018). Повышение температуры может ускорить процесс агрегации белков из-за увеличения доли частично развернутых состояний, скорости диффузии и столкновения белков друг с другом (Sleutel et al., 2012; Wang, Roberts, 2018). Понижение температуры в свою очередь может вызвать разворачивание белка, что также приведет к его агрегации.

Например, содержание денатурированного рибосомного белка L9 составляло 36% при 25°C и увеличивалось до 76% при 4°C (Luan et al., 2013). Снижение температуры также может усиливать обратимую олигомеризацию или образование кластеров, как это наблюдается для некоторых моноклональных антител (Salinas et al., 2010; Godfrin et al., 2013; Esfandiary et al., 2013; Esfandiary et al., 2015; Raut, Kalonia, 2015(a); Fukuda et al., 2017). Усиленная олигомеризация может привести к опалесценции раствора (Nishi et al., 2010; Yang et al., 2016; Wu et al., 2017), образованию твердого непрозрачного геля (Casaz et al., 2014).

Было показано, что замораживание способствует агрегации многих белков (Barnard et al., 2011; Zhang et al., 2011; Paul et al., 2017; Rayfield et al., 2017; Hauptmann et al., 2018; Vlieland et al., 2018; Tokhadze et al., 2018). Это связано с одним или несколькими из следующих эффектов: денатурации, вызванной низкой температурой (Meliga et al., 2013; Liu et al., 2014), адсорбции белка, вызванной охлаждением (Twomey et al., 2013), селективной кристаллизацией определенных компонентов (Roessl et al., 2015) и содержанием в образце различных растворенных веществ (Cordes et al., 2012; Reinsch et al., 2015). Как замораживание, так и оттаивание могут влиять на агрегацию белков (Radmanovic et al., 2013; Desai et al., 2017). Скорость замораживания или оттаивания также может влиять на стабильность белка или склонность к агрегации во время хранения (Roessl et al., 2015; Connolly et al., 2015; Mezhebovsky et al., 2016(a); Mezhebovsky et al., 2016(b); Desai et al., 2017).

1.1.3.6. Условия раствора

pH-раствора

Стабильность белка, конформационная или коллоидная, сильно зависит от условий раствора. Критическим условием является pH раствора, который может влиять как на конформационную, так и на коллоидную стабильность и влиять на агрегацию белков (Bhattacharya et al., 2011; Smith et al., 2012; Joshi et al., 2014; Kim et al., 2014(a); Kim et al., 2014(b); Pindrus et al., 2015; Oyetayo, Kiefer, 2016; Chavez et al., 2016; Bickel et al., 2016; Barnett et al., 2016; Skamris et al., 2016; Reichert et al., 2017; Galm et al., 2017; Schermeyer et al., 2017). Для IgG1 показано, что даже

кратковременное (часы) снижение pH на 1 (начиная с pH 6) вызывало образование переходных частично развернутых состояний, что приводило к образованию агрегатов (от димеров до частиц размером 10 мкм) (Filipe et al., 2012(b)). Изменение pH раствора может изменить характер и степень белок-белковых взаимодействий (Brummitt et al., 2011(a); Esfandiary et al., 2013; Pindrus et al., 2015; Calero-Rubio et al., 2018), растворимость белковых агрегатов (Brummitt et al., 2011(b); Sahin et al., 2012), и, следовательно, может влиять на зародышеобразование и рост агрегатов (Brummitt et al., 2011(b), Buell et al., 2014; Barnett et al., 2015). Поэтому эффекты pH раствора могут способствовать морфологическому разнообразию белковых агрегатов (Krebs et al., 2007; Krebs et al., 2009(a)).

Ионная сила раствора

Еще одним важным условием раствора, влияющим на агрегацию белков, является ионная сила (Bhattacharya et al., 2011; Casaz et al., 2014; Kutsch et al., 2016; Bickel et al., 2016). Ионная сила может влиять на конформационную стабильность (Wang et al., 2013b; Lilyestrom et al., 2013), а также на природу и степень межбелковых взаимодействий (Sule et al., 2012; Saito et al., 2013; Neergaard et al., 2013; Arzensek et al., 2015; Zhang et al., 2017(a); Calero-Rubio et al., 2018).

Присутствие катионов и анионов в растворе

Также на агрегацию белков могут влиять катионы и анионы солей и металлов (Buell et al., 2013; Zhang et al., 2017(a)). Их относительные эффекты могут значительно различаться (Gokarn et al., 2011; Majumdar et al., 2013). В некоторых случаях было показано, что солевые анионы влияют на поведение агрегации белков в большей степени (Baumgartner et al., 2016) или в более широком диапазоне pH (Arosio et al., 2013). Различие в эффектах между катионами и анионами может быть связано с более высокой тенденцией анионов связываться с положительными группами белков (Gokarn et al., 2011; Campioni et al., 2012; Buell et al., 2013). Относительные эффекты отдельных анионов могут зависеть от их поляризуемости (Buell et al., 2013) или электроселективности (Campioni et al., 2012), в зависимости от белка и условий раствора.

1.1.3.7. Различные соединения

Некоторые хорошо известные стабилизаторы белка могут способствовать агрегации белка при определенных условиях. Было обнаружено, что сахара, такие как сахароза или трегалоза, способствуют агрегации нескольких белков, включая фактор роста кератиноцитов 2 (KGF-2) (Liu et al., 2013(b)), mAb (Abbas et al., 2013). Было высказано предположение, что трегалоза в высокой концентрации (> 500 мМ) может образовывать кластеры и конкурировать за молекулы воды на поверхности белка, способствуя тем самым возникновению межбелковых взаимодействий (Chen et al., 2016). Было показано, что поверхностно-активные вещества, такие как полисорбаты, усиливают агрегацию белков (Liu et al., 2013(a); Agarkhed et al., 2013; Snell et al., 2016) или образование частиц (Liu et al., 2013(b)). Основной причиной является разложение поверхностно-активных веществ с образованием нерастворимых жирных кислот, пероксидов, сложных эфиров полиоксиэтилена (POE) жирных кислот, альдегидов и многих других продуктов, которые могут взаимодействовать с белком, приводя к его агрегации (Kishore et al., 2011(a); Kishore et al., 2011(b); Agarkhed et al., 2013; Li et al., 2014(a); Cao et al., 2015; Saggu et al., 2015; Siska et al., 2015; Zhang et al., 2017(b)). Другие примеры добавок, которые усиливают агрегацию белков, это антимикробные агенты (Singh et al., 2011; Bis, Mallela, 2014; Bis et al., 2015; Bednarek et al., 2017; Arora et al., 2017; Yoshizawa et al., 2018), аргинин (Fukuda et al., 2014; Smirnova et al., 2015), полиэтиленгликоли (PEG) (Ma et al., 2013; Breydo et al., 2015; Raut, Kalonia, 2016(b)), лимонная кислота (Reiche et al., 2017), аскорбиновая кислота (Chaudhri et al., 2013) и полимеры (Luo et al., 2016).

1.1.3.8. Перемешивание

Перемешивание – это термин, который часто включает в себя такие понятия как встряхивание, взбалтывание и само перемешивание (Bai et al., 2012). Было показано, что перемешивание или встряхивание вызывает агрегацию ряда различных белков или пептидов (Yoshimura et al., 2012; Dengl et al., 2013; Liu et al., 2013(b); Rygula et al., 2013; Wiesbauer et al., 2013; Telikepalli et al., 2014; Ghazvini et al., 2016; Sediq et al.,

2016; Gandhi et al., 2017; Lewis et al., 2017; Shah et al., 2017; Gandhi et al., 2017; Waxman, Vilivalam, 2017). Вызванная перемешиванием агрегация белка, особенно в контексте производства, была связана с одним или несколькими из следующих эффектов: образованием дополнительной границы раздела воздух/жидкость где происходит адсорбция, разворачивание и собственно агрегация белков (Shieh, Patel, 2015; Paul et al., 2017); воздействие гидрофобной поверхности, такой как деталь вращения для перемешивания (Zhai et al., 2012). Вызванные перемешиванием агрегаты/частицы могут состоять как из нековалентно связанных, так и из ковалентно связанных между собой (например, дисульфидными связями) белков (Brych et al., 2010) и могут быть морфологически разнообразными в зависимости от условий (Telikepalli et al., 2014). Агрегаты белков, состоящие из нековалентно связанных мономеров, могут со временем частично диссоциировать обратно на мономеры (Pavisic et al., 2010; Kiese et al., 2010; Dekel et al., 2017).

1.1.3.9. Воздействие света

Воздействие света может вызвать появление различных продуктов фотолитической и нефотолитической деградации белков (Mozziconacci, Schoneich, 2015). Это приводит к появлению агрегатов или мономеров, имеющих повышенную тенденцию к агрегации. Воздействие на растворы антител УФ или видимого света в некоторых случаях приводило к образованию высокомолекулярных частиц (Mason et al., 2012; Singh et al., 2012; Agarkhed et al., 2013; Sreedhara et al., 2016; Du et al., 2018). Поскольку воздействие света производит активные формы кислорода, такие как синглетный кислород, воздействие света на mAb может генерировать значительное количество окисленных продуктов на остатках Trp и Met что приводит к усилению агрегации (Singh et al., 2012; Agarkhed et al., 2013; Sreedhara et al., 2016). Следовательно, состав высокомолекулярных частиц может быть сложным и может включать димеры, тримеры, олигомеры более высокого порядка (Mason et al., 2012) и агрегаты, содержащие His-His связи (Lei et al., 2017), или продукты окисления триптофана в виде кинуренина, N-формилкинуренина и гидрокситриптофана (Li et al., 2014(b)).

1.1.3.10. Высушивание и концентрирование

Различные процессы сушки потенциально удаляют часть гидратного слоя белка, что способствует дальнейшей агрегации белка (Mukherjee et al., 2009; Kumar et al., 2009). Многие белки образуют небольшое количество агрегатов во время традиционной сублимационной сушки (Zhou et al., 2014) или процессов распылительной сушки (Lassner et al., 2014; Faghihi et al., 2014).

При изучении влияния концентрации белка на агрегацию было показано, что агрегация увеличивалась с более высокой концентрацией белка при инкубации в условиях покоя. Однако агрегация уменьшалась при более высокой концентрации белка, если ее индуцировала поверхность раздела фаз воздух/вода в результате перемешивания (Treuheit et al., 2002). Также отмечается, что локальное повышение концентрации, например, при ультрафильтрации, а также повышение концентрации и плотности при колоночной хроматографии, могут приводить к агрегации белков (Arakawa et al., 2017).

1.1.3.11. Воздействие ультразвуком

Воздействие ультразвуком может вызвать частичное развертывание и агрегацию белка из-за процесса кавитации, акустического давления и локального повышения температуры (Stepanskiy, 2012; Arzeni et al., 2012; Uesugi et al., 2013).

Таким образом, из выше представленного следует, что существует огромное количество факторов, которые влияют на процесс агрегации белка. И все их нужно учитывать не только при производстве и хранении белковых фармацевтических препаратов, но и при изучении процесса белковой агрегации *in vitro*, чтобы избежать получения артефактов.

1.1.4. Стадии агрегации белка

Агрегацию белка в целом можно рассматривать как серию последовательных и параллельных событий, которые начинаются с образованием димера или олигомера,

продолжаются ростом агрегатов и завершаются образованием крупных частиц, представляющих собой зрелые формы агрегатов с ограниченной растворимостью (Wang, Roberts, 2018). В некоторых случаях процесс агрегации начинается со структурных изменений внутри молекулы белка, но при этом обязательно включает белок-белковые взаимодействия.

Сам процесс агрегации можно разделить на несколько стадий: «лаг»-период, период экспоненциального роста и фаза насыщения. Каждая стадия сопровождается изменениями в структуре белков и образованием новых форм. На рисунке 2 представлена схема амилоидной агрегации при формировании фибрилл белка.

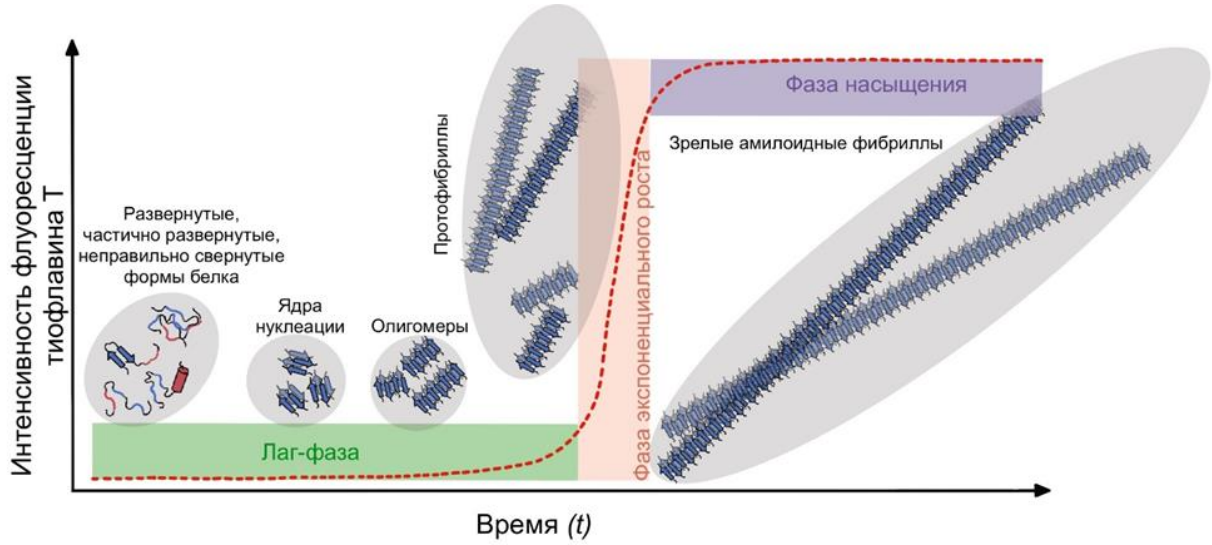


Рис. 2. Стадии агрегации белков на примере амилоидной агрегации. Процесс самосборки развернутых или неправильно свернутых полипептидных цепей в зрелые амилоидные фибриллы. На графике представлена зависимость интенсивности флуоресценции амилоидного красителя ТТ от времени. Флуоресцентный краситель ТТ используется для исследования в том числе и динамики амилоидной агрегации. График процесса агрегации (формирования амилоидных фибрилл) имеет типичную сигмоидальную форму, содержащую три фазы. Лаг-фаза («Lag») соответствует сборке пептидных цепей в так называемые ядра нуклеации, представляющие собой как правило небольшие олигомеры, которые растут посредством сборки, управляемой межмолекулярным взаимодействием. В фазе роста («экспоненциальный рост») ядра и более крупные олигомеры продолжают взаимодействовать, собираясь в префибриллярные структуры, которые быстро растут с образованием упорядоченных фибриллярных структур, известных как протофибриллы. Фаза «насыщения» включает в себя сборку протофибрилл в зрелые многонитевые амилоидные фибриллы с различными морфологическими структурами и высоким уровнем возможного полиморфизма. Адаптировано по (Adamcik, Mezzenga, 2018).

1.1.4.1. Олигомеризация / зародышеобразование

Белки подвергаются внутренним конформационным колебаниям (Abbas et al., 2013) или могут испытывать локальные структурные перестройки (Krause et al., 2012; Bemporad et al., 2012). Эти изменения могут приводить к увеличению времени нахождения молекул с открытыми короткими аминокислотными участками полипептида (известными как «горячие точки» агрегации мономеров), склонными к агрегации и ассоциации с другими подобными участками полипептидной цепи белка. Это взаимодействие в последующем может приводить к образованию ненативных димеров и/или олигомеров. Данный процесс принято считать начальным этапом агрегации, и он часто описывается как зародышеобразование (нуклеация) (Singh et al., 2011; Rashno et al., 2017). «Горячие точки» агрегации могут располагаться в разных областях полипептидной цепочки белков; например, в моноклональных антителах подобные участки расположены в пределах CDR1 (Perchiacca et al., 2011), Fab и Fc (Wu et al., 2014), CH2 (Mehta et al., 2014; Skamris et al., 2016), CH3 (Brummitt et al., 2011(a)). Нарушения структуры белков могут быть вызваны определенными условиями раствора, такими как более низкий pH (Raimondi et al., 2011), присутствие органического растворителя (Steckmann et al., 2012). Следовательно, начальная скорость нуклеации этих агрегатов может коррелировать с конформационной стабильностью белка (Mehta et al., 2014; Austerberry et al., 2017; Galm et al., 2017).

Ненативные белковые олигомеры можно рассматривать как начальное ядро агрегации (ядро нуклеации) (Buchanan et al., 2013; Arosio et al., 2012, Arosio et al., 2013). Размер олигомеров может варьироваться от димеров (Matsumura et al., 2011; Kim et al., 2013(a); Angelani et al., 2014), тримеров (Matsumura et al., 2011) до нескольких мономеров (Lee et al., 2011), вплоть до 10 и более мономеров (Zhai et al., 2012). Олигомеры также могут образовываться посредством реакций межмолекулярного сшивания, таких как образование дисульфидной связи, что может способствовать физической агрегации белков (Cabra et al., 2008). Для агрегации белков, вызванной структурными перестройками или разворачиванием, мономер можно рассматривать как ключевой промежуточный продукт нуклеации, как

показано для многих белков (Andrews, Roberts, 2007(b); Kashchiev et al., 2013; Selivanova et al., 2014; Fazeli et al., 2014).

Белки представляют собой заряженные амфифильные полимеры и могут легко и естественно самоассоциироваться в обратимые олигомеры разных размеров, в зависимости от тенденции ассоциации, концентрации и других условий раствора (Silvers, Myers, 2013; Liu et al., 2013(a)). Было показано, что многие белки образуют обратимые олигомеры (Esfandiary et al., 2013; Esfandiary et al., 2015). Хотя многие типы слабых белок-белковых взаимодействий могут быть вовлечены в процесс самоассоциации белков, электростатические взаимодействия являются основной силой данного процесса (Li et al., 2012; Esfandiary et al., 2015; Arora et al., 2016). Электростатические взаимодействия могут приводить к образованию обратимых нативных димеров, тримеров, олигомеров или их смеси (Li et al., 2012; Arora et al., 2016), а также ненативных олигомеров, способных к деолигомеризции (Arosio et al., 2013). Размер олигомеров или кластеров регулируется, предположительно, комбинацией дальнодействующих электростатических сил отталкивания и сил притяжения ближнего действия (Stradner et al., 2004; Cardinaux et al., 2011; Godfrin et al., 2013).

Очевидно, что электростатические взаимодействия могут способствовать агрегации белков напрямую, либо посредством снижения силы других типов белок-белковых взаимодействий (Ghadami et al., 2011; Brunsteiner et al., 2013; Esfandiary et al., 2013; Arzensek et al., 2015). Другие типы взаимодействий, участвующих в процессе начальной агрегации (олигомеризации) белка, могут включать гидрофобные взаимодействия (Esfandiary et al., 2013; Arzensek et al., 2015; Pindrus et al., 2015; Galm et al., 2017), водородные связи (Fitzpatrick et al., 2011; Meliga et al., 2013) и/или силы Ван-дер-Ваальса (Brunsteiner et al., 2013; Meliga et al., 2013; Arzensek et al., 2015). Множественность белок-белковых взаимодействий усложняет интерпретацию доминирующих движущих сил агрегации белков. В то время как некоторые исследования предполагают, что доминирующей силой агрегации белков являются гидрофобные взаимодействия (Kumar et al., 2011; Ramakrishna et al., 2012; Buchanan et al., 2013; Tu, Raleigh, 2013), другие указывают на то, что гидрофобные взаимодействия не являются основными движущими силами этого процесса (Zhou et al., 2014;

Esfandiary et al., 2013). Вероятно, что доминирующая движущая сила агрегации белков зависит от структуры белка, состава раствора и других экспериментальных условий. Следовательно, на скорость нуклеации могут не влиять нативные белок-белковые взаимодействия (Arosio et al., 2013; Kalonia et al., 2016).

Белковые взаимодействия, в свою очередь, обычно зависят от концентрации белковых молекул. Увеличение концентрации белка по своей сути уменьшает среднее межбелковое расстояние, способствуя ассоциации мономеров в олигомеры или кластеры. Зависимая от концентрации обратимая самоассоциация наблюдалась для ряда белков, в частности для mAb (Esfandiary et al., 2013; Esfandiary et al., 2015; Yearley et al., 2014; Wei et al., 2015). Размер белковых олигомеров или кластеров может варьироваться от димеров до мультимеров (например, декамеров) (Lilyestrom et al., 2013) и далее частицы могут значительно увеличиваться в размерах (например,> 100 нм) (Cardinaux et al., 2011; Johnston et al., 2012; Borwankar et al., 2013).

Короткодействующие белок-белковые взаимодействия (например, взаимодействия CH-π и диполь-дипольные или более высокие мультипольные взаимодействия) при низкой концентрации могут стать доминирующими при высокой концентрации, и было высказано предположение, что они приводят к более быстрой нуклеации белка из-за уменьшенного расстояния между молекулами (Ota et al., 2016). Поэтому, неудивительно, что повышенная скорость или тенденция к агрегации может наблюдаться при более высокой концентрации белка, что продемонстрировано в различных диапазонах концентраций белка (Selivanova et al., 2014; Owczarz, Arosio, 2013; Nemergut et al., 2017; Schon et al., 2017). С другой стороны, агрегация, не зависящая от концентрации белка, может наблюдаться в том случае, если в агрегации преобладает адсорбция на объемных поверхностях, таких как границы раздела воздух-вода или твердое тело-жидкость (Bee et al., 2009; Bee et al., 2010).

1.1.4.2. Экспоненциальный рост и фаза насыщения

Начальные олигомеры, обратимые или необратимые, могут расти в более крупные агрегаты. Совокупный рост может происходить с помощью нескольких механизмов – например, за счет добавления мономеров к сформированному ядру

нуклеации или цепной полимеризации (Andrews, Roberts, 2007(b); Barnett et al., 2015; Wang, Roberts, 2018), взаимодействий агрегат-агрегат (кластер-кластер) или конденсации (Lee et al., 2011; Arosio et al., 2013; Sahin et al., 2016), либо вследствие сочетания данных факторов (Li et al., 2010; Nicoud et al., 2014).

Экспоненциальный рост, как и зародышеобразование, потенциально может контролироваться конформационной стабильностью белка (Borzova et al., 2015; Nicoud et al., 2014) и/или коллоидной стабильностью (белок-белковые взаимодействия) (Kim et al., 2013(a); Neergaard et al., 2014; Kalonia et al., 2016). Фактически, существует несколько типов «стабильности», и они могут коррелировать, а могут и не коррелировать друг с другом. Повышение конформационной стабильности белка может сопровождаться увеличением тенденции к агрегации из-за снижения коллоидной стабильности (Wang et al., 2017(b)). Точно так же снижение конформационной стабильности белка может приводить к снижению скорости роста агрегатов из-за повышенного межмолекулярного электростатического отталкивания (Austerberry et al., 2017).

Известно, что более гидрофобный белок имеет более высокую тенденцию к агрегации (Barz, Urbanc, 2014). Гидрофобные или дальнодействующие электростатические взаимодействия могут определять процесс агрегации, который, в свою очередь, зависит от структуры самого белка, а также факторов окружающей среды, таких как концентрация белка, pH и ионная сила (Kumar et al., 2011). Следовательно, трудно предсказать скорость агрегации белков на основании их молекулярных характеристик (Delahaije et al., 2015; Meric et al., 2017).

Экспоненциальный рост часто является нелинейным во времени процессом, особенно в случае образования амилоидных агрегатов. В этом случае экспоненциальный рост происходит из-за зависящего от времени увеличения количества ядер нуклеации. Таким образом, агрегация белков описывается как процесс второго или более высокого порядка (Kayser et al., 2011; Saluja et al., 2014). Многие исследования показали, что добавление агрегатов или фибрилл в качестве затравки («seeds») укорачивает фазу зародышеобразования (Yoshimura et al., 2012; Sabate et al., 2012; Fazeli et al., 2014) или усиливает образование фибрилл (Brych et al., 2010; Sabate et al., 2010; Buell et al., 2014; Gomes et al., 2018). С другой стороны,

агрегация некоторых белков не зависит от концентрации и не изменяется в присутствии добавленных «seeds» в качестве затравки агрегатов (Sabate et al., 2012; Oliva et al., 2015; Blancas-Mejia et al., 2015). В некоторых случаях увеличение концентрации белка может даже снизить скорость агрегации из-за самостабилизации (Kim et al., 2014(a); Kim et al., 2014(b); Austerberry et al., 2017).

По мере увеличения размера белковые агрегаты могут в конечном итоге стать нерастворимыми. Нерастворимым амилоидным агрегатам, как правило, свойственно морфологическое разнообразие. Определенный тип морфологии может контролироваться относительным количеством гидрофобных или ароматических аминокислот (Scherzer-Attali et al., 2012; Barz, Urbanc, 2014; Ow, Dunstan, 2014). Следует отметить, что нерастворимые агрегаты белка со временем могут диссоциировать, по крайней мере частично, на растворимые агрегаты, как показано для частиц IgG1, диссоциирующих при встряхивании (Kiese et al., 2010).

В третьей фазе, или «фазе насыщения», фибриллы полностью сформированы и связываются друг с другом, образуя стабильные зрелые агрегаты различной морфологии, для амилоидных агрегатов как правило это фибриллы (Bhak et al., 2009).

1.1.5. Энергетический ландшафт сворачивания и агрегации белков

Во время сворачивания возникающий полипептид должен ориентироваться в сложном энергетическом ландшафте. В результате могут накапливаться неправильно свернутые молекулы, обнажающие гидрофобные аминокислотные остатки, и, таким образом, существует опасность образования потенциально токсичных агрегатов (Balchin et al., 2016).

Сворачивание «на пути» («On-pathway») может быть описано энергетическим ландшафтом, который, по сути, представляет собой энергию белка как функциональную характеристику всех его возможных конформационных состояний и на графике напоминает форму «воронки» (Onuchic et al., 1997). В процессе сворачивания белка «на пути», развернутая полипептидная цепь должна проходить через несколько промежуточных стадий сворачивания для того, чтобы приобрести нативное состояние (Рис. 3, левая половина графика) (Dill, Chan, 1997).

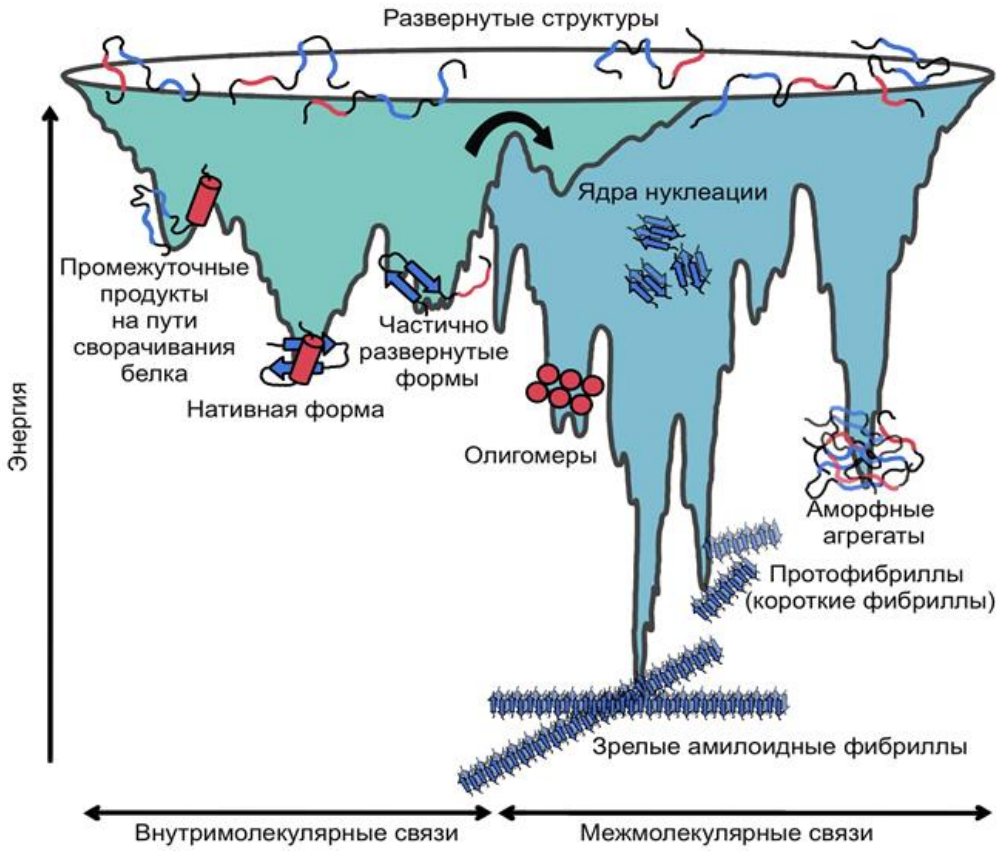


Рис. 3. Схематический энергетический ландшафт сворачивания и агрегации белков. На поверхности видно множество конформаций, «направляющихся» к нативному состоянию через образование внутримолекулярных контактов или к образованию амилоидных фибрилл через межмолекулярные контакты. Недавние исследования позволили локализовать различные «промежуточные» структуры на обоих путях (Vendruscolo, Dobson, 2005; Rochet, Lansbury, 2000), хотя подробные структурные модели для многих из этих видов все еще не доступны. Также на рисунке черной стрелкой показан предположительный энергетический барьер, который должны преодолеть структуры белка перед тем, как начать формировать агрегаты (для глобулярных белков это, как правило, высокие температуры, низкие значение pH, добавление денатуранта). Адаптировано по (Jahn et al., 2005; Balchin et al., 2016); воспроизведено из работы (Bobyleva et al., 2023a).

В случае сворачивания белка «вне пути» («Off-pathway») (Рис. 1 Б и Рис. 3 (правая половина графика)), форма графика энергетического ландшафта схожа с формой графика сворачивания «на пути», напоминающей «воронку», но из-за появления межмолекулярных взаимодействий и их конкуренции с внутримолекулярными взаимодействиями, повышается изрезанность графика

ландшафта агрегации (Gsponer, Vendruscolo, 2006). Объединяя оба процесса («на пути» и «вне пути») в один график, получаем общий график, определяющий энергетический статус молекул белков или комплекса молекул белков, объединенных в агрегаты (Рис. 3).

Энергетический ландшафт также описывает относительную стабильность различных состояний, таких как развернутое состояние, промежуточные соединения сворачивания, частично свернутые состояния, неправильно свернутые состояния, аморфные агрегаты, богатые β-слоями олигомеры или амилоидные фибриллы, а также разделяющие их энергетические барьеры (Hartl, Hayer-Hartl, 2009; Hartl et al., 2011; Balchin et al., 2016). Полипептидная цепь в развернутом состоянии на поверхности «воронки» графика энергетического ландшафта будет иметь более высокую степень энтропии и свободной энергии; во время процесса сворачивания количество конформационных состояний, то есть энтропия и свободная энергия, уменьшаются по направлению к состоянию, занимающему самый низкий абсолютный минимум энергии, обеспечивая необходимую конформационную стабильность свернутого состояния.

В случае фолдинга «на пути» это состояние представляет нативную конформацию белков (Hartl, Hayer-Hartl, 2009; Hartl et al., 2011; Balchin et al., 2016; Adamcik, Mezzenga, 2018). В случае сворачивания «вне пути» амилоидные фибриллы считаются наиболее стабильным термодинамическим состоянием, присутствующим в энергетическом ландшафте (Gazit, 2002; Jahn, Radford, 2008; Eichner, Radford, 2011; Baldwin et al., 2011; Buell et al., 2012; Tipping et al., 2015). Считается, что энергетический ландшафт амилоидных фибрилл может характеризоваться множеством пиков из-за различных морфологических конформаций амилоидных фибрилл.

Во время процесса сворачивания «на пути» и «вне пути» конкуренция между межмолекулярными и внутримолекулярными взаимодействиями играет ключевую роль. Чтобы предотвратить сворачивание «вне пути» эволюция предоставила живым системам стратегии уменьшения взаимодействий между различными молекулами на всем пути сворачивания белка до завершения процесса сворачивания. Одна из них – наличие молекулярных шаперонов во всех типах клеток для осуществления контроля

процесса сворачивания белков (Kim et al., 2013(b); Doyle et al., 2013; Saibil, 2013; Knowles et al., 2014). В режиме внутримолекулярных контактов, то есть в промежуточной области энергетического ландшафта, шапероны помогают сворачиванию отдельных полипептидных цепей в их нативное состояние, снижая энергетические барьеры, разделяющие промежуточные соединения сворачивания. Однако по мимо шаперонов существует множество других факторов, влияющих на агрегацию белка *in vitro* и *in vivo* о которых было сказано выше в п.1.3.

1.1.6. Амилоидная агрегация, особенности

Амилоидная агрегация – это частный случай агрегации белков. Известно, что основное свойство всех амилоидных агрегатов – это наличие преобладающей четвертичной кросс-β структуры с отдельными слоями, ориентированными параллельно главной оси роста фибрилл (Рис. 4 А) (Nelson et al., 2006; Sawaya et al., 2007; Eisenberg, Jucker, 2012; Adamcik, Mezzenga, 2018). Именно особенностью структуры определяются свойства амилоидных фибрилл, такие как высокая прочность, устойчивость к ферментативному расщеплению и низкая растворимость в большинстве растворителей. Наличие кросс-β структуры определяется методом рентгеновской дифракции (Рис. 4 Б). На рентгенограммах препаратов частично выровненных (ориентированных) амилоидных фибрилл дифракция рентгеновских лучей дает характерную дифракционную картину, которая состоит из двух дифракционных рефлексов, расположенных на взаимно перпендикулярных осях (Astbury et al., 1935; Eanes, Glenner, 1968; Makin, Serpell, 2005(a); Jahn et al., 2010). Первый тип дифракционных рефлексов, расположенных вертикально на дифракционной картине (меридиональное направление), соответствует периоду 4.7-4.8 Å. Этот период указывает на то, что полипептидные цепи расположены перпендикулярно оси фибриллы, и расстояние между ними 4.7-4.8 Å. Второй тип дифракционных рефлексов, расположенных по горизонтали дифракционной картины (экваториальное направление), соответствует периоду 10-11 Å. Данные рефлексы указывают на то, что полипептидные цепи организованы в β-листы, которые

находятся на расстоянии 10-11 Å друг от друга (Wille et al., 2009; Eisenberg, Jucker, 2012) (Рис. 4).

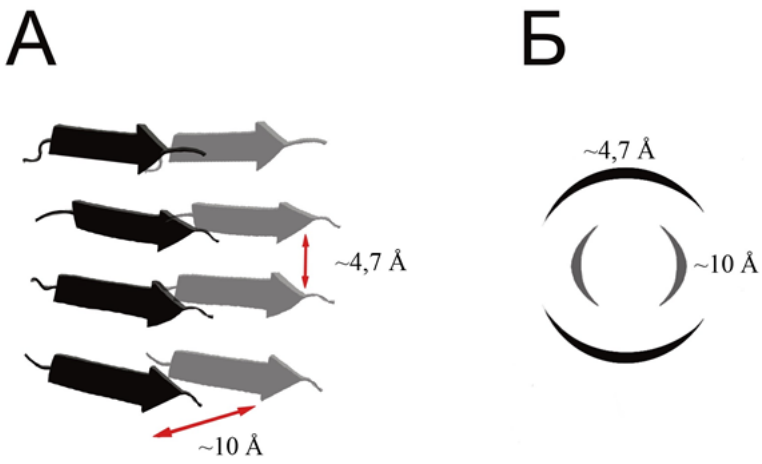


Рис. 4. Схематические изображения амилоидной кросс-β структуры (А) и картины рентгеновских лучей типичных амилоидных фибрилл (Б). Для амилоидных фибрилл известных белков рефлексы, расположенные по вертикали (меридиональное направление), соответствуют периоду 4.7-4.8 Å. Этот период указывает на то, что β-участки расположены перпендикулярно оси фибриллы, и расстояние между ними соответствует 4.7-4.8 Å. Рефлексы, расположенные по горизонтали дифракционной картины (экваториальное направление), соответствуют периоду 10-11 Å. Данные рефлексы указывают на расстояние между β-листами, которое равно 10-11 Å. Воспроизведено из работы (Bobyleva et al., 2023(a)), выполненной при участии автора диссертации.

Основное влияние на предложенную модель организации амилоидных фибрилл из β-листов оказали результаты рентгеноструктурного анализа, проведенные еще в 30-е годы XX века для ряда фибриллярных белков (фиброина, β-кератина, β-миозина, фибрина), а также для фибрилл из глобулярного денатурированного белка альбумина (Astbury et al., 1935; Pauling, Corey, 1953). Были получены сходные картины дифракции рентгеновских лучей. Согласно данным рентгеновской дифракции для фибриллярных белков и глобулярных денатурированных белков наблюдались характерные два экваториальных рефлекса 9.8 Ǻ (“side-chain spacing”) и 4.65 Ǻ (“backbone spacing”), а расстояние 3.4 Ǻ отражало среднюю длину аминокислотного остатка в направлении главной цепи. До появления термина кросс-β структура существовало понятие “pleated sheet” («складчатый лист») и “rippled sheet” («рифленный лист»). В таких терминах описывали конфигурацию полипептидных цепей (Pauling, Corey, 1953).

Амилоидные фибриллы обычно состоят из 2-6 протофиламентов, которые представляют собой фибриллы диаметром 2-5 нм. Протофиламенты могут быть связаны латерально или скручены вместе, образуя зрелые амилоидные фибриллы, которые на изображениях, полученных методами просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) или атомно-силовой микроскопии (АСМ), обычно выглядят как неразветвленные волокна диаметром несколько нанометров и длинной один или более микрометров (Adamcik, Mezzenga, 2012). Амилоидные фибриллы демонстрируют замечательные механические свойства, сравнимые с прочностью других биологических материалов и модулями Юнга порядка нескольких ГПа (Knowles, Buehler, 2011). Например, анализ механической характеристики амилоидных фибрилл инсулина методом АСМ в режиме спектроскопии показал, что фибриллы инсулина имели прочность 0.6 ± 0.4 ГПа, что сравнимо с прочностью такого материала как сталь, и модуль Юнга – 3.3 ± 0.4 ГПа, что сопоставимо по характеристикам с прочностными характеристиками шелка (Smith et al., 2006). Модули Юнга других амилоидных фибрилл, сформированных из патологических и непатологических амилоидных белков, имели значения модулей Юнга в диапазоне 2–4 ГПа (Adamcik et al., 2012).

Наличие общих свойств у амилоидных фибрилл, образованных из очень разных полипептидных последовательностей, привели к предположению, что амилоидные фибриллы представляют собой общую, широкодоступную, стабильную структуру белков и пептидов. Это противоречит представлению о том, что нативная структура белка напрямую зависит от аминокислотной последовательности. Таким образом, возникает вопрос о природе взаимодействий, которые стабилизируют амилоидные фибриллы. Экспериментально было показано, что наиболее важными параметрами, кодирующими внутреннюю механическую прочность амилоидных фибрилл, являются межмолекулярные силы между β-листами и β-участками (Knowles et al., 2007), в то время как теоретическая работа показала, что ключевым моментом для механических свойств амилоидных фибрилл является сильное упорядочение водородных связей, при котором водородные связи между β-нитями действуют как химический клей между слоями, увеличивая механическую стабильность фибрилл (Keten, Buehler, 2008). Действительно, измерение механических свойств олигомеров,

протофибрилл и зрелых фибрилл, образующихся в процессе фибрилляции α-синуклеина или Aβ (1–42), выявило постепенное увеличение модуля Юнга по мере того, как увеличивается содержание β-складчатой структуры (Ruggeri et al., 2015).

1.1.7. Полиморфизм амилоидных агрегатов

Структура амилоидных фибрилл демонстрирует поразительное разнообразие. Это прямое следствие различных возможных трехмерных расположений протофиламентов, обычно называемое структурным полиморфизмом амилоидных фибрилл. Различное количество протофиламентов, образующих амилоидные фибриллы, является источником их структурного полиморфизма (Jiménez et al., 2002; Meinhardt et al., 2009). Разная пространственная ориентация протофиламентов или их структурные изменения также могут быть причиной большого полиморфизма Aβ (1–42) (Petkova et al., 2002; Petkova et al., 2005; Lührs et al., 2005; Sachse et al., 2008; Schmidt et al., 2009; Colletier et al., 2011; Gremer et al., 2017). Поэтому словосочетание молекулярный полиморфизм амилоидных фибрилл используется для описания различных структур протофиламентов. Пример полиморфизма продемонстрирован для различных типов фибрилл инсулина и Aβ (1-40) методом криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) (Jiménez et al., 2002; Meinhardt et al., 2009). Метод твердотельного ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) был использован для исследования молекулярного полиморфизма фибрилл: Aβ (1–40), (Petkova et al., 2002; Petkova et al., 2005; Lührs et al., 2005), α-синуклеина (Heise et al., 2005), PrP (Toyama et al., 2007) и фрагмента IAPP человека (Madine et al., 2008). Крио-ЭМ также использовалась для определения структуры протофиламентов и фибрилл Aβ (1–40) (Sachse et al., 2008; Schmidt et al., 2009) и Aβ (1–42) (Gremer et al., 2017). В случае Aβ (1–40), который исследовали методом твердотельной ЯМР-спектроскопии в сочетании с молекулярно-динамическим моделированием (Petkova et al., 2002; Petkova et al., 2005) и Aβ (1–42), который исследовали комбинацией методов твердотельной ЯМР спектроскопии и крио-ЭМ (Lührs et al., 2005), была предложена структурная модель укладки. Данная модель описывала U-образную пептидную складку внутри одного протофиламента, где протофиламент состоит из двух

уложенных друг на друга параллельных β-листов, которые сохраняются вдоль всей оси фибрилл. Другая модель, в которой две противоположно направленные полипептидные цепи образуют область ядра β-слоя и ограничиваются N-концами пептида в пределах одного протофиламента, была предложена на основе реконструкции крио-ЭМ изображений (Sachse et al., 2008). Совсем недавно структура фибрилл Aβ (1–42) была описана методом крио-ЭМ в сочетании с ЯМР-спектроскопией. Результаты данного исследования показывают, что одна полипептидная цепь в одном протофиламенте складывается в LS-образную форму, в которой N-конец имеет L-образную форму, а C конец имеет S-образную форму (Gremer et al., 2017). Структура тау-филаментов также была описана методом крио-ЭМ. Было показано, что парные спиральные и прямые филаменты различаются по упаковке протофиламентов (Fitzpatrick et al., 2017). Крио-ЭМ и ЯМР с вращением под «магическим» углом (magic-angle spinning (MAS) = 54.74°) были использованы для изучения структуры амилоидных фибрилл, образованных фрагментом из 11 остатков белка транстиретина [TTR (105–115)], при этом результаты показывают процесс сборки амилоидных фибрилл и их полиморфизм начиная от первичной пептидной последовательности (Fitzpatrick et al., 2017).

Амилоидные фибриллы из β-амилоидных пептидов Aβ (1–40) и Aβ (1–42), которые участвуют в болезни Альцгеймера, возможно, являются наиболее широко охарактеризованными примерами молекулярного и структурного полиморфизма амилоидов (Fändrich et al., 2011; Tycko, 2014; Tycko, 2015; Eisenberg, Sawaya, 2017).

Недавно сообщалось, что структурный полиморфизм в значительной степени проявляется в амилоиде β-эндорфина человека. Подробная структурная характеристика функциональных амилоидов человека была проведена в деталях, объединив твердотельную ЯМР-спектроскопию и ПЭМ, и результаты показали, что амилоидные фибриллы, собранные в различных условиях, почти идентичны на атомном уровне и не показывают различий в молекулярном полиморфизме, однако на мезоскопическом уровне они обнаруживают очень богатый и разнообразный полиморфизм (Seuring et al., 2017).

Подавляющее большинство информации, собранной о структурном полиморфизме амилоидных фибрилл, было получено на фибриллах, образованных *in*

vitro, и, таким образом, она не может быть прямо и полностью применима к патологическим амилоидам. Поэтому очень важно провести сопоставимые исследования полиморфизма амилоида на фибриллах, полученных непосредственно из образцов *in vivo*. Сообщалось, что амилоидные фибриллы разных белков человека показали структурный полиморфизм, сопоставимый с наблюдаемым *in vitro*, что позволяет предположить, что самосборка полипептидных цепей *in vivo* следует аналогичным химическим и физическим принципам сборки амилоидных фибрилл, происходящей *in vitro* (Annamalai et al., 2016). Кроме того, та же исследовательская группа сообщила, что амилоидные фибриллы из разных тканей или органов одного пациента или больного животного имеют одинаковую морфологию, что позволяет предположить, что пути неправильного свертывания белков следуют одним и тем же правилам независимо от того, где внутри тела фибриллы образуются или накапливаются (Annamalai et al., 2017).

1.1.8. Методы изучения амилоидной агрегации белков

Для изучения амилоидной агрегации применяется большое количество биофизических и биохимических методов анализа (Табл. 1). Выше (п.1.7.) отчасти описаны методы, используемые для изучения полиморфизма амилоидных фибрилл *in vitro*. Там же указана основная проблема методов структурного анализа, которая связана с отсутствием методов изучения процесса амилоидогенеза *in vivo*. И хотя был получен ряд данных о том, что формирование амилоидных агрегатов *in vitro* и *in vivo* происходит по схожим механизмам (Annamalai et al., 2016; Annamalai et al., 2017), тем не менее, экстраполяция данных, полученных *in vitro*, на живые организмы является основным ограничением структурных методов анализа.

Представленные в таблице 1 методы можно разделить на методы, которые чаще применяют для диагностики амилоидозов в тканях организма и методы для исследования динамики агрегации белка *in vitro*, а также для изучения структурно-морфологических характеристик амилоидных фибрилл и промежуточных продуктов амилоидной агрегации *in vitro*.

Несмотря на большое количество методов, использующихся для исследования амилоидных агрегатов и амилоидных отложений, все они имеют ряд ограничений при исследовании амилоидной агрегации. Поэтому, для исследования белковых агрегатов амилоидной природы применяют комплексный методологический подход. Такой подход минимизирует недостатки каждого отдельного метода и способствует получению наиболее полной картины процесса агрегации исследуемого объекта. Далее в таблице 1 приведены методы исследования амилоидов с указанием их основных недостатков.

Таблица 1. Методы исследования амилоидных агрегатов (мод. из Yakupova et al., 2019)

Наименование метода	**Характеристики и особенности**	**Ограничения**
Иммуногистохимический и иммунохимический методы анализа	Иммуногистохимические методы применяют для визуализации и белковых агрегатов, и включений, обнаруживаемых в срезах тканей больных амилоидозом (Galvin, 2003). Этот метод широко доступен и легко применим в большинстве патологоанатомических лабораторий (Flodrova et al., 2018). Иммуногистохимия использует антитела для обнаружения амилоидов. Применяют моноклональные антитела, нацеленные на амилоидогенные предшественники (Strege et al., 1998; De Genst et al., 2014), и амилоидные фибриллы (Strege et al., 1998; Higaki et al., 2016). Существуют также конформационно-специфические антитела, которые распознают растворимые олигомеры (Kayed, Glabe, 2006; Murakami et al., 2016) или фибриллы многих типов амилоидных белков (Kayed et al., 2007; Sarsoza et al., 2007; Dumoulin, Dobson, 2004; De Genst, Dobson, 2012). Небольшой биспецифический радиолиганд на основе антител, способный преодолевать гематоэнцефалический барьер, может связываться с внутримозговым Aβ, позволяя его визуализировать *in vivo* (Fang et al., 2018). Сюда также входят люминесцентные конъюгированные олиготиофены, как уникальный класс амилоидных красителей (Aslund et al., 2009; Psonka-Antonczyk et al., 2016; Rasmussen et al., 2017).	Коммерчески доступные антитела к различным белкам часто неоптимальны для идентификации тех же белков в конформации амилоидных фибрилл (Westermark et al., 2018). Это вызвано тем, что белки принимают различные конформации и различные модификации во время образования фибрилл, такие как N- или C-концевое укорочение (Westermark et al., 2018). Для преодоления этого ограничения были разработаны новые конформационно-специфические антитела (Kayed, Glabe, 2006; Kayed et al., 2007; Sarsoza et al., 2007; Murakami et al., 2016). В настоящее время они еще не нашли широкого применения и требуют дополнительной проверки. Новые методы, в которых используются люминесцентные конъюгированные олиготиофены (Aslund et al., 2009; Psonka-Antonczyk et al., 2016; Rasmussen et al., 2017) и радиолиганды на основе антител (Fang et al., 2018), также нуждаются в дальнейшем тестировании. Эти новые разработки в основном используются для обнаружения фибрилл Aβ и иногда фибрилл α-синуклеина (Kayed et al., 2007).
Окрашивание	Связывание КК с амилоидами *in vitro* вызывает характерное увеличение поглощения КК, приводящее к красному смещению его пика	Анализ научных данных показывает, что только одного окрашивания КК недостаточно для подтверждения

Конго красным	поглощения от 490 до 512 нм и присутствию уникального плечевого пика приблизительно при 540 нм (Meehan et al., 2004; Frid et al., 2007). Амилоид выявляют по повышенной оптической анизотропии после связывания КК (Linke, 2006), что называют «яблочно-зеленым двойным лучепреломлением» (под скрещенными поляризаторами) (Howie, Owen-Casey, 2010). «Яблочно-зеленое двойное лучепреломление» используется для обнаружения отложений амилоида в тканях и в исследованиях амилоидов *in vitro* (Elghetany, Saleem, 1988; Linke, 2006; Howie, Owen-Casey, 2010). Сегодня этот метод широко используется в гистопатологических лабораториях, поскольку он прост и рентабелен. Существуют различные модификации метода, в том числе флуоресцентный анализ с использованием КК.	амилоидной природы белковых агрегатов *in vitro* или для диагностики амилоидоза в срезах тканей. Имеется также достаточное количество доказательств неспецифического связывания КК при определении амилоидной природы белковых агрегатов.
Окрашивание Тиофлавином T/S	Флуоресценция тиофлавина является классическим методом обнаружения и анализа амилоидов в образцах тканей (Westermark et al., 1999). ТТ избирательно локализуется в амилоидных отложениях, после чего демонстрирует резкое увеличение яркости флуоресценции (Westermark et al., 1999). Это окрашивание также используется в исследованиях *in vitro* (Persichilli et al., 2011; Lindberg et al., 2017). При связывании с амилоидными фибриллами ТТ дает сильный сигнал флуоресценции (приблизительно 482 нм) при возбуждении при 450 нм (Naiki et al., 1989). Интенсивность флуоресценции линейно зависит от массы амилоидных фибрилл (например, от количества доступных сайтов связывания). По увеличению массы фибрилл рассчитывают концентрацию амилоида (Cohen et al., 2013). Снижение интенсивности эмиссии ТТ часто интерпретируют как показатель ингибирования роста фибрилл (Groenning et al., 2007).	Окрашивание тиофлавином T/S легко выполнить, но потребность во флуоресцентной микроскопии ограничивает полезность этого метода окрашивания (Westermark et al., 1999). Другие ткани, такие как хрящи, эластические волокна и мукополисахариды, также могут быть окрашены ТТ (Vassar, Culling, 1959; Kelényi, 1967; LeVine, 1995). Иногда, даже при субстехиометрическом соотношении краситель/мономер, ТТ подвергается существенному самотушению, что приводит к нелинейной связи между его свойствами связывания и испускания (Lindberg et al., 2017). В связи с этим, без предварительных экспериментов использование данного метода для изучения кинетики образования фибрилл проблематично.

		Флуоресценция ТТ обычно не является подходящим инструментом для обнаружения олигомерных интермедиатов во время роста амилоидных фибрилл (Persichilli et al., 2011). Тем не менее, этот краситель связывается с некоторыми олигомерами (Lindgren et al., 2005; Grudzielanek et al., 2006; Maezawa et al., 2008).
КД	Этот метод используется для определения вторичной структуры белков и пептидов в амилоидных агрегатах (McCubbin et al., 1988; Abe, Nakanishi, 2003). Этот метод основан на дифференциальном поглощении лево- и правополяризованного света с круговой поляризацией хиральными молекулами в растворе (Scarlett et al., 2015).	Этот метод можно использовать только для определения изменений вторичной структуры *in vitro*, и он чувствителен к ароматическим соединениям, присутствующим в образце.
Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье (ИК-Фурье)	ИК-Фурье представляет собой спектроскопию поглощения, в которой обнаруживаются переходы, возникающие из-за колебательных мод связей с участием гетероатомов (Smith, 2011; Stuard, 1997). Этот метод можно использовать для изучения амилоидных агрегатов (Bouchard et al., 2000; Zou et al., 2013). Наличие и относительную распространенность структуры β-листов в пептидах и белках можно оценить методом инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (Calero, Gasset, 2005). Существуют методики получения спектров белков в любом физическом состоянии, включая кристаллы, порошки, тонкие пленки и водные растворы, а также мембраносвязанных белков (Calero, Gasset, 2005).	Имеются водные помехи (Calero, Gasset, 2005). Необходима высокая концентрация белка (Calero, Gasset, 2005). Этот метод может быть использован только в исследованиях *in vitro*.
ЯМР	Молекулярные и супрамолекулярные структуры амилоидных фибрилл можно исследовать с использованием различных методов	Этот метод дорог и сложен (Karamanos et al., 2015). Анализ ограничен небольшими белками (Karamanos et al.,

	твердотельного ЯМР (Lansbury et al., 1995; Burkoth et al., 2000; Balbach et al., 2002; Antzutkin et al., 2002; Jaroniec et al., 2004; Tycko, 2004; Aimoto et al., 2010; Tycko, 2011; Scheidt et al., 2011).	2015). Его можно использовать только в исследованиях *in vitro*.
Рентгеновская дифракция	Метод используется для изучения структур нерастворимых амилоидных волокон (Makin, Serpell, 2005(a); Morris, Serpell, 2012). Данным методом можно выявить наличие поперечной структуры β-листа путем обнаружения экваториальных рефлексов 4-5 Å и осевых рефлексов 10-12 Å, которые соответствуют расстояниям между участками β-цепей и β-листами соответственно (Inouye et al., 1993; Sunde et al., 1997).	Этот метод можно использовать только тогда, когда образец находится в кристаллизованной форме. Этот метод трудно использовать для изучения интермедиатов на начальных стадиях агрегации. Этот метод может быть использован только в исследованиях *in vitro*.
СМУРР	СМУРР является мощным методом для характеристики структурных изменений в амилоидных фибриллах (Vestergaard et al., 2007; Oliveira et al., 2009; Chatani et al., 2015; Dahal et al., 2017). СМУРР может быть использовано для исследования структуры, фолдинга и конформационной динамики глобулярных белков, в том числе мультидоменных и мультисубъединичных белков (Jacques, Trewhella, 2010).	Эта техника дорогая и сложная. Этот метод может быть использован только в исследованиях *in vitro*.
Крио-ЭМ	Технология криоэлектронной микроскопии позволяет с высоким разрешением (менее 5 Å) определять атомные структуры амилоидных фибрилл *in vitro* (Gremer et al., 2017; Fitzpatrick et al., 2017; Li et al., 2018). Также этой методикой можно исследовать амилоиды, выделенные из тканей (*ex vivo*) (Jiménez et al., 2001; Fitzpatrick et al., 2017).	Изучение аморфных агрегатов, или агрегатов с нерегулярной структурой амилоида этим методом затруднено или невозможно. Процесс пробоподготовки очень сложен.
ПЭМ	Этот метод можно использовать для исследования размера и морфологии белковых агрегатов в растворе *in vitro*. Поскольку амилоидные фибриллы обладают уникальными электронно-	В некоторых случаях этот метод не подходит для диагностики амилоидоза. Например, иммунотактоидная гломерулопатия и фибриллярный гломерулонефрит могут

	микроскопическими характеристиками (Merlini, Bellotti, 2003), ПЭМ также используется в США и других странах при анализе биоптатов почек. Для повышения диагностической значимости метода может быть использована ПЭМ с применением иммунозолота, или методика, сочетающая иммуногистохимию с электронной микроскопией (Herrera et al., 1986).	быть неправильно диагностированы как иммуноглобулиновый амилоидоз легких и тяжелых цепей (Sethi et al., 2010).
АСМ	Этот метод можно использовать для исследования размера и морфологии белковых агрегатов в растворе (Crespo et al., 2016). Этот метод также используется для исследования свойств амилоидных фибрилл, таких как механическая прочность и модуль Юнга (Adamcik, Mezzenga, 2012).	При использовании контактного режима высокие силы сдвига могут вызвать повреждение фибрилл (Gosal et al., 2006). Для режима постукивания на воздухе требуется «высушенный» образец, поэтому этим методом нельзя напрямую исследовать отростки фибрилл; в результате могут наблюдаться потенциальные артефакты обезвоживания (например, кристаллы соли, повреждение фибрилл), а степень гидратации не может контролироваться (Gosal et al., 2006). Для режима постукивания в жидкости текущая скорость сканирования слишком низкая для визуализации быстрых процессов, и часто образцы (фибриллы) должны быть хорошо прикреплены к поверхности. Другие методы атомно-силовой микроскопии, включая использование опорных поверхностей (например, липидных бислоев), часто трудно использовать (Gosal et al., 2006).
Динамическое рассеян	ДРС – это метод лазерного рассеяния, способный к анализу распределения размеров диффундирующих частиц в диапазоне размеров от нанометров до микрометров (Berne, Pecora, 1977).	Измеряется гидродинамический радиус частицы, но он может отличаться от истинного радиуса. В результате определение реальных размеров и формы макромолекул затруднено.

ие света (ДРС)	Возможность разрешать мультимодальные распределения размеров и проводить измерения абсолютного размера делает ДРС света мощным методом для систем с гетерогенными видами. Его используют для количественного изучения образования фибрилл в ряде систем из разных белков (Lomakin et al., 1996; Georgalis et al., 1998; Hill et al., 2009; Streets et al., 2013).	
Флуоресцентная корреляционная спектроскопия	Этот высокочувствительный аналитический метод используется для измерения динамических молекулярных параметров, таких как время диффузии (по которому можно рассчитать размер частиц), конформация и концентрация флуоресцентных молекул (Tjernberg et al., 1999; Sahoo et al., 2016). Метод оказался особенно эффективным для характеристики распределения частиц по размерам в молекулярных ассоциациях (например, образование димеров/мультимеров и фибрилл) как в хорошо функционирующих термодинамически уравновешенных системах *in vitro*, так и в более сложных средах *in vivo*. Таким образом, флуоресцентная корреляционная спектроскопия может быть использована в качестве высокочувствительного и специфического конкурентного анализа для выявления потенциальных ингибиторов образования фибрилл (Tjernberg et al., 1999).	Этот метод требует использования флуоресцентных меток для маркировки образцов амилоида. Это делает его сложным и редко используемым.
Гель фильтрационный анализ	Этот метод используется для разделения широкого спектра частиц разного размера путем пропускания раствора, содержащего частицы, через частично проницаемую гелевую среду. Он используется для анализа промежуточных продуктов (в основном олигомеров) и для идентификации растворимых агрегатов в тканях (Erlich et al., 2010; Esparza et al., 2016).	Невозможно исследовать агрегаты с высокой молекулярной массой. Этот метод неэффективен для масштабирования, поскольку эксклюзионная хроматография плохо работает с большими объемами жидкости.

Аналитическое ультрацентрифугирование	Этот метод основан на анализе скорости седиментации, используемой для определения размера, формы и гидродинамического поведения растворимых макромолекул, включая амилоидные фибриллы, а также для изучения процесса амилоидной агрегации (Schuck, 2000; Mok, Howlett, 2006; Pham et al., 2011; Mok et al., 2015).	Этот метод используется только для конкретных задач.

1.2. РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ АМИЛОИДНЫХ БЕЛКОВ

1.2.1. Амилоидные фибриллы при различных заболеваниях

Проблема амилоидной агрегации вызывает интерес прежде всего в связи с известными патологиями, поскольку амилоидные агрегаты обнаружены в различных органах и тканях при заболеваниях человека и животных (Chiti, Dobson, 2017). Амилоидозы представляют собой редкую и гетерогенную группу заболеваний, характеризующихся отложением аномально свернутых белков в тканях, что в конечном итоге приводит к повреждению органов (Ow, Dunstan, 2014). Отложения в основном внеклеточные и идентифицируются в основном с использованием красителя КК. Текущая классификация амилоида в медицинской практике основана на типе амилоидного белка предшественника. На сегодняшний день более 36 белков идентифицированы как амилоидогенные для человека (Picken, 2020).

Склонность к образованию амилоидных агрегатов включает в себя комбинацию нескольких факторов, среди которых: увеличение концентрации белков с приобретенной или наследственной мутацией, также увеличение концентрации белков дикого типа с присущей им склонностью к неправильной укладке, или накопление амилоидогенных протеолитических фрагментов белков (Chiti, Dobson, 2017; Nuvolone, Merlini, 2017; Misra et al., 2019).

Процесс сворачивания белков как правило находится под защитой систем контроля качества белков, которые работают на клеточном и внеклеточном уровнях и быстро устраняют неправильно свернутые белки. Амилоидогенез (образование амилоидных агрегатов в организме) происходит только тогда, когда эти системы контроля качества перегружены или их возможности снижаются из-за старения организма и накопления мутаций. В процессе амилоидогенеза непрерывно образуются неправильно свернутые белки, которые в дальнейшем агрегируют в виде протофибрилл и, в конечном счете, зрелых фибрилл. Важно отметить, что амилоидная токсичность наблюдается у олигомеров, протофибрилл и даже у зрелых фибрилл. Хотя механизмы данной токсичности, особенно для зрелых фибрилл

изучены недостаточно. В процессе фибриллогенеза амилоидный компонент, аполипопротеин Е и гликозаминогликаны способствуют образованию отложений амилоида. Эти компоненты обнаружены во всех амилоидных отложениях (Chiti, Dobson, 2017; Nuvolone, Merlini, 2017; Misra et al., 2019).

1.2.2. Классификация амилоидозов

В соответствии с рекомендациями Международного общества амилоидоза (*англ.* – International Society of Amyloidosis (ISA)) в медицине термин «амилоид» применяется в основном к внеклеточным отложениям фибриллярного белка, которые распознаются по их связыванию с КК и по их желто-зеленому двойному лучепреломлению в поляризованном свете (Benson et al., 2018).

Современная классификация амилоидозов в медицинской практике основана на типе амилоидного белка. Амилоид обозначается буквой А (от амилоида), за которой следует аббревиатура типа белка: AL (амилоид, образованный из легкой цепи иммуноглобулина), ATTR (амилоид, образованный из белка транстиретина) и т.д. В таблице 2 приведен сокращенный список белков амилоидных фибрилл и их предшественников у человека. Варианты амилоидных белков, связанные с наследственными амилоидозами, называются в соответствии с заменой аминокислоты; таким образом, указывается название задействованной аминокислоты и положение замены: например, ATTRV30M (валин заменен метионином). Хотя ISA рекомендует однобуквенный код аминокислоты, в литературе часто используется трехбуквенное обозначение аминокислоты в соответствии с рекомендациями Рабочей группы по описанию вариантов последовательности Общества вариаций генома человека. Название «наследственный», а не «семейный» рекомендуется ISA для амилоидных заболеваний, связанных с мутантными белками. Более того, ISA рекомендует «наследственный ATTRv», где «v» означает вариант, а не «m» – мутант; однако иногда ATTRm (или hATTR для наследственного ATTR) можно встретить в литературе как альтернативу ATTRv (Picken, 2020).

Амилоидные отложения могут быть локальными или системными, при этом отложения присутствуют в одном органе в первом случае и поражают различные органы и ткани по всему телу во втором. Исключительно локализованные отложения амилоида связаны по крайней мере с 24 типами белков, в то время как по крайней мере 14 типов белков (и многие другие варианты) последовательно связаны с системным амилоидозом. Интересно, однако, что по крайней мере 4 белка (AL/AH, амилоидоз, вызванный легкой или тяжелой цепью иммуноглобулина, соответственно, ATTR, а также амилоидоз, вызванный β2-микроглобулином, Aβ2M) могут вызывать как локальные, так и системные амилоидозы (Buxbaum et al., 2022).

Клинические проявления амилоидозов гетерогенны и могут зависеть от генетических факторов и факторов окружающей среды. Хотя определенные фенотипы обычно могут быть связаны с определенными типами амилоида, существует значительное клиническое совпадение, и, следовательно, классификация амилоидозов только по клиническим признакам не рекомендуется.

Таблица 2. Классификация амилоидозов (Buxbaum et al., 2022).

Фибриллярный белок	Белок предшественник	Системный (S) или локализованный (L)	Приобретённый (A) или наследственный (H)	Локализация
AL, AH	Иммуноглобулин лёгкие (L) или тяжёлые цепи (H)	S,L	A,H*	Все органы кроме ЦНС**
AA	(Apo) сывороточный амилоид A	S	A	Все органы кроме ПНС# и ЦНС
ALECT2	Фактор-2 хемотаксиса лейкоцитов	S	A	Преимущественно почки, а также печень
ATTRv	Транстиретин, варианты (v)	S	H	Сердце, ПНС, ВНС##, глаза, лептоменикс,
ATTR	Транстиретин, дикий тип	S	A	Преимущественно сердце, лёгкие, связки, синовиальное влагалище сухожилия
Аполипопротеин AI	Аполипопротеин A I, варианты	S	H	Почки, сердце, печень, ПНС, яички, гортань (C-концевые варианты), кожа (C-концевые варианты)

Фибриллярный белок	Белок предшественник	Системный (S) или локализованный (L)	Приобретённый (A) или наследственный (H)	Локализация
Аполипопротеин AII	Аполипопротеин A II, варианты	S	H	Почки
Аполипопротеин AIV	Аполипопротеин A IV, дикий тип	S	A	Мозговой слой почки и системный амилоидоз
Аполипопротеин CII	Аполипопротеин C II, варианты	S	H	Почки
Аполипопротеин CIII	Аполипопротеин C III, варианты	S	H	Почки
AGel	варианты гелсолина	S	H	ПНС, роговица глаза, почки
ALys	Варианты лизоцима	S	H	Почки
ALECT2	Лейкоцитарный хемотаксический фактор-2	S	A	Преимущественно почки
AFib	Фибриноген α-цепь, варианты	S	H	Преимущественно почки
ACys	Варианты Цистатина C	S	H	ПНС, кожа
ABri	Варианты ABriPP	S	H	ЦНС
ADan[b]	ADanPP, варианты	L	H	ЦНС
Aβ	Aβ предшественник, дикий тип	L	A	ЦНС
	Aβ предшественник, варианты	L	H	
Aβ2Mv	вариант β2-микроглобулина	S	H	ВНС
Aβ2M	Дикий тип, ятрогенный (диализ)	S	A	Скелетные мышцы, место инъекции
AαSyn	α-Синуклеин	L	A	ЦНС
ASem1	Семеногелин 1, дикий тип	L	A	Семенные пузырьки
ATau	Tay белок	L	A	ЦНС

Фибриллярный белок	Белок предшественник	Системный (S) или локализованный (L)	Приобретённый (A) или наследственный (H)	Локализация
APrP	PrP, дикий тип	L	A	Болезнь Крейтцфельдта-Якоба, фатальная бессонница
	PrP, варианты	L	H	Болезнь Крейтцфельдта-Якоба, Синдром Герстмана – Штраусслера, фатальная бессонница
	PrP, варианты	S	H	ПНС
ATMEM106B	Трансмембранный 106B (TMEM106B)	L	A	Заболевания лобно-височной долевой дегенерации
ACal	(Про)кальцитонин	L	A	С-клеточные опухоли щитовидной железы
		S	A	Почки
AIAPP ^	Островковый амилоидный полипептид	L	A	Островки Лангерганса, инсулиномы
AANP	Предсердный натрийуретический пептид	L	A	Предсердия сердца
APro	Пролактин	L	A	Пролактиномы гипофиза, старение гипофиза
ASom	(Про)соматостатин	L	A	Соматостатиномы
AGluc	Глюкагон	L	A	Глюкагонома
APTH	Паратиреоидный гормон	L	A	Опухоли паращитовидной железы, старение паращитовидных желез
AIns	инсулин	L	A	Ятрогенный, место инъекции
AEnf	энфувиртид	L	A	Ятрогенный, место инъекции
AGLP1	Аналог глюкагоноподобного пептида 1	L	I	Ятрогенный, место инъекции

Фибриллярный белок	Белок предшественник	Системный (S) или локализованный (L)	Приобретённый (A) или наследственный (H)	Локализация
AIL1RAP	Белок-антагонист рецептора интерлейкина-1	L		Ятрогенный, место инъекции
ASPC[d]	Сурфактантный белок легких	L	A	Легкие
ACor	Корнеодесмозин	L	A	Ороговевающий эпителий, волосяные фолликулы
AMed	Лактадгерин (MFG-E8)	L	A	Старение аорты, медия, эластичные артерии
AKer	Керато-эпителин	L	A	Роговица
ALac	Лактоферрин	L	A	Роговица
AOAAP	Одонтогенный белок, связанный с амелобластами	L	A	Одонтогенные опухоли
ASem1	Семеногелин 1	L	A	Семенные пузырьки
ACatK[e]	Катепсин К	L	A	Ассоциированный с опухолью
AEFEMP1[e]	EGF-содержащий фибулиноподобный белок 1 внеклеточного матрикса (EFEMP1)	L	A	Вены

*Также были включены крайне редкие случаи наследственного AL (Benson et al., 2018). **ЦНС – центральная нервная система, [#]ПНС – периферическая нервная система, [##]ВНС – вегетативная нервная система, ^AIAPP – островковый амилоидный полипептид.

В клинической практике очень важно проводить различие между излечимыми и неизлечимыми амилоидозами. Более того, амилоидозы с генетическим компонентом необходимо отличать от спорадических типов, а системные амилоидозы – от локализованных форм (Picken, 2014; Wechalekar et al., 2016; Gertz, 2018; Merlini et al., 2018; Gertz et al., 2019; Maurer et al., 2019; Adams et al., 2020; Naiki et al., 2020).

1.2.3. Функциональные амилоиды

Доказательства того, что амилоиды могут иметь положительные свойства найдены с начала 2000-х годов и с каждым годом белков – предшественников функциональных амилоидов становится больше. В клетках живых организмов присутствуют амилоиды и было обнаружено, что они играют жизненно важную роль. Такие амилоиды называют функциональными амилоидами (Табл. 3). Функциональные амилоиды, как и амилоиды, связанные с различными патологиями, имеют кросс-β структуру и связываются с красителями КК и ТТ.

Функциональные амилоиды были обнаружены как у прокариот (Romling et al., 1998; Claessen et al., 2003; Otzen, Nielsen, 2008; Otzen, 2010), так и у эукариот (Si et al., 2003(a); Si et al., 2003(b); 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) (Таблица 3). Известно, что амилоиды обладают антиоксидантным (Atwood et al., 2002; Smith et al., 2002) и антибактериальным действием (Westermark et al., 2007; Kumar et al., 2016). 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 CPEB у *Aplysia californica* имеет прион-подобные свойства и играет ключевую роль в длительных синаптических изменениях (Si et al., 2003(a); Si et al., 2003(b)). 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 человека цитоплазматический РНК-связывающий белок TDP-43 образует амилоидо-подобные олигомеры, названные миогранулами (Vogler et al., 2018).

В таблице 3 также приведены синтетические амилоидные фибриллы, созданные человеком для выполнения определённых функций, такие как, например, полипептид, названный Васцином. Ученые использовали прион-подобные свойства белков, которые могут изменять структуру подобных белков в организме, превращая их в нефункциональную агрегированную (амилоидную) форму и создали пептид Васцин, способный связываться в клетках с рецептором VEGFR2. Такое связывание приводило к амилоидной агрегации в клетках VEGFR2 и, тем самым, ингибировался VEGFR2-зависимый рост опухоли как в культуре клеток человека, так и в модели опухоли у мышей (Gallardo et al., 2016).

Почему одни амилоиды могут быть патологическими, а другие – функциональными? В чем причина отсутствия токсичности функциональных амилоидов? На сегодняшний день механизмы, лежащие в основе нетоксичных свойств функциональных амилоидов все еще неясны. Однако Джексон и Хьюитт предложили отличительные особенности, характерные для функциональных амилоидов: (1) регулирование содержания амилоидогенных пептидов/белков в организме; (2) уменьшение времени жизни олигомерных форм при амилоидогенезе; (3) нахождение амилоидных форм внутри мембран-ассоциированных органелл (таких как меланосома); (4) регулирование образования амилоида другими молекулами и разборка фибрилл в физиологических условиях (Jackson, Hewitt, 2017).

Итак, завершая эту часть литературного обзора, следует отметить следующее. Открытие амилоидов в органах и тканях при различных заболеваниях на долгие годы определило негативную роль этих образований и сконцентрировало исследователей на поиск лекарственных препаратов, основанном на, возможно, ошибочном подходе, направленном на ингибирование образования амилоидных фибрилл. Теперь становится очевидным, что в основе амилоидной агрегации лежит более сложный процесс структурных преобразований, во многом регулируемый. В результате этого сложного процесса формируются надмолекулярные структуры с различными свойствами, не всегда являющиеся опасными для организма. Если коротко охарактеризовать существующую проблему в исследовании амилоидных агрегатов, то она звучит так: «Амилоидные структуры – гораздо больше, чем просто

кросс β-структура» (Gallardo et al., 2020). Поэтому исследования структурных изменений в белках при амилоидной агрегации имеют большую важность, поскольку полученные результаты, несомненно, помогут в будущем решить разные задачи, среди которых повышение эффективности работы функциональных амилоидов (например, для улучшение памяти), разработка эффективных средств лечения амилоидозов, разработка новых материалов с уникальными свойствами, а также увеличение эффективности белковых лекарственных препаратов путём снижения их возможной агрегации.

Таблица 3. Функциональные амилоиды (Мод. из Yakupova et al., 2021).

Вид или организм	**Белок или пептид**	**Функция**	**м.м.**	**Структура**	**Наличие кросс β-структуры**	**Изменения во вторичной структуре**	**Связывание с ТТ и КК**	**Условия формирования амилоидных агрегатов *in vitro***	**Ссылки**
Бактерии									
Escherichia coli, Salmonella spp.	Курлин (*англ.* Curli)	Образование биопленки, участие в распространении инфекции.	CsgA (домен белка Курлина) ~ 17.5 кДа	В основном β-структура	Да (рентгеновская дифракция CsgA)	Метод КД: CsgA фибриллы содержат: 16% α-спираль, 40% β-участки, 13% β-повороты, и 31% неупорядоченной структуры	КК, ТТ	фибриллы CsgA готовили путем диализа очищенного белка в 25 мМ Трис, pH 7.5, 100 мМ NaCl и 0.5 мМ ЭДТА и инкубации при комнатной температуре (КТ) в течение нескольких дней	(Chapman et al., 2002; Cherny et al., 2005; Barnhart, Chapman, 2006; Shewmaker et al., 2009)
Streptomyces coelicolor	Чаплины (*англ.* Chaplins)	Модуляция поверхностного натяжения воды.	ChpD-H до 6 кДа ChpA – C ~17-20 кДа	ChpD и ChpF содержит β-структуру; ChpE неупорядоченная структура; ChpG и ChpH смешанная структура с элементами	Да (рентгеновская дифракция)	Метод КД: увеличение содержания β-складчатой структуры	ТТ	Синтетический белок растворяли воде в концентрации 2 мг/мл	(Claessen et al., 2003; Sawyer et al., 2011)

				β-структуры и неупорядоченности					
Rhizobium leguminosarum	RopA и RopB	Возможно, участвует в регуляции симбиоза между растениями и микроорганизмами	RopA 38.97 кДа RopB 22 кДа	В основном β- структура	Да (рентгеновская дифракция RopB)	Метод КД: До агрегации: RopA более 40% β-структуры, RopB более 30% β-структура После агрегации: 42% и 38% β-структуры для агрегатов RopA и RopB, соответственно	КК, ТТ	Белки растворяли в 1.1.1.3.3.3-гексафтор-2-пропаноле (HFIP) и инкубировали в течение семи дней. После этого HFIP выпаривали и далее образцы перемешивали еще в течение семи дней	(Kosolapova et al., 2019; Kosolapova et al., 2022)
Klebsiella pneumoniae	Микроцин (*англ.* Microcin E492 (Mcc))	Бактериоцин, мембранный порообразующий пептид, (амилоидная форма неактивна)	~7.8 кДа	В водном растворе неупорядоченная структура, в метаноле α-спиральная структура	Да (рентгеновская дифракция	Метод КД: У агрегированной формы Mcc много β-складчатой структуры	КК, ТТ	Очищенный Mcc (400 мкг/мл) инкубировался в буфере для агрегации (50 мМ PIPES-NaOH, 0.5 М NaCl, pH 6.5) в течение 48 ч при 37 °C при постоянном встряхивании	(Bieler et al., 2005; Arranz et al., 2012; Shahnawaz et al., 2017)
Xanthomonas species	Харпины (*англ.* Harpins (HpaG))	Секретируется фитопатогенными бактериями, дестабилизируе	15.6 кДа	В основном α-спиральная структура	Нет данных	Метод КД: При агрегации в течение 3 дней структура	КК	Образцы Харпина инкубировали без перемешивания в 20 мМ Tris-HCl (pH 8.0), содержащем 10	(Oh et al., 2007)

		т мембраны растений, вызывает гибель клеток				изменилась в сторону образования β-складчатости		мМ NaCl, при 27 °C в течение 14 дней.	
Грибы									
Podospora anserine	HET-s	Регуляция образования гетерокариона	~32 кДа	34% α-спиральной, 16% β-складчатой и 50% неупорядоченной структуры	Да (рентгеновская дифракция (HET-s (218–289))	Метод КД: 17% α-спиральной, 32% β-складчатой, and 50% неупорядоченной структуры Метод ИК-Фурье: В инфракрасном спектре растворимой формы полоса амида I' достигает максимума при 1650 $см^{-1}$. В спектре агрегированной формы этот максимум был сдвинут на 1643 $см^{-1}$, и наблюдалось плечо ~1625 $см^{-1}$	КК, ТТ для HET-s (218–289)	Пептид HET-s (218-289) был растворен при pH 2.5 в 150 мМ уксусной кислоте, но в неденатурирующих условиях при pH 8.0 в течение нескольких часов пептид спонтанно образовывал агрегаты	(Dos Reis et al., 2002; Wan et al., 2012; Balguerie et al., 2003; Ritter et al., 2005)

Saccharomyces cerevisiae	URE2p	Регуляция катаболизма азота	~ 38 кДа	β-складчатая структура, α-спираль and неупорядоченная структура	Электронная и рентгеновская дифракция (URE2p), и рентгеновская дифракция (PFD домена).	Метод КД PFD домена: Структура меняется с неупорядоченной на богатую β-складчатостью. ИК-Фурье домена PFD: В спектре доминирует полоса при ∼1625 $см^{-1}$ (наличие межмолекулярной β-складчатой структуры	КК, ТТ	Фибриллы формировали путем инкубации белковых растворов (обычно с концентрацией ~1 мг/мл) на шейкере в течение 16 ч при 4°C	(Baxa et al., 2005; Sant'Anna et al., 2016)
Saccharomyces cerevisiae	Sup35p (Прион-индуцированный домен 2–114 и PFD домен)	Регуляция чтения стоп-кодона	~75 кДа	Небольшое содержание α-спирали или β-складчатой структуры	Да (рентгеновская дифракция (PFD домен))	Метод КД PFD домена: При агрегации неупорядоченная структура изменяется на преобладающую β-складчатую структуру. ИК-Фурье:	КК	Фибриллы Sup35pN (прион-индуцирующий домен 2–114) получали в 0.1% TFA/40% ацетонитрила с использованием фракций ВЭЖХ с обращенной фазой, содержащих изократически элюированный Sup35pN. Приготовление 100 мкМ раствора Sup35pN приводило к образованию фибрилл после 1 недели инкубации при 4°C;	(King et al., 1997; True et al., 2004; Sant'Anna et al., 2016)

						В ИК спектре доминирует полоса ~1625 $см^{-1}$		Спонтанное образование фибрилл происходит в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 2.0) с 40% ацетонитрила	
Saccharomyces cerevisiae	Swi1p	Фактор ремоделирования хроматина (прионная форма неактивна)	~140 кДа.	Нет данных	Да (рентгеновская дифракция (PFD домен))	Метод КД PFD домена: При агрегации неупорядоченная структура изменяется на преобладающую β-складчатую структуру. ИК-Фурье: В ИК спектре доминирует полоса ~1625 $см^{-1}$.	Нет данных	Нет данных	(True et al., 2004; Du et al., 2008)
Saccharomyces cerevisiae	Mot3	Регуляция транскрипции генов ремоделирования клеточной стенки (прионная форма неактивна)	~55 кДа	Нет данных	Да (рентгеновская дифракция (PFD домен))	Метод КД PFD домена: При агрегации неупорядоченная структура изменяется на преобладающую β-складчатую структуру.	КК, ТТ	Нет данных	(Alberti et al., 2009; Sant'Anna et al., 2016)

						ИК-Фурье: В ИК спектре доминирует полоса ~1625 $см^{-1}$			
Грибы (Most fungi)	Гидрофобины (*англ.* Hydrophobins)	Образование покрытия, модуляция адгезии и поверхностного натяжения	7-9 кДа.	В основном неупорядоченная структура и небольшое количество антипараллельных β-цепей	Да (рентгеновская дифракция)	Метод КД: β-складчатая структура является преобладающим элементом вторичной структуры	КК, ТТ	Для гидрофобина SC3 Schizophyllum commune: При связывании с гидрофобной твердой поверхностью белок находится в промежуточном α-спиральном состоянии, тогда как при самосборке на границе воздух-вода образуются нити имеющие β-складчатую структуру.	(de Vocht et al., 2000; Butko et al., 2001; Chapman et al., 2002; de Kwan et al., 2006)
Животные									
Насекомые и рыбы	Белки хориона (центральный домен белков хориона тутового шелкопряда А и В семейства)	Структурная и защитная функции яичной скорлупы.	34 и 24 кДа	В обоих семействах белков преобладает β-складчатая структура	Да (рентгеновская дифракция)	Совокупность методов метод ИК-Фурье и НПВО ИК-Фурье: наличие однородных β-листов в структуре фибрилл пептида cA_m1; НПВО ИК-Фурье:	КК	Пептид cA (центральный домен белков хориона шелкопряда семейства А) растворяли в 50 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 5) в концентрации 9 мг/мл для получения амилоидо-подобных фибрилл после 3-4 недель инкубации.	(Hamodrakas et al., 1982; Iconomidou et al., 2000; Podrabsky et al., 2001; Iconomidou et al., 2001; Iconomidou et al., 2006)

						64% антипараллельных β-цепей и 30% β-поворотов в центральном домене белков хориона тутового шелкопряда.			
Nephila clavipes Nephila edulis Araneus diadematus	Спидроины и фиброин из Araneus diadematus	Структурные свойства	~320 кДа (спидроин)	β-складчатая структура β-повороты и неупорядоченная структура	Да (рентгеновская дифракция)	Метод КД: Увеличение β-складчатой структуры при агрегации	КК, ТТ	Лиофилизированный белок растворяли в 6 М тиоцианате гуанидиния в концентрации 0.1 мг/мл и диализовали против 0.01 М фосфата калия в течение нескольких дней при комнатной температуре. Для ускорения образования фибрилл добавляли 10 об. % метанола	(Mackay et al., 2001; Slotta et al., 2007; Dicko et al., 2004)
Все млекопитающие включая *Homo sapiens*	Негликозилированный люменальный фрагмент t of Pmel17 (rMα)	Амилоидные матрицы Pmel17 ускоряют ковалентную полимеризацию малых реактивных молекул в меланин	110 кДа (28 кДа трансмембранный фрагмент(Mβ) и 80 кДа люменальный	β-складчатая структура, α-спираль и неупорядоченная структура	Да (рентгеновская дифракция)	Методы КД и ИК-Фурье агрегатов Mα: 11% α-спирали, 32% β-складчатой структуры, 23% β-повороты, 33% неупорядоченной структуры	КК, ТТ	rMα фибриллы были получены путем разбавления (из концентрированного 8 М Гуанидин хлорида, 50 мМ KH_2PO_4/K_2HPO_4, pH 7.4, 100 мМ раствора KCl) rMα в 125 мМ буфере CH_3COOH/CH_3COOK, pH 5.0 до конечной концентрации 10 мкМ и далее оставляли	(Fowler et al., 2006; Watt et al., 2009)

			фрагмент (Mα))					при комнатной температуре в течение 24 ч.	
Drosophila melanogaster	CPEEB (Orb2)	Консолидация памяти. Белок, связывающий элемент цитоплазматического полиаденилирования, регулирует трансляцию мРНК	~62 кДа	Ядро протофиламента принимает простую шпилькообразную укладку, состоящую из двух β-цепей	Да (крио-ЭМ)	Данные крио-ЭМ: 31 аминокислотный остаток из 704 остатков образуют амилоидное ядро в агрегатах, представляющее собой кросс β-структуру. Остальная часть молекулы остаётся динамически неупорядоченной	ТТ	Рекомбинантные образцы Orb2A и Orb2A88 были помещены в раствор, содержащий 10 мМ HEPES, pH 7.6, 100 мМ KCl, 1 М мочевины и 1 мМ ДТТ с использованием диализа и обессоливающей колонки PD-10. Затем образцы инкубировали на шейкере при комнатной температуре до 2 недель	(Si et al., 2003(a); Si et al., 2003(b); Cervantes et al., 2016; Hervas et al., 2020; Ulamec, Radford, 2020)
Растения									
Pisum sativum L	Vicilin (Cupin-1.1 ((19-166 aa) and Cupin-1.2(229-394 aa))	Образование амилоидов, способствует накоплению и сохранению запасных белков в семенах растений	~50 кДа	β-Складчатая структура (содержит домен, представляющий β-бочонок)	Да (рентгеновская дифракция)	Метод КД: до агрегации Купин-1.1 и купин-1.2 (4-12% β-складчатой структуры), вицилин (39% β-складчатой структуры) После агрегации Купин-1.1, купин-1.2 и вицилин (40-	КК, ТТ.	Растворение в 1.1.1.3.3.3-Гексафтор-2-пропаноле с последующим удалением его из пробы и инкубацией растворенных белков в дистиллированной воде при 37 °C в течение 7 сут для Вицилина, Купин-1.1, Купин -1.2 и в 5 мМ фосфатно-солевом буфере, pH 7.4 в течение одного дня при 25 °C для Купин -1.2	(Antonets et al., 2020)

						42% β-складчатой структуры)			
Синтетические амилоидные агрегаты									
Синтезированные пептиды (*Homo sapiens* and *Mouse)*	Васцин (Vascin) – Пептид на основе амилоидогенной последовательности рецептора эндотелиального фактора роста сосудов VEGFR2	Ингибирует VEGFR2-зависимый рост опухоли	~2.3 кДа.	Неупорядоченная структура	Да (рентгеновская дифракция)	ИК-Фурье: β-структура изменилась на кросс β-структуру	ТТ	300 мМ васцина в 1% (масс. /об.) NH_4CO_3 после 24-часовой инкубации при комнатной температуре	(Gallardo et al., 2016)
Dosidicus gigas (D. gigas)	Зубья присосок щупальцев (Sucker ring teeth)	Молекулярный дизайн биомиметических термопластичных структурных биополимеров на основе белков и пептидов с	Нет данных	В основном β-складчатая структура	Да (рентгеновская дифракция)	ИК-Фурье: специфическая для β-листа инфракрасная полоса была на 1235 $см^{-1}$ при комнатной температуре. После нагревания до 150 °C, постепенно	Нет данных	Нагревание свыше 150 °C	(Latza et al., 2015)

		потенциальными применениями в биомедицине и 3D-печати				инфракрасная полоса смещалась до 1220 $см^{-1}$			
Синтетические пептиды	Аналог гонадорелина (Gonadotropin-releasing hormone) (GnRH)	Использование амилоидов в лекарственных средствах длительного действия. Сортировка, хранение и высвобождение различных гормонов	1.2 кДа	Вторичная структура отсутствует	Нет данных	Нет данных	КК, ТТ.	GnRH аналоги растворялись в 1 мл 5% D-маннитол и 0.01% азиде натрия в концентрации 1 мг/мл. Затем аналоги GnRH инкубировали при комнатной температуре без перемешивания.	(Maji et al., 2008; 2009)
Escherichia coli и *Bacillus circus* и *Mytilus galloprovincialis*	CsgA (в виде амилоидогенных ядер) + хитинсвязывающие домены (CBD) + белки ножки мидии	Разработка многофункциональных молекулярных материалов с индивидуальной структурой и характеристиками на основе амилоида	CsgA ~ 17.5 кДа Mfp3 5 - 7.5 кДа Mfp5 9.5 CBD 6 кДа	β-складчатая структура и неупорядоченная структура	Да (рентгеновская дифракция)	Двухдоменные белки содержали 60% β-складчатой структуры/β-повороты и 40% неупорядоченной структуры за счет введения Mfps. По сравнению с их двухдоменными аналогами, трехдоменные	КК, ТТ	Белки либо диализовали против растворов ФСБ (pH 5.0 или 2.5) в течение 2 дней, либо инкубировали при 4°C в кислых условиях в течение 3 дней для стимулирования образования амилоидных волокон с последующим повторным растворением в гексафтор-2-пропаноле (HFIP)	(Cui et al., 2019)

	(Mfp3/Mfp5) двухдоменные и трехдоменные конструкции с обязательным присутствием CsgA					фибриллы обладают большим количеством β-структуры			

1.3. МУЛЬТИДОМЕННЫЕ МЫШЕЧНЫЕ БЕЛКИ СУПЕРСЕМЕЙСТВА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

1.3.1. Обоснование выбора объекта исследования

К суперсемейству иммуноглобулинов относятся некоторые мышечные белки (титин, миозин-связывающий белок С, миомезин и другие), состоящие из чередующихся Ig- и FnIII-доменов, имеющих иммуноглобулиноподобную β-сэндвич структуру (Vaughan et al., 1993; Okagaki et al., 1993; Pfuhl, Pastore, 1995). В качестве объекта исследования были выбраны два основных белка этого семейства: гладкомышечный титин с м.м. его изовариантов 500 кДа и 1500 кДа и скелетномышечный миозин-связывающий белок С – С-белок с м.м. 132 кДа. С-белок эксперсссируется только в поперечно-полосатых мышцах, тогда как разные изоформы титина, являясь продуктом альтернативного сплайсинга, экспрессируются и в поперечно-полосатых, и в гладких мышцах (Рис. 5). В поперечно-полосатых мышцах титин и С-белок взаимодействуют в А-зоне саркомера, участвуя в формировании высокоупорядоченной саркомерной структуры. Титин в гладких мышцах, несмотря на отсутствие точных данных о его локализации, взаимодействует с актином и миозином и играет важную роль в поддержании структурно-функциональной целостности сократительного аппарата гладкомышечных клеток.

Известно, что легкие цепи иммуноглобулинов, состоящие из подобных доменов, формируют амилоиды, которые являются патологическим признаком наиболее распространенной формы системного амилоидоза. Отложение амилоидных агрегатов легких цепей иммуноглобулинов обнаружены, в том числе, в скелетных мышцах и в сердце. Однако амилоидных агрегатов титина и С-белка *in vivo* обнаружено не было. В свою очередь показано, что при растяжении саркомера домены титина могут разворачиваться, делая доступными для межмолекулярного взаимодействия скрытые гидрофобные участки этих доменов, что может привести к агрегации соседних молекул белка и нарушению его функций (Minajeva et al., 2001; Rief et al., 1997). Ряд *in vitro* исследований, проведенных начиная с 1999 года, демонстрируют высокую склонность титина к агрегации (Oberhauser et al., 1999;

Wright et al., 2005; Borgia et al., 2013; Borgia et al., 2015). При этом в подавляющем большинстве работ при исследовании механизмов неправильного сворачивания титина и его агрегации в качестве модели использовались отдельные домены этого белка (Wright et al., 2005; Borgia et al., 2015). Исследования, проведенные ранее в нашей лаборатории, выявили способность титина и С-белка, выделенных из скелетных мышц кролика, агрегировать *in vitro* с образованием пучков линейных фибрилл (Марсагишвили и др., 2005). На основании данных о взаимодействии агрегатов титина и С-белка с Конго красным и Тиофлавином Т было высказано предположение об их амилоидной природе (Марсагишвили и др., 2005). Однако не было получено подтверждение амилоидной природы вышеуказанных агрегатов методом рентгеновской дифракции, как и не были исследованы изменения структуры в молекулах титина и С-белка при их агрегации.

Научный интерес к исследованию агрегации мультидоменных мышечных белков связан с тем, что до сих пор нет убедительного подтверждения присутствия амилоидных агрегатов титина и С-белка в мышечных клетках, несмотря на достаточно высокую склонность этих белков к агрегации, что подтверждается результатами *in vitro* и *in vivo* исследований. Не ясно, возможно ли участие этих белков в формировании агрегатов амилоидного или неамилоидного типов в мышечных клетках? А если и возможно, то какую роль будет играть агрегация этих белков – положительную (функциональную) или патологическкую?

Эти вопросы актуальны и своевременны, учитывая данные ряда исследований, в которых показано, что укороченные молекулы титина, экспрессирующиеся при развитии дилатационной кардиомиопатии могут не встраиваться в саркомер, а накапливаться в виде внутриклеточных агрегатов, которые могут проявлять цитотоксичность и нарушать процесс «контроля качества белка» по механизму «пептидного яда» (Fomin et al., 2021; Schafer et al., 2017; Herman et al., 2012; Kellermayer et al., 2024). Известны данные о том, что и укороченные молекулы С-белка, обнаруженные при развитии гипертрофической кардиомиопатии, также могут участвовать в процессе формирования белковых агрегатов в клетке, нарушающих работу убиквитин-протеосомальной системы (Mearini et al., 2008; Sarikas et al., 2005; Zolk et al., 2006).

Таким образом, вопросы о том, могут ли мультидоменные мышечные белки участвовать в амилоидной агрегации *in vivo*, и если да, то какое это будет иметь значение (положительное или отрицательное) остаются открытыми. Ответы на эти вопросы, скорее всего, скрываются в особенностях структурных изменений, которые происходят при агрегации этих белков.

В данной работе проведено комплексное *in vitro* исследование агрегационных свойств гладкомышечного титина (ГМТ) и скелетномышечного С-белка для выяснения типа образующихся белковых агрегатов, а также структурных изменений при агрегации вышеуказанных белков. Выбор С-белка был сделан на основании того, что он является основным компонентом поперечного саркомерного цитоскелета в миофибриллах сердечной и скелетных мышц позвоночных животных. Выбор гладкомышечного титина – более низкомолекулярного аналога титина поперечно-полосатых мышц (в которых этот белок является основным компонентом продольного саркомерного цитоскелета) был сделан с целью минимизации методических сложностей при исследовании гигантских молекул данного белка.

1.3.2. Титин: структура и функции

1.3.2.1. Роль титина в мышечных клетках

Титин синтезируется как в клетах гладких мышц, так и в клетках поперечно-полосатой мускулатуры. Расположение титина в гладкомышечных клетках неизвестно, тогда как в поперечно-полосатых мышцах титин является одним из основных белков саркомерного цитоскелета и его молекулы простираются от М-линии до Z-диска.

Каркас саркомера поперечно-полосатых мышечных клеток образован тремя типами нитей: толстыми, состоящими преимущественно из миозина, тонкими, состоящими преимущественно из актина, и эластичными нитями, которые формирует гигантский белок титин (Рис. 5). В то время как миозин и актин в основном ответственны за Ca^{2+}-зависимое развитие силы саркомера, эластичным нитям присущи другие функции, в частности, развитие пассивного напряжения при растяжении саркомера и «возвратной силы» при сокращении мышцы.

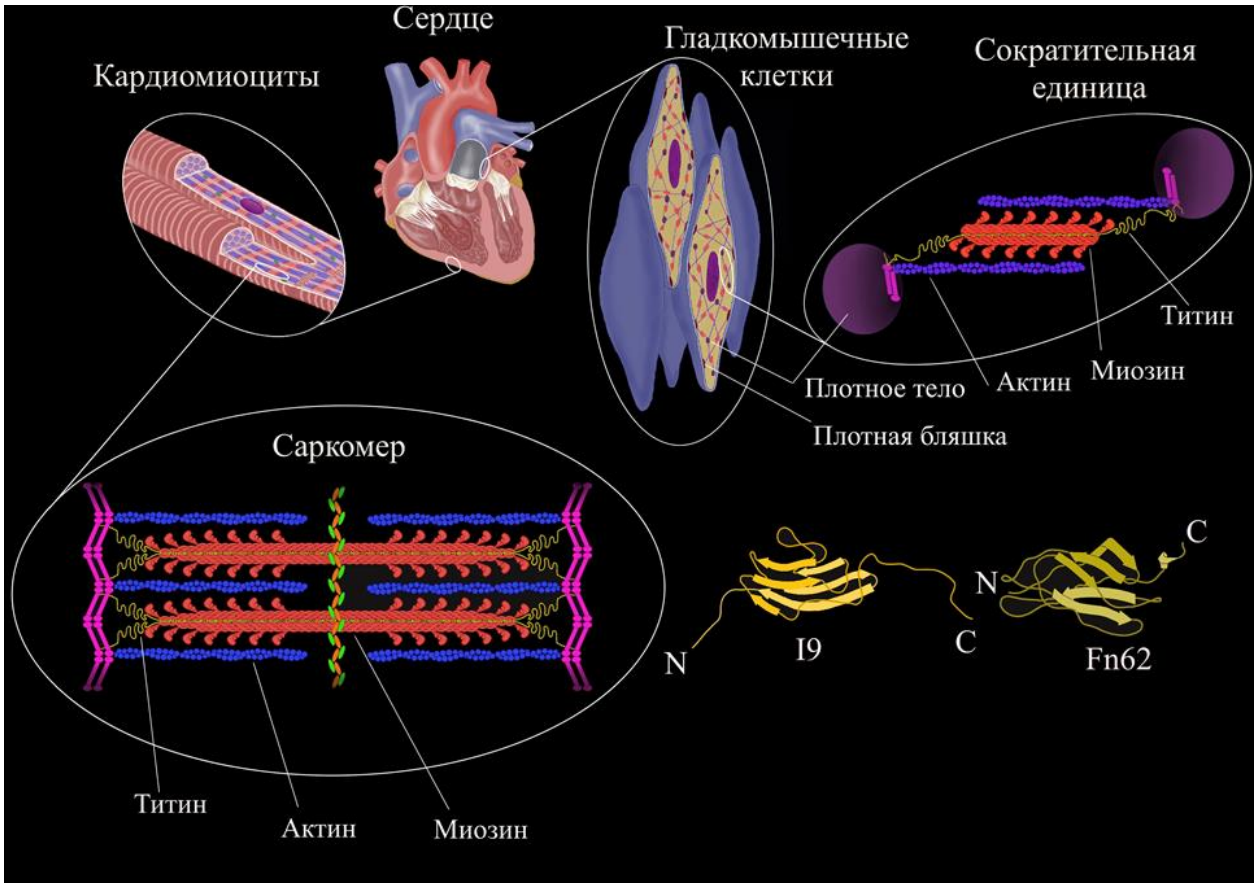


Рис. 5. Схематичное изображение саркомера поперечно-полосатых мышц, а также схематическое представление сократительного аппарата гладкомышечных клеток. Показаны расположения актина, миозина и титина. Схемы саркомера скелетных мышц и сократительной единицы гладких мышц воспроизведены из работ (Bobylev et al., 2021; Timchenko et al., 2024). Схема сократительной единицы гладкомышечной клетки воспроизведена с использованием данных (Lavoie et al., 2009; Ye et al., 2015). Предположительное расположение гладкомышечного титина приведено на основе данных (Kim, Keller, 2002; Labeit et al., 2006; Chi et al., 2008). В правом нижнем углу приведены схематические изображения структур Ig-подобного (I9) домена, расположенного в I-полосе саркомера, и домена FnIII (Fn62), расположенного в A-полосе саркомера. Домены были воспроизведены на основе файла PDB (UniProtkB–Q8WZ42 (TITIN_HUMAN) https://www.uniprot.org/uniprot/Q8WZ42). Воспроизведено из работ (Bobylev et al., 2021; Timchenko et al., 2024), выполненных при участии автора диссертации.

В саркомерах сердечной и скелетных мышц позвоночных титин является третьим по количеству (после актина и миозина) белком (Labeit et al., 1997). Благодаря своей очень специфической структуре и положению в саркомере титин играет особенно важную роль в формировании вязко-упругих свойств

миофиламентов. В этой связи титин выступает в роли молекулярной пружины и, наряду с коллагеном, является основным детерминантом пассивной упругой силы в мышечных клетках (Granzier, Irving, 1995; Linke 2008; Tskhovrebova, Trinick, 2010; Gautel, 2011(b)). Титин также участвует в сложных механизмах запуска и регуляции актин-миозинового взаимодействия, отвечает за удержание толстых филаментов в центре саркомера, способствует сборке саркомера и является молекулярным механосенсором, регулирующим различные процессы внутриклеточной сигнализации (Krüger, Linke, 2011). Вязко-упругие свойства титина сердечной мышцы динамически изменяются во время развития сердца, а также могут претерпевать негативные изменения при сердечных заболеваниях (Linke, Hamdani, 2014). Эти изменения в молекуле титина оказывают сильное влияние на диастолическую функцию миокарда (Koser et al., 2019).

Центральное положение титина в саркомере в сочетании с его ролью сигнального узла позволяет ему функционировать в качестве молекулярного механосенсора (Krüger, Linke, 2011). Поскольку в работающем саркомере белок подвергается высоким механическим нагрузкам, молекула титина подвергается сложному процессу контролю качества белка. Однако в саркомере, который постоянно сокращается и расслабляется, «контроль качества» такого гигантского белка представляет собой огромную проблему, и нарушение этого процесса может приводить к накоплению в клетке фрагментов титина и их последующей агрегации.

1.3.2.2. Структура титина и его функции

Гигантский белок титин кодируется одним геном (*TTN*), содержащим 364 экзона, что дает теоретический (максимальный) размер полипептида с м.м. ~4.2 МДа (Bang et al., 2001). Самым длинным вариантом титина считается «каноническая» изоформа, которую экспериментально еще не обнаружили. Её размер должен достигать 3960 кДа (35991 аминокислотных остатков) (Hackman et al., 2017). К настоящему времени самая длинная N2A-изоформа белка была обнаружена в скелетной «камбаловидной» мышце *m. soleus* (3700 кДа) человека и животных. Она образуется при экспрессии 312 экзонов (Prado et al., 2005). Самым коротким вариантом титина в поперечно-полосатых мышцах млекопитающих является C-

концевая усеченная изоформа – новекс-3 (625 кДа) (Bang et al., 2001; Krüger, Linke, 2011). Подобное разнообразие изоформ титина возможно благодаря альтернативному сплайсингу, обеспечивающему в теории экспрессию более 1 миллиона вариантов белка (Guo et al., 2010). Экспрессия определённого ряда изоформ титина зависит как от типа мышечной ткани, так и от адаптации мышц к факторам внешней или внутренней среды (Вихлянцев, Подлубная, 2012).

Молекулы титина имеют длину ~1 мкм и диаметр 3-4 нм (Suzuki et al., 1994; Tskhovrebova, Trinick, 1997; Вихлянцев и др., 2011) перекрывают половину саркомера от М-зоны до Z-диска, формируя третий тип нитей, получивших название эластичных (Cola et al., 2005; Вихлянцев, Подлубная, 2012). Титин как поперечно-полосатых, так и гладких мышц состоит в основном из последовательно соединенных иммуноглобулин-подобных (Ig) и фибронектин-подобных (Fn/FnIII) доменов с β-складчатой структурой (Gregorio et al., 1999; Bang et al., 2001; Giganti et al., 2018). Домены имеют длину ~6 нм и ширину 3-4 нм. Исследования показали, что этот гигантский полипептид имеет различное строение в разных зонах саркомера поперечно-плосатых мышц (Tskhovrebova, Trinick, 2010). Расположение титина во всех зонах саркомера, эластические свойства и взаимодействие со многими белками создают основу для обеспечения множества различных функций. Доменная структура титина поперечно-полосатых и гладких мышц приведена на рисунке 6.

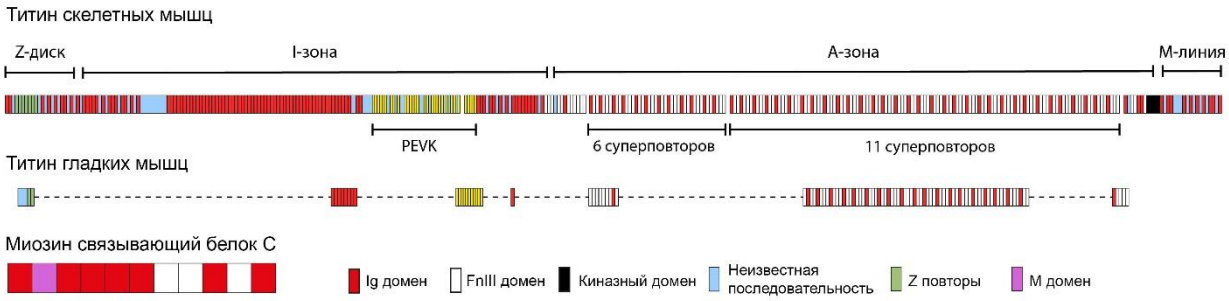


Рис. 6. Доменные структуры молекул титина скелетных и гладких мышц, а также скелетномышечного миозин-связывающего белка С. Адаптировано по (Freiburg et al., 2000; Labeit et al., 2006; Linke, Hamdani, 2014; McNamara, Sadayappan, 2018).

К основным функциям титина можно отнести следующие:

1) Титин 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) Титин участвует в поддержании высокоупорядоченной саркомерной структуры и, вследствие этого, сократительной функции мышцы (Horowits et al., 1986; Higuchi, 1992);

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

4) Предполагается, что в комплексе с сигнальными белками, объединенными титином в единую сеть, титин 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(b); Stahl et al., 2011).

Известно, что NH_2-конец титина связывается с Z-диском саркомера посредством взаимодействия с небулином или сердечной изоформой этого белка небулетте (Witt et al., 2006), α-актинином 2 (Sorimachi et al., 1997; Labeit et al., 2006) и телетонином (Mues et al., 1998; Granzier, Labeit, 2004; Miller et al., 2004; Lange et al., 2006). Телетонин соединяет NH_2-концевые участки двух молекул титина в Z-диске саркомера (Zou et al., 2006). В комплексе с компонентом Z-дисков α-актинином и мышечным белком LIM титин и телетонин образуют механический комплекс, чувствительный к растяжению (Knöll et al., 2002). Часть молекулы титина, расположенной в I-зоне слабо связана к соседними филаментами и, таким образом, может действовать как вязко-упругая молекулярная пружина, которая способствует развитию пассивной жесткости при растяжении саркомеров поперечно-полосатых мышц.

В I-зоне саркомера поперечно-полосатых мышц титин состоит из последовательности проксимальных Ig-доменов, специфичного для сердца домена N2B (включая уникальную последовательность N2-B, N2-bus), последовательности медиальных Ig-доменов, домена N2A, домена PEVK (имеющего высокое содержание остатков пролина (P), глутаминовой кислоты (E), валина (V) и лизина (K)) и последовательности дистальных Ig -доменов.

Большая часть молекулы титина (~2 МДа) расположена в А-зоне (Bang et al., 2001). В этой зоне саркомера титин тесно связан с миозином и миозин-связывающим белком С (Tskhovrebova, Trinick, 2004; Lange et al., 2006; Tonino et al., 2019). Эта часть молекулы титина состоит в основном из Ig-доменов и FnIII-доменов. Часть титина, расположенного в области М-линии, содержит титин-киназный домен (Bang et al., 2001; Gautel, 2011(a)).

В клетках сердечной мышцы титин экспрессируется в виде двух основных изоформ: более длинной и более эластичной N2BA (~3.2–3.3 МДа) и более короткой и, соответственно, более жесткой N2B (~3.0 МДа). Клетки скелетных мышц содержат изоформу N2A с несколько более длинными специфическими для мышц вариантами сплайсинга (3.3-3.7 МДа) (Freiburg et al., 2000; Neagoe et al., 2003; Prado et al., 2005). В клетках сердечной мышцы соотношение изоформ N2BA и N2B в значительной степени определяет пассивную жесткость кардиомиоцитов (Krüger, Linke, 2011).

1.3.2.3. Гладкомышечные изоформы титина

Несмотря на то, что титин был открыт в 1979 году (Wang et al., 1979; Maruyama et al., 1981), его гладкомышечные изоформы были обнаружены спустя более чем 20 лет в 2002 году (Kim, Keller, 2002) в экстракте гладкой мышцы желудка курицы. В гладкой мускулатуре курицы были выявлены изоформы титина с молекулярной массой ~700 кДа и ~2000 кДа, известные сначала как титин-подобные белки зэгматин (zeugmatin) (Maher et al., 1985) и смитин (smitin) (Kim, Keller, 2002). Однако в последствии было показано, что вышеуказанные титин-подобные белки, в частности смитин, являются изоформами титина и кодируются геном *TTN* (Labeit et al., 2006). В настоящее время известно, что в результате альтернативного сплайсинга в гладких мышцах животных (аорты, мочевого пузыря, желудка и др.) экспрессируются более котроткие, чем в поперечно-полосатых мышцах, изоформы титина (экспресируются только 80-100 экзонов гена титина) (Рис. 6). Гладкомышечные изоформы титина также преимущественно состоят из Ig- и FnIII-доменов, из которых состоят изоформы титина поперчено-полосатых мышц; доменов, которые в саркомерах поперечно-полсатых мышц расположены в Z-дис**ке**,

I- и A-зонах. Вследствие этого, укороченные гладкомышечные изоформы могут связываться как с плотными телами (аналогами Z-дисков поперечно-полосатых мышц), так и с толстыми нитями в гладкомышечных клетках (Labeit et al., 2006). В связи с этим, предполагается участие гладкомышечного титина в запуске и регуляции актин-миозинового взаимодействия.

Гладкомышечный титин (ГМТ) является достаточно длинной белковой молекулой (700-800 нм), на конце которой находится глобулярная головка (Kim, Keller, 2002). Молекулярная морфология ГМТ подобна таковой титину из поперечно-полосатых мышц. ГМТ взаимодействует с миозином *in vitro* (Kim, Keller, 2002) и гладкомышечным α-актинином (Chi et al., 2005). Было обнаружено что, как и в поперечно-полосатой мышце один из сайтов связывания ГМТ находится на С-терминальном конце α-актинина. Было также определено молекулярное соотношение миозина к ГМТ в белковых комплексах как 85:1. Предполагается, что каждая однонаправленная толстая нить содержит не более, чем 170 молекул миозина, из чего можно заключить, что на одну толстую нить или сократительную единицу приходится ~2 молекулы ГМТ. Учитывая то, что на стыке ядерной оболочки с плотным телом в гладких мышцах тонкие нити заякорены в ядре, можно предположить, что ГМТ может также быть локализован на периферии ядра, что предполагает для него пока не выясненную сигнальную роль (Zastrow et al., 2006).

1.3.3. Миозин-связывающий белок С

Семейство миозин-связывающих белков (С-белков) представляет собой группу саркомерных белков, которые регулируют актин-миозиновое взаимодействие. Существуют три паралога С-белка, которые кодируются отдельными генами с разными профилями экспрессии в поперечно-полосатых мышцах. «Медленный» скелетный С-белок кодируется *MYBPC1*, «быстрый» скелетный С-белок кодируется *MYBPC2*, тогда как *MYBPC3* кодирует сердечный паралог С-белка (McNamara, Sadayappan, 2018). Эти три паралога обладают значительной гомологией последовательностей и состоят в основном из Ig- и Fn-III подобных доменов с бета-складчатой структурой (Рис. 7) (Vydyanath et al., 2012; McNamara, Sadayappan, 2018).

Главной отличительной чертой *MYBPC1* по сравнению с *MYBPC2* и *MYBPC3* является высокий уровень сплайсинга, которому может подвергаться его транскрипт (Ackermann, Kontrogianni-Konstantopoulos, 2013). У людей и мышей было описано по крайней мере 14 транскриптов, кодирующих этот белок, что приводит к образованию белковых продуктов с молекулярными массами примерно от 126 до 132 кДа (Ackermann, Kontrogianni-Konstantopoulos, 2010; Ackermann, Kontrogianni-Konstantopoulos, 2013).

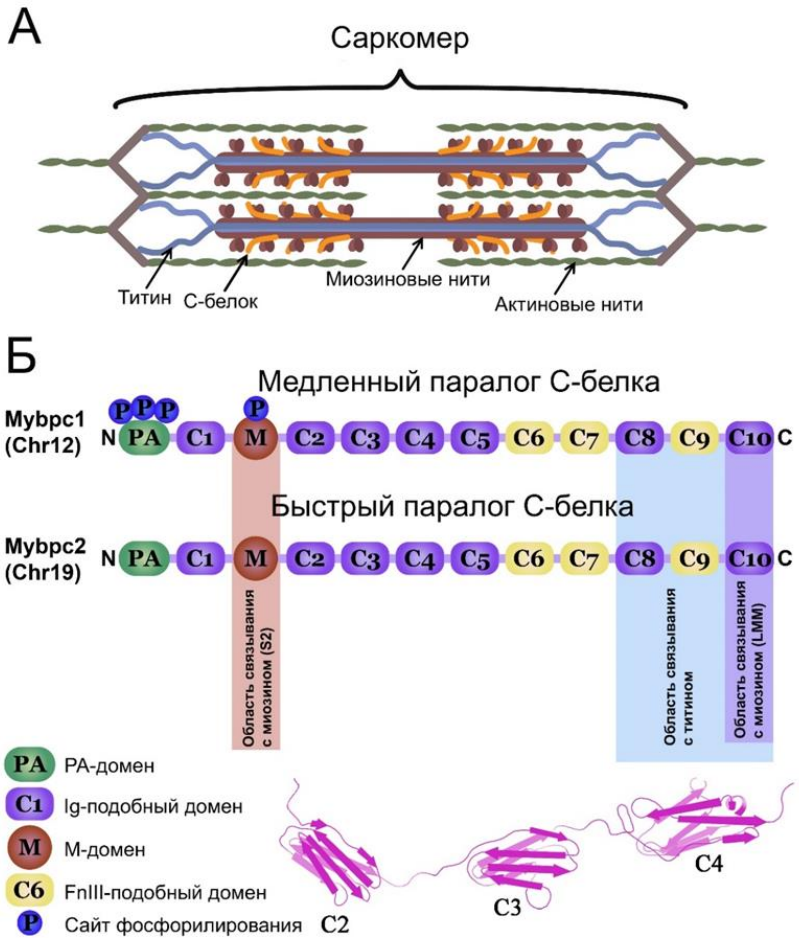


Рис. 7. Схема структуры С-белка и его расположение в саркомере (Bobyleva et al., 2021). (А) Схематическое строение мышечного саркомера с толстыми и тонкими филаментами. С-белок локализован в С-зоне А-диска саркомера и показан оранжевым цветом. (Б) Доменная структура двух паралогов С-белка (на основе схем из (Vydyanath et al., 2012; McNamara, Sadayappan, 2018)). Ig-подобные домены изображены фиолетовыми блоками, а Fn-III подобные домены изображены желтыми блоками. Линкер (участок), обогащенный пролином-аланином (P/A), показан в зеленом овале, а M-домен показан в виде коричневого круга. Сайты фосфорилирования показаны синим кружком. С-белок имеет три сайта фосфорилирования в P/A домене и один в M-домене. Регион, отвечающий за связывание с

титином (отмечен светло-синим цветом) включает домены C8-C10 (данные только для сердечного паралога (Freiburg et al., 1996; Kontrogianni-Konstantopoulos et al., 2009; Tonino et al., 2019)). Ниже приведена схематическая структура трех Ig-подобных доменов «медленного» паралога С-белка (С2–С4), воспроизведенная на основе файла базы данных PDB (https://www.uniprot.org/uniprot/Q00872). Воспроизведено из работы (Bobyleva et al., 2021), выполненной при участии автора диссертации.

Известно, что в саркомере скелетных мышц С-белок связывается с Ф-актином (Moos et al., 1978; Shaffer et al., 2009; Kensler et al., 2011), титином (Furst, Vinkemeier, 1992; Kontrogianni-Konstantopoulos et al., 2009), обскурином (Kontrogianni-Konstantopoulos et al., 2005), миозином (Moos et al., 1975; Okagaki et al., 1993; Gilbert et al., 1996). Взаимодействие между С-концом С-белка и легким меромиозином миозина (ЛММ) происходит в С-зоне саркомера (Moos et al., 1975; Gilbert et al., 1996; Okagaki et al., 1993) (Рис. 7). N-конец (С0 домен) сердечного С-белка обладает способностью связывать тяжелый меромиозин (ТММ) миозина (Gruen, Gautel, 1999; Gruen et al., 1999) (Рис. 7). Описано связывание С-белка с белком LIM 1 (FHL1), (McGrath et al., 2006), который, как известно, является важным регулятором развития поперечно-полосатой мускулатуры (Vafiadaki et al., 2015). Также была описано взаимодействие между «медленным» С-белком и креатинкиназой мышечного типа (Chen et al., 2011), а также между сердечным С-белком и кальмодулином (Lu et al., 2012), и белком FHOD3 (formin homology-2 domain-containing) (Matsuyama et al., 2018). Таким образом С-белок играет важную роль в поддержании структурной целостностти саркомера и в функционировании поперечно-полосатых мышц (McNamara, Sadayappan, 2018).

Нарушение функционирования данного белка связано с различными патологиями (McNamara, Sadayappan, 2018). К данным патологиям относятся артрогрипозы – семейство заболеваний с мутациями в *MYBPC1* и *MYBPC2*. Мутации в гене *MYBPC3*, являются частой причиной гипертрофической кардиомиопатии (Flashman et al., 2004). Было показано, что при развитии гипертрофической кардиомиопатии укороченная форма С-белка (с С-конца) образует убиквитин-положительные агрегаты (Mearini et al., 2008; Sarikas et al., 2005). Мутантный С-белок также может индуцировать образование агрегатов (Zolk et al., 2006). Природа

этих агрегатов (амилоидная/неамилоидная) неизвестна; однако было обнаружено, что укорочённая форма С-белка нарушает функцию убиквитин-протеасомной системы (UPS). Предполагается, что нарушение функционирования UPS связано с накоплением агрегатов, образованных, в том числе, из укороченных молекул С-белка в цитозоле мышечных клеток (Zolk et al., 2006).

1.3.4. Изучение агрегации титина и С-белка

Способность титина формировать агрегаты *in vitro* была впервые показана в 1993 году (Koretz et al., 1993). Было обнаружено, что в растворах с низкой ионной силой (0.1 M KCl) вблизи нейтрального значения pH (6.5) титин поперечно-полосатых мышц формирует агрегаты. В 2003 году впервые было показано, что белки семейства титина (скелетномышечный титин, С-белок, Х-белок) способны формировать агрегаты, проявляющие амилоидные свойства (Марсагишвили и др., 2005; Подлубная, Марсагишвили, 2008; Marsagishvili et al., 2005). В проведённых исследованиях методом ПЭМ был обнаружен полиморфизм агрегатов скелетномышечного титина и миозин-связывающих белков С, выделенных из скелетных мышц кролика. При этом была выявлена способность отдельных типов агрегатов связываться с красителями КК и ТТ, из чего авторы сделали вывод об амилоидной природе данных агрегатов (Марсагишвили и др., 2005; Подлубная, Марсагишвили, 2008). Немногим позже способность формировать агрегаты, которые связывались с КК и ТТ были обнаружены и у гладкомышечного титина (Бобылёва и др., 2010). Тем не менее, несмотря на связывание с вышеупомянутыми красителями, наличие четвертичной кросс-β-структуры показано не было. Также, за пределами понимания оставался вопрос о структурных изменениях, происходящих в молекуле исследуемых белков при формировании агрегатов. Понимание этого, в свою очередь, очень важно, поскольку размеры исследуемых белков предполагают, как минимум, специфический механизм формирования межмолекулярных связей в процессе агрегации. Это связано с тем, что при наличии таких гигантских размеров как, например, у титина, представляется маловероятным полный анфолдинг белка с последующим уходом в амилоидную структуру. Также выяснение особенностей структурных изменений при агрегации этих белков представляет собой интерес в

связи с возможной физиологической ролью или патологическими последствиями данной агрегации в мышечных клетках. Известно, что при растяжении мышечных клеток домены титина могут разворачиваться, раскрывая скрытые гидрофобные участки, что может привести к нежелательной агрегации белка и нарушению структуры и функционирования миофибриллярного аппарата мышечных клеток (Minajeva et al., 2001; Rief et al., 1997). Следствием агрегирования развернутых Ig-доменов, например, в I-зоне саркомера, может быть аномально высокая жесткость молекул титина и, следовательно, миоцитов. Для предотвращения агрегации Ig-доменов в этой части молекулы с ними связываются малые шапероны (sHSPs). В частности, показано, что HSP27 и αβ-кристаллин не взаимодействуют с дистальными Ig-доменами, расположенными вблизи A-диска саркомера, но связываются с Ig-доменами растяжимой части молекулы титина, расположенной между Z-диском и PEVK (Kötter et al., 2014). Следует заметить, что эти Ig-домены в отличие от PEVK и N2-B-последовательностей, более склонны к агрегации в условиях частичной денатурации (Kötter et al., 2014).

В 2005 г. (Wright et al., 2005) при изучении агрегации между различными доменами титина был сделан вывод о том, что способность к агрегации возрастает, когда идентичность аминокислотных последовательностей между соседней парой 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 короткоживущих неправильно свёрнутых конформаций (Borgia et al., 2015). Моделирование также показало, что большая часть таких сформированных структур напоминает внутримолекулярное амилоидо-подобное состояние, названное «внутримолекулярные амилоиды» (Borgia et al., 2015). Авторы обратили внимание, что вышеуказанные структуры («внутримолекулярные амилоиды») формируются не зависимо от процента идентичности аминокислотных последовательностей между соседней парой доменов, однако время жизни этих форм у пары доменов с низкой идентичностью аминокислотной последовательности гораздо меньше. Авторы предположили, что приобретённое в процессе эволюции снижение идентичности в аминокислотной

последовательности между соседними доменами у мультидоменных белков необходимо для уменьшения время жизни потенциально опасных для организма амилоидных конформаций (Borgia et al., 2015).

Описанные литературные данные характеризуют титин и С-белок как интересные объекты для изучения процесса белковой агрегации.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Экспериментальный материал

Актин и миозин-связывающий белок С (С-белок) выделяли из скелетных мышц кролика. Все процедуры на животных были одобрены Комиссией по биоэтике и биологической безопасности (Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, разрешение № 30 от 10 сентября 2019 г.) в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента. Операции на кроликах проводили под анестезией Золетилом (Virbac Sante Animale, Carros, Франция) (4 мг/кг, внутримышечно).

Титин был получен из гладкомышечной ткани желудков курицы. Куриные желудки были приобретены с птицефабрики, расположенной недалеко от города Пущино (ООО «Шепиловская птицефабрика»), имеющей все необходимые лицензии на работу с животными, в частности, с курами.

Культуры клеток фибробластов и гладкомышечных клеток для исследования цитотоксичности амилоидных агрегатов получены в Лаборатории фармакологической регуляции и клеточной резистентности ИТЭБ РАН.

2.2. Выделение и очистка мышечных белков

2.2.1. Выделение титина из желудков курицы

Титин из гладких мышц желудков курицы выделяли по методу (Kim, Keller, 2002) с модификациями. Мышцы желудков гомогенизировали в трехкратном или пятикратном кратном (по отношению к массе мышц) объеме раствора, содержащего 50 мМ KCl, 2 мМ $MgCl_2$, 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 ФМСФ, 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 $MgCl_2$, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 0.5 мМ ДТТ, 0.2 мМ ФМСФ, 10 мМ имидазола, pH 7.0. Раствор также содержал 0.05 мМ леупептина. Экстракция проводилась на холоде при 4˚С 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 (~1.0-1.5 мл) «колоночного» буферного раствора, содержащего 0.6 М KCl, 30 мМ KH_2PO_4, 0.5 мМ ДТТ, 0.1 М NaN_3, 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. Скорость прохождения элюата составляла 4-7 мл/час. Концентрацию белка определяли спектрофотометрическим методом, используя $E_{280}^{1\ мг/мл} = 1.37$ (Trinick et al., 1984).

Были отдельно получены две изоформы титина с молекулярными массами 1500 кДа ($ГМТ_{ВМИ}$) и 500 кДа ($ГМТ_{НМИ}$).

2.2.2. Выделение С-белка из скелетных мышц кролика

Выделение С-белка из скелетных мышц кролика производилось по методу, описанному в работе (Offer et al., 1973). Мышцы гомогенизировали и миозин экстрагировали трёхкратным (по отношению к весу мышц) объемом раствора «Губа-Штрауба», содержащего 0.3 М KCl, 0.15 М К-фосфатный буферный раствор, 1 мМ ФМСФ, 20 мкг/мл ингибитора трипсина, pH 6.5. Экстракцию проводили при 4°С в течение 10–15 минут при непрерывном перемешивании, затем центрифугировали в течение 15 минут при 5000 g. Супернатант переосаждали 14-ти кратным объемом охлажденной бидистиллированной воды, содержащей 0.1 мМ ДТТ и 0.1 мМ NaN_3. Через 40–60 минут осадок миозина собирали центрифугированием в течение 30 минут при 2500g. К осадку добавляли раствор, содержащий 2 М KCl, 0.2 М К-фосфатный буфер, 4 мМ ЭДТА, pH 7.0, до конечной концентрации 0.5 М KCl, 0.05

М К-фосфатный буфер, 1 мМ ЭДТА, pH 7.0. После растворения осадка его разбавляли раствором, содержащим 0.5 М KCl, 0.05 М К-фосфатный буфер, 1 мМ ЭДТА, 0.1 мМ NaN_3, pH 7.0, до концентрации белка 10-12 мг/мл для последующего фракционирования сульфатом аммония.

К белковому раствору добавляли равный объем охлажденного до 4°С 2.8 М сульфата аммония (до 36% насыщения) в растворе, содержащем 0.5 М KCl, 0.05 М К-фосфатный буфер, 1мМ ЭДТА, pH 7.0, оставляли на 20–30 минут для формирования актомиозинового осадка и затем центрифугировали в течение 1 часа при 2500 g. К супернатанту добавляли насыщенный при 4°С раствор сульфата аммония до достижения 43% насыщения. Через 30 минут образовавшийся осадок, содержащий миозин и С-белок собирали центрифугированием в течение 1 часа при 2500 g. Затем осадок растворяли в 0.15 М К-фосфатном буферном растворе, pH 7.5, содержащем 10 мМ ЭДТА, 0.1 мМ ДТТ и 0.1 мМ NaN_3 и диализовали против этого же буферного раствора до полного удаления сульфата аммония.

Миозин, полученный после центрифугирования в течение 1 часа при 100000 g («доколоночный» миозин), содержал ~5% С-белка. Для их разделения «доколоночный» миозин подвергался ионообменной хроматографии на колонке с носителем DEAE-Sephadex A-50, уравновешенным колоночным буфером. С-белок элюировали в свободном объеме колонки и собирали для дальнейшей очистки.

В дальнейшем фракции С-белка (содержащие «быстрый» и «медленный» паралоги), полученные при хроматографической очистке миозина скелетных мышц на колонке с носителем DEAE-Sephadex A-50, концентрировали сульфатом аммония до степени насыщения 2.08 М и осаждали центрифугированием в течение 1 часа при 3000 g. Осадок растворяли в буфере, содержащем 0.3 М KCl, 4.8 мМ K_2HPO_4, 5.2 мМ KH_2PO_4, 0.1 мМ ДТТ, 0.1 мМ NaN_3, pH 7.0, и диализовали против этого буфера до полного удаления сульфата аммония. Разделение «быстрого» и «медленного» паралогов С-белка проводили на колонке с гидроксиапатитом, уравновешенным в этом же буфере. Для снятия белков с колонки использовали фосфатный градиент.

Концентрацию белков определяли спектрофотометрически с использованием спектрофотометра SPECORD UV VIS, используя следующие значения коэффициентов экстинкции (Е2801 мг/мл): 1.09 (Starr, Offer, 1982).

2.2.3. Выделение актина из скелетных мышц кролика

Для изучения токсического действия агрегатов титина и С-белка на культуры клеток в качестве контроля использовался фибриллярный актин.

Актин выделяли по методу, описанному в работе (Pardee, Spudich, 1982) из ацетонового порошка. Для приготовления ацетонового порошка использовали мышечный гомогенат после экстракции из него миозина раствором «Губа-Штрауба», содержащего 0.3 М KCl, 0.15 М K-фосфатный буферный раствор, 1 мМ ФМСФ, 20 мкг/мл ингибитора трипсина, pH 6.5. (см. п. 4.2.2). Далее гомогенат обрабатывали при постоянном перемешивании в течение 10 минут при 4°С раствором, содержащим 50 мМ $NaHCO_3$, с последующим центрифугированием в течение 10 минут при 5000 g. Осадок суспендировали при 4°С в растворе, содержащем 1 мМ ЭГТА, pH 7.0, перемешивали 10 минут и затем центрифугировали в течение 10 минут при 5000 g. Полученный осадок промывали в течение 5 минут дистиллированной водой при 4°С с последующим центрифугированием. Процедуру повторяли дважды. Далее осадок обрабатывали при комнатной температуре 5 раз по 10 минут предварительно охлажденным ацетоном и отжимали через марлю. Полученный остаток сушили при комнатной температуре в течение 10-12 часов. Высушенный остаток просеивали для отделения актинового порошка от стромы и хранили порошок при минус 20°С.

Актин экстрагировали из ацетонового порошка раствором, содержащим 2 мМ трис-HCl, 0.2 мМ NaАТФ, 0.5 мМ β-меркаптоэтанола, 0.2 мМ $CaCl_2$, pH 8.0, исходя из соотношения 20 мл экстрагирующего раствора на 1 г актинового порошка. Экстракцию проводили в течение 25 минут на льду при непрерывном перемешивании с последующим центрифугированием в течение 5 минут при 7000 g. Далее повторяли экстракцию с половинным количеством экстрагирующего раствора. Объединенные экстракты осветляли центрифугированием в течение 30 минут при 12000 g. После этого актин полимеризовали, добавляя раствор 3 М KCl до концентрации 50 мМ и раствор 1 М $MgCl_2$ до концентрации 2 мМ, и оставляли на 10-12 часов при 4°С. Далее к полимеризованному актину добавляли раствор 3 М KCl до концентрации 0.6 М и перемешивали в течение 1 часа при 4°С. Затем белок центрифугировали 2 часа при 100000 g. При этом полимеризованный актин осаждался, а сопутствующие примеси оставались в супернатанте. Осажденный

актин суспендировали в небольшом количестве исходного экстрагирующего раствора и диализовали против этого же раствора в течение 2-х суток для деполимеризации актина. Деполимеризованный актин осветляли центрифугированием в течение 2-х часов при 100000 g и снова полимеризовали, добавляя раствор 3 М KCl до конечной концентрации 0.1 М. Концентрацию актина определяли спектрофотометрическим методом, используя $E_{280}^{1\ мг/мл} = 1.09$.

Фибриллы актина (Ф-актин) для экспериментов по исследованию цитотоксичности гладкомышечного титина (ГМТ) в качестве контроля были сформированы диализом против раствора, содержащего 0.1 М KCl, 1 мМ ДТТ, 0.1 мМ NaN_3, pH 7.0 в течение 24 часов при 4°C.

2.3. ДСН гель-электрофорез титина и С-белка

Чистоту выделенного титина и С-белка проверяли методом ДСН-гель-электрофореза по методу (Fritz et al., 1989) с модификациями. В частности, в наших экспериментах был использован разделяющий гель с 6.5% содержанием полиакриламида при электрофоретическом анализе титина, и гель с 7.5% содержанием полиакриламида при электрофоретическом анализе С-белка. Гель также содержал 0.75 М трис-HCl буфер, pH 8.8, 0.1% ДСН, 10% глицерина, 0.05% тетраметилэтилендиамина и 0.05% персульфата аммония. Электродный буфер при проведении электрофореза содержал 0.192 М глицина, 0.025 М трис и 0.1% ДСН, pH 8.3. Электрофорез проводили при силе токе 5-7 мА первые 30–60 минут, после этого постепенно поднимали силу тока до 12-15 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 шейкере. Отмытые гели сканировали, а затем проводили денситометрический анализ и оценку молекулярных масс полос исследуемых белков с использованием компьютерной программы Total Lab v1.11. (Newcastle Upon Tyne, Великобритания) или Image Lab Software («Bio-Rad», США). В качестве образцов сравнения использовали белковые

маркеры различных молекулярных весов («PageRuler™ Prestained Protein Ladder», 10–180 kDa #26616 Thermo fisher scientific, США).

2.4. Масс-спектрометрия образцов титина и С-белка

Для подтверждения чистоты полученных препаратов С-белка, белковые фракции анализировали методом жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). Белки обрабатывали протеиназой К (Promega, США) и трипсином (Sigma, США). Затем смесь пептидов разделяли методом обращённо-фазовой хроматографии и анализировали на масс-спектрометре высокого разрешения OrbiTrap Elite ETD с орбитальной ловушкой (Thermo Scientific, Германия). Разность потенциалов между эмиттером и входным конусом 1.8 кВ; температура нагретого капилляра 200°С. Фрагментацию ионов проводили путем активации столкновений в высокоэнергетической ячейке (HCD) и диссоциации с переносом электрона (ETD). Массы ионов и фрагментов ионов регистрировались с разрешением 60 000 и 15 000 соответственно. Полученные спектры фрагментации обрабатывали с помощью программы PEAKS Studio 7.5 (Bioinformatics Solution Inc., Канада).

Для масс-спектрометрического анализа гладкомышечного титина образец солюбилизировали в буфере (4% додецилсульфат натрия в 0.1 М трис-HCl pH 7.6, 0.1 М ДТТ) и инкубировали в течение 5 мин при 95°С, как описано (Makhnovskii et al., 2020). Образцы обрабатывали ультразвуком (4 × 30 с при 20 Вт; ME220, Covaris, США), центрифугировали (5 мин, 16 000 × g) и собирали супернатант. Фильтр YM-30 (Millipore, Ирландия) использовали для алкилирования и трипсинолиза (14 ч, 2 мкг трипсина (Tripsin Gold, Promega, США)) по методу FASP (Wiśniewski et al., 2009). Пептиды обессоливали с помощью микроколонок С18 и подвергали ВЭЖХ-МС/МС анализу с использованием системы HPLC Ultimate 3000 RSLCnano (Thermo Scientific, США) согласно описанию (Makhnovskii et al., 2020).

2.5. Вестерн-блот анализ очищенных образцов титина и С-белка

Для оценки чистоты препаратов титина и С-белка проводили ДСН-электрофорез выделенных образцов этих белков в 6.5% ПААГ по методу (Fritz et al., 1989) с модификациями, описанными выше. В качестве контроля на гель были нанесены гомогенат белков гладкой мышцы желудка курицы и гомогенат белков скелетной (m. Soleus и m. Psoas) мышцы кролика. Раствор для проб, в котором находились белки перед нанесением на гель, имел конечную концентрацию следующих веществ: 0.125 М Трис HCl, 10% глицерин, 4% ДСН, 4 М мочевины, 10% β-меркаптоэтанол, 0.001% бромфеноловый синий, pH 6.8. Перенос белков на PVDF мембрану проводили по методу (Towbin et al., 1989). В частности, перенос белков из геля на PVDF-мембраны проводили в течение 24 ч. Затем мембраны блокировали в PBS с 5% сухого молока, 0.05% Tween 20, pH 7.4 в течение 1 ч. Гибридизацию с первичными антителами проводили при комнатной температуре в течение 2 ч. В работе использовались следующие первичные антитела: моноклональные 9D10-c (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 ч со вторичными антителами против IgG мышей, конъюгированными с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США)**.** Для определения С-белка использовались поликлональные anti-MYBPC1/anti-MYBPC2 антитела кролика (M-190), sc-67353 (Santa cruz biotechnology, США). В качестве вторичных антител использовали антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США).

2.6. Лиофилизация титина, С-белка и их агрегатов

Для изучения цитотоксичности, а также для проведения исследований методами рентгеновской дифракции, ИК-Фурье и ДСК препараты белков или их агрегаты были лиофилизированы с целью последующего их разведения с нужной концентрацией. В образцы белков, растворенных в буферном растворе (колоночный буферный раствор), добавлялся 1% трегалозы, после чего они замораживались при

температуре минус 80°C. В случае с агрегатами обоих белков, в них ничего не добавлялось. Агрегаты подвергались заморозке при температуре минус 80°C в растворах, в которых происходила их агрегация. Далее образцы подвергались лиофилизации в лиофильной сушке FreeZone 1L (Labconco, США) при температуре минус 56°C и давлении 0.013 мБ. Контроль деградации белка после лиофилизации осуществлялся при помощи электрофореза, описанного в пункте 4.2.4.

2.7. Условия формирования агрегатов титина и С-белка

Для получения агрегатов ГМТ (м.м. 500 кДа), очищенный белок в «колоночном» буферерном растворе (0.6 М KCl, 2 мМ $MgCl_2$, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 0.5 мМ ДТТ, 0.2 мМ ФМСФ, 10 мМ имидазола, pH 7.0) диализовали в течение 3 и 24 часов при 4°C против растворов, содержащих 0.2 М KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0 и 0.15 М глицина-KOH, pH 7.0 в целлюлозной мембране (Sigma-Aldrich) (размером пор 25×16 мм).

Для получения агрегатов ГМТ (м.м. 1500 кДа), очищенный белок в «колоночном» буферерном растворе (0.6 М KCl, 2 мМ $MgCl_2$, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 0.5 мМ ДТТ, 0.2 мМ ФМСФ, 10 мМ имидазола, pH 7.0) диализовали в течение 1 часа и 24 часов при 4°C против раствора, содержащего 0.15 М глицина-KOH, pH 7.0 в целлюлозной мембране (Sigma-Aldrich) (размером пор 25×16 мм). Способность к дезагрегации белка исследовалась после диализа обоих типов агрегатов титина против буферного раствора (0.6 М KCl, 2 мМ $MgCl_2$, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 0.5 мМ ДТТ, 0.2 мМ фенилметилсульфонилфторида, 10 мМ имидазола, pH 7.0).

Для получения агрегатов С-белка очищенный белок в колоночном буфере (0.3 М KCl, 4.8 мМ K_2HPO_4, 5.2 мМ KH_2PO_4, 0.1 мМ ДТТ, 0.1 мМ NaN_3, pH 7.0) диализовали против раствора, содержащего 0.15 М глицина-KOH, pH 7.0 в целлюлозной мембране (Sigma-Aldrich) (размером пор 25×16 мм) 24 часа при 4°C.

Для изучения цитотоксичности агрегатов С-белка белок в буфере, содержащем 0.3 М KCl, 4.8 мМ K_2HPO_4, 5.2 мМ KH_2PO_4, 0.1 мМ ДТТ, 0.1 мМ NaN_3, pH 7.0, при начальной концентрации ~5 мг/мл переносился в раствор, содержащий 0.15 М глицин-KOH, pH 7.0. Образец разбавляли при 5°C в течение 10 мин для постепенного снижения ионной силы (разбавление в 10 раз до конечной

концентрации ~0.5 мг/мл). Затем для разделения олигомеров и агрегатов образцы центрифугировали при 15000 об/мин в течение 10 мин. Предполагалось, что в остатке преобладали агрегаты, а в супернатанте преимущественно олигомеры. Олигомеры дополнительно инкубировали в течение следующих 24 ч для получения олигомеров максимального размера.

2.8. Динамическое рассеяние света

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, содержащем 0.6 М KCl, 2 мМ $MgCl_2$, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 0.5 мМ ДТТ, 0.2 мМ ФМСФ, 10 мМ имидазола, pH 7.0 (колоночный буфер), принимали за начальную точку агрегации (0 мин). Поскольку вязкость препаратов белка варьировала из-за разного буферного состава, а расчеты размеров частиц на основе ДРС зависят от вязкости, отдельно измеряли вязкость буферных растворов исследуемых образцов. 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 сП*г/см^3. После измерения плотности раствора (1.025 г/см^3) мы рассчитали значение динамической вязкости (1.36 сП). Эта величина была принята во внимание при измерениях размеров частиц в образцах титина. Произведение динамической вязкости по плотности раствора (1 г/см^3), содержащего титин в буферном растворе, содержащем 0.15 М глицина-KOH, pH 7.0, составляло 0.92 сП*г/см^3. Соответственно значение динамической вязкости составляло 0.92 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 уравновешивания (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.

Для исследования агрегации С-белка, образец белка в буферном растворе, содержащем 0.3 М KCl, 4.8 мМ K_2HPO_4, 5.2 мМ KH_2PO_4, 0.1 мМ ДТТ, 0.1 мМ NaN_3, pH 7.0, при начальной концентрации 1 мг/мл и объеме 100 мкл, был перенесён в раствор, содержащий 0.15 М глицин-КОН, pH 7.0 (объемом 900 мкл), путем постепенного разбавления до конечной концентрации 0.1 мг/мл для снижения ионной силы. Разбавление проводили медленно (в течение 5 мин) при температуре 4°С. Анализ проводили в течение 24 ч.

2.9. Просвечивающая электронная микроскопия

Для приготовления электронно-микроскопических образцов использовали препараты белков с концентрацией 0.05-0.1 мг/мл. 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 JEM-100B при ускоряющем напряжении 100 кВ и увеличении 20000-40000х. Увеличение микроскопа было тестировано по паракристаллам парамиозина с периодичностью 14.5 нм.

2.10. Атомно-силовая микроскопия

Для исследования агрегатов белков во всех случаях исследуемые образцы выдерживали на слюде в течение 5 мин, затем дважды промывали в течение 30 сек водой, сушили газообразным азотом и анализировали структуру полученных комплексов методом 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 ГМТ (м.м. 1500 кДа) и его олигомеров 10-20 мкл образца титина, разведенного в буферном растворе, содержащим 0.6 М KCl, 2 мМ $MgCl_2$, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 0.5 мМ ДТТ, 0.2 мМ ФМСФ, 10 мМ имидазола, pH 7.0, наносили на поверхность свежесколотой слюды и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем, чтобы убрать несвязанные молекулы белков, а также соль, поверхность промывали дистиллированной водой и сушили газообразным азотом. Изображения титина и его олигомеров, связанных с поверхностью слюды, были получены с помощью прибора Cypher ES AFM (Asylum Research, Санта-Барбара, Калифорния, США). Измерения проводились в полуконтактном (постукивающем) режиме. Сканирование проводили при 0.8-1.2 В, чтобы избежать прилипания образца к кончику кантилевера. Для сканирования использовались кантилеверы из нитрида кремния (Olympus) (AC160TS, резонансная частота ~300 кГц). При типичной частоте сканирования 0.7-1.4 Гц мы получали изображения с разрешением 512 × 512 пикселей или 1024 × 1024 пикселей с высотным, амплитудным и фазово-контрастным изображением. 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).

Для исследования поверхностей стёкол, покрытых амилоидными агрегатами ГМТ, образцы агрегатов ГМТ, а также образцы неагрегированного титина (в

качестве контроля) наносили на свежесколотую слюду или стекло на 5 мин, промывали деионизированной водой (Milli-Q) и сушили газообразным азотом. Изображения получали на атомно-силовом микроскопе SmartSPMTM 1000 (АИСТ-НТ, Москва, Россия) с кантилеверами fpN11 (НИИПП, Зеленоград, Россия), с радиусом кривизны острия 10–25 нм). Измерения проводились в полуконтактном (постукивающем) режиме с резонансной частотой 120–190 кГц. Для расчетов среднеквадратичной шероховатости поверхности (RMS) использовалось программное обеспечение Gwyddion (Чешский институт метрологии, Брно, Чехия).

2.11. Флуоресцентный анализ с красителем тиофлавином Т

Амилоидная природа агрегатов титина и С-белка оценивалась по интенсивности флуоресценции ТТ (1 ТТ: 5 титина или С-белка (w/w)). Флуоресценцию измеряли при λex=440 нм и λem=488 нм с использованием спектрофотометра Cary Eclipse (Varian, США). Спектр препарата белка измеряли пять раз и столько же раз прописывали спектр буфера.

2.12. Круговой дихроизм

Спектры кругового дихроизма до и после образования агрегатов ГМТ и С-белка регистрировали на спектрополяриметре Jasco J-815 (JASCO Inc., Токио, Япония), используя кварцевые кюветы с длиной оптического пути 0.1 см. Спектры кругового дихроизма измерялись в диапазоне длин волн 250–190 нм.

Для каждого исследуемого образца брали три повторения спектра. Обработку данных и графическое представление проводили в программе SigmaPlot. По спектру поглощения рассчитывали точную концентрацию белка по формуле: C = ABS280/l/Ke (где ABS280 – величина поглощения на длине волны 280 нм, l – длина оптического пути в см, Ke – коэффициент экстинкции).

Три спектра в дальней УФ области, полученные для каждого исследуемого образца, были усреднены и сглажены в программном обеспечении спектрополяриметра (Spectra Manager Version 2, Spectra Analysis Version 2.02.06 (Build 1) Spectra Analysis Jasco). Аналогичную процедуру проделали для трех

спектров, полученных для каждого буферного раствора исследуемых образцов отдельно. Из полученного усредненного спектра исследуемого образца вычитали усредненный спектр буферного раствора. Значение молярной эллиптичности [Θ] рассчитывали по формуле:

$$[\Theta]\lambda = \Theta\,\lambda \cdot RMW/l \cdot c$$

где Θ λ – измеренное значение эллиптичности на длине волны λ, миллиградусы; RMW – средняя молекулярная масса остатка, рассчитанная по аминокислотной последовательности; *l*, – длина оптического пути, мм; *c*, – концентрация белка, мг/мл.

Вторичную структуру рассчитывали с помощью модуля CONTIN/LL программы CDPro (Sreerama, Woody, 2000). Среднеквадратичное отклонение (СКО) по программе CDPRO не превышало 6%.

2.13. Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье

Измерения проводились на ИК-Фурье спектрометре Nicolet 6700 (Thermo Scientific, США), оснащенным приставкой Smart Proteus с Пельтье-контролируемым кюветодержателем в режиме пропускания в кювете из кристаллического фторида кальция с оптическим путем 4 мкм, используя MCT детектор (охлаждение жидким азотом). Сканирование проводилось в диапазоне волновых чисел от 650 $см^{-1}$ до 4 000 $см^{-1}$ с разрешением 1 $см^{-1}$, 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°C. Концентрация белка составляла 36-42 мг/мл. Белок и его агрегаты были сконцентрированы путем разведения лиофилизированного образца в наименьшем количестве буферного раствора. Оптический путь кюветы из CaF_2 рассчитывали для каждого измерения, исходя из величины оптической плотности исследуемого образца на 3404 $см^{-1}$, 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±0.04) мкм. ИК спектр препарата белка измеряли два раза и столько же раз 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 CO_2 с последующим анализом в диапазоне волновых чисел 1725-1481 $см^{-1}$ на предмет содержания элементов вторичной структуры в белке, следуя принципам, описанным в работе (Goormaghtigh et al., 2009). Полученные оценки содержания элементов вторичной структуры в белке усредняли. Приведены стандартные отклонения величин содержания элементов вторичной структуры в белке.

2.14. Синхротронное малоугловое рентгеновское рассеяние

Измерения синхротронного малоуглового рентгеновского рассеяния (СМУРР) проводили на источнике с длиной волны 1.503 Å (Фотонная фабрика Национальной лаборатории физики высоких энергий, Цукуба, Япония). Раствор белка помещали в термостатируемую ячейку с окнами из слюды объемом 30 мкл. Данные регистрировали с помощью детектора 2D CCD X-ray детектор. Фоновый сигнал от буферного раствора регистрировали до или после анализа раствора белка. Поправку на разницу в электронной плотности (контраст) между белком и растворителем, а также на искажения изображения и нелинейность вносили согласно стандартным методикам. Расстояние между образцом и детектором составляло 1.85 м, диапазон значений вектора рассеяния Q составлял 0.01-0.2 $Å^{-1}$ (где $Q=4\pi\sin\theta/l$ и 2θ – угол рассеяния). В качестве стандарта с известной молекулярной массой и размерами использовали бычий сывороточный альбумин. Форму частиц оценивали по тангенсу угла наклона log I к log Q, где I – интенсивность рассеяния, Q – модуль вектора рассеяния (Feigin, Svergun, 1987). Зависимости log I–log Q в данных СМУРР аппроксимировали линейной регрессией. Коэффициенты корреляции (R^2) колебались от 0.92 до 0.99. Для расчетов использовали программы SAXTIM и SigmaPlot 2000.

2.15. Рентгеновская дифракция

Агрегаты титина и С-белка для рентгеноструктурного анализа полученные после 24-часовой инкубации при 4°С в соответствующих растворах, описанных в п.4.2. лиофилизировались согласно п.4.1.7. Лиофилизированные агрегаты белков растворялись в минимальном объёме деионизированной воды (Milli-Q) до концентрации> 10 мг/мл. Капли полученных препаратов белка помещали между концами покрытых воском стеклянных капилляров (диаметром ~1 мм), разделенных примерно на 1.5 мм для дальнейшего высушивания на воздухе. Это необходимо для выравнивания фибрилл. Буферные растворы (контроль) помещали в специальные стеклянные капилляры “для рентгеновской дифракции”. Дифракционные изображения были получены, используя Microstar X-ray генератор с оптикой HELIOX, который оснащен Platinun135 CCD детектором (X8 Proteum system, Bruker AXS). Использовалось Cu Kα-излучение с λ = 1.54 Å (1 Å = 0.1 нм). Образцы располагали под прямым углом к рентгеновскому лучу с использованием четырехосного каппа-гониометра.

2.16. Дифференциальная сканирующая калориметрия

Исследование стабильности ГМТ методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) проводили на прецизионном сканирующем микрокалориметре СКАЛ-1 (Scal Co. Ltd, Россия) со стеклянными кюветами объемом 0.33 мл при скорости сканирования 1 град/мин и давлении 2.5 атм (Senin et al., 2000). Опыты проводили в 0.15 М растворе глицин–КОН при pH 7.0–7.5. Концентрация белка составляла 1.2 мг/мл. Измерения проводились при давлении 2 атм. Сбор данных производился автоматически с температурным шагом 0.1°К. Экспериментальные калориметрические следы были скорректированы по калориметрической базовой линии, а парциальные молярные функции теплоемкости были рассчитаны стандартным способом. Избыточную теплоемкость оценивали путем вычитания линейно экстраполированных функций начальной и конечной теплоемкости с поправкой на разность этих функций по сигмоидальной базовой линии (Privalov et al., 1986). Эксперименты ДСК проводились 2 раза как для мономерной, так и для

агрегированной формы ГМТ. Полученные кривые совпали по температуре Tm с точностью до 0.1°К. Относительная погрешность определения калориметрической энтальпии ΔHcal не превышала 10%.

2.17. Исследование цитотоксичности

Агрегаты ГМТ и С-белка для исследования цитотоксичности, полученные после 24-часовой инкубации при 4°С в соответствующих растворах, описанных в п.4.2., лиофилизировались согласно п.4.1.7.

Цитотоксическое действие агрегатов гладкомышечного титина и С-белка исследовали на гладкомышечных клетках аорты крысы, с использованием окраски клеток кристаллическим фиолетовым (Nomizu et al., 1995). Для этого клетки высевали на 96-луночные планшеты и культивировали в среде ДМЕМ/F12 (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10% ФСБ (Gibco, США), 40 мкг/мл сульфата гентамицина (Sigma-Aldrich, США), при 37°С и в атмосфере с 5% содержанием CO_2 до состояния конфлюента. Затем клетки выдерживали в течение 2 часов в среде ДМЕМ/F12 без сыворотки и добавляли гладкомышечный титин и С-белок в молекулярной и агрегированной формах, а также Ф-актин в качестве контроля. Цитотоксический эффект агрегатов ГМТ и С-белка оценивали по отношению разности между оптической плотностью в опыте и фоном к разности между оптической плотностью в контроле и фоном через 72 ч инкубации. Оптическая плотность была пропорциональна количеству живых клеток. Измерение проводили с использованием планшетного спектрофлуориметра Infinite F200 (Tecan, Австрия).

2.18. Конфокальная микроскопия

Гладкомышечные клетки аорты крысы высаживались на покровные стекла, которые помещались в 6-луночные микропланшеты. Через сутки после посева, среда ДМЕМ/F12 (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10% ФСБ (Gibco, США) и 40 мкг/мл сульфата гентамицина (Sigma-Aldrich, США) заменялась на среду без сыворотки. После выдерживания в течение 2 часов в среде без сыворотки, добавляли агрегированный гладкомышечный титин, а также Ф-актин в качестве контроля.

После 48 ч инкубирования при 37°С и в атмосфере с 5% содержанием CO_2 клетки трижды промывали холодным ФСБ и фиксировали 4% параформальдегидом в течение 2 часов при комнатной температуре. Далее клетки обрабатывали 0.1% раствором сапонина (Sigma Aldrich, США) для образования мембранных пор. Окрашивание цитоскелетного Ф-актина гладкомышечных клеток аорты крысы проводили в среде следующего состава: ФСБ, 1% БСА, 0.25 нМ Phalloidin Atto 488 (Sigma Aldrich, США) в течение 25 мин в темноте при комнатной температуре. Ядра клеток окрашивали Hoechst 33342 (1мкг/мл) (Sigma Aldrich, США). Затем клетки промывали 6 раз раствором ФСБ. Далее образцы высушивали на воздухе и закрепляли синтетической монтирующей средой Bio Mount (Bio-Optica, Milano s.p.a.). Образцы исследовали с использованием конфокального микроскопа TCS SP5 (Leica, Германия).

2.19. Световая микроскопия

Мезинхимальные стволовые клетки пульпы зуба человека (МСК ПЗЧ) высаживались в 96-луночный планшет, подвергались воздействию амилоидных агрегатов титина в течение 72 часов, затем образцы клеток в контроле и в присутствии агрегатов белка (500 мкг/мл) были исследованы с использованием флуоресцентной станции Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Япония).

2.20. Исследование влияния амилоидных агрегатов титина на адгезию фибробластов

Для исследования адгезии клеток были использованы фибробласты кожи человека. Фибробласты кожи человека культивировали в среде для культивирования (концентрация клеток – 5×10^4 клеток/мл). Модифицированные стеклянные подложки (10×10 мм^2) помещали в 9-луночные культуральные планшеты и стерилизовали УФ-облучением в течение 30 мин. Затем стекла заливались клеточной средой ДМЕМ/F-12. Фибробласты кожи человека культивировали в среде ДМЕМ/F-12 (Sigma Aldrich, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США) и 40 мкг/мл гентамицина при 37 °С в условиях 5%

содержания CO_2 в атмосфере в течение 48 и 72 часов. Далее после 48 и 72 ч инкубирования при 37°C и в атмосфере с 5% содержанием CO_2 клетки трижды промывали холодным ФСБ и фиксировали 4% параформальдегидом в течение 2 часов при комнатной температуре. Далее клетки обрабатывались 0.1% раствором сапонина (Sigma Aldrich, США), для формирования мембранных пор. Окрашивание цитоскелетного Ф-актина клеток проводили в среде следующего состава: ФСБ, 1% БСА, 0.25 нМ Phalloidin Atto 488 (Sigma Aldrich, США) в течение 25 мин в темноте при комнатной температуре. Ядра клеток окрашивали Hoechst 33342 (1 мкг/мл) (Sigma Aldrich, США). Затем клетки промывали 6 раз раствором ФСБ. Далее образцы высушивали на воздухе и закрепляли синтетической монтирующей средой Bio Mount (Bio-Optica, Milano s.p.a.). Образцы исследовали с использованием конфокального микроскопа TCS SP5 (Leica, Германия).

2.21. Расчет идентичности аминокислотной последовательности и неструктурированных участков титина и С-белка

С помощью программы BLAST рассчитывалась идентичность аминокислотной последовательности титина и С-белка. С помощью программы (алгоритма) IsUnstruct вычислялось предсказание неупорядоченности в структуре исследуемых белков (Necci et al., 2021). Данные для «медленного» паралога С-белка, С белка сердечной мышцы, а также титина курицы были взяты из базы данных UniProtKB – Q00872 (MYBPC1_HUMAN), Q14324 (MYBPC1_HUMAN), Q14896 (MYBPC1_HUMAN), G1TKC1 (MYBPC1_RABBIT), G1SGU7 (MYBPC3_RABBIT), A6BM71 (TTN_CHICK). Данные для «быстрого» паралога С-белка были взяты из базы данных NCBI GenPept database: 655902480 (MYBPC2_RABBIT).

Идентичность рассчитывалась по формуле:

$$Id = 2 \cdot N_{id} / (L_1 + L_2)$$

Где, N_{id}, количество идентичных аминокислотных остатков в выравнивании, L, количество остатков в домене.

2.22. Статистическая обработка данных

Результаты, полученные в экспериментах по цитотоксичности, статистически оценивали с помощью критерия Манна-Уитни с доверительной вероятностью ≤ 0.05. Представленные данные представляют собой средние значения (M) и стандартные ошибки (m).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИИ И ДИНАМИКИ АГРЕГАЦИИ ГМТ И С-БЕЛКА

3.1.1. Идентификация ГМТ и С-белка

3.1.1.1. ДСН-гель электрофорез, вестерн-блоттинг и ВЭЖХ-МС/МС С-белка

Известно, что два паралога миозин-связывающего белка С («медленный» и «быстрый») в скелетных мышцах кодируются отдельными генами с разными профилями экспрессии. Так называемый «медленный» скелетный миозин-связывающий белок С кодируется *MYBPC1*, а «быстрый» скелетный миозин-связывающий белок С (С-белок) кодируется *MYBPC2* (McNamara, Sadayappan, 2018). Основной отличительной особенностью гена *MYBPC1* по сравнению с *MYBPC2* является высокий уровень сплайсинга, которому может подвергаться его транскрипт (Ackermann, Kontrogianni-Konstantopoulos, 2013). У людей и мышей описано не менее 14 транскриптов, кодирующих «медленный» скелетный миозин-связывающий С-белок, при этом молекулярные массы его изоформ составляют ~126 кДа и 132 кДа (Ackermann, Kontrogianni-Konstantopoulos, 2010; Ackermann, Kontrogianni-Konstantopoulos, 2013).

В нашей работе необходимо было выяснить, с каким паралогом С-белка будут вестись дальнейшие исследования. На полученном нами геле препарата очищенного С-белка видны 2 белковые полосы, которые, по всей вероятности, являются одним из паралогов этого белка и его продуктом деградации (Рис. 8 А). Молекулярная масса верхней полосы белка составила ~134 кДа, а его содержание от общего количества С-белка составило ~82%. Молекулярная масса белка, находящегося в полосе, которая расположена ниже, составила ~125 кДа и его общее содержание – ~18%. Анализ ВЭЖХ-МС подтвердил, что полученные белковые препараты являются «быстрым» паралогом С-белка (85% перекрытия последовательностей).

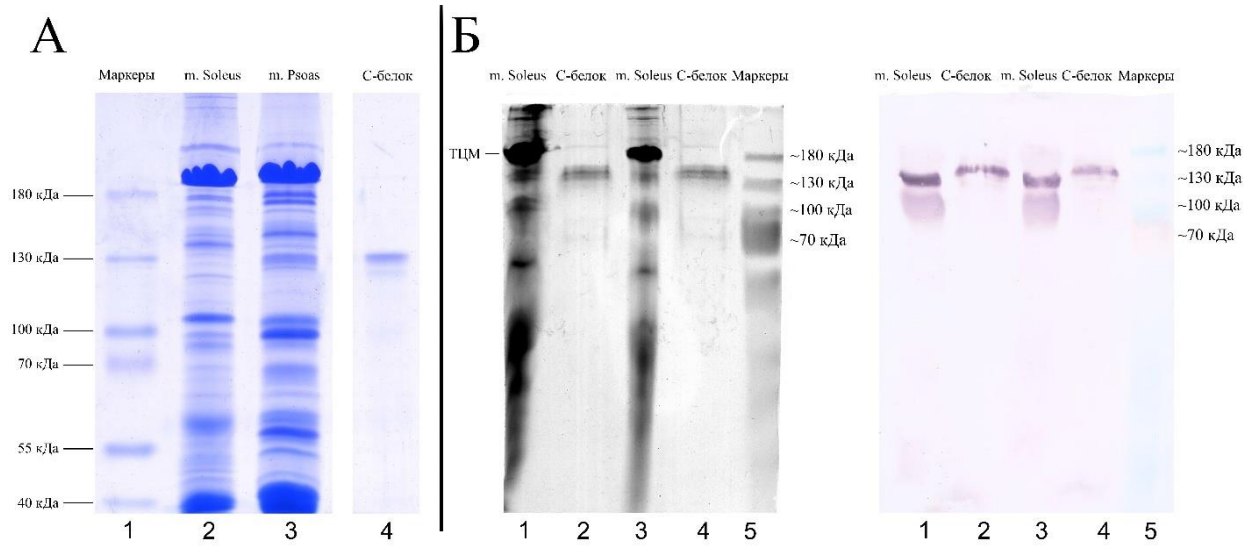


Рис. 8. А – ДСН-гель-электрофорез очищенного С-белка, изолированного из скелетных мышц кролика (4 дорожка). «Медленную» скелетную мышцу m. Soleus (2 дорожка) и «быструю» скелетную мышцу m. Psoas (3 дорожка) кролика использовали в качестве контроля. Использовали также белковые маркеры с молекулярными массами в диапазоне 15-180 кДа (1 дорожка). Б – ДСН-гель-электрофорез (левая часть рисунка) и вестерн-блот анализ (правая часть рисунка) «быстрого» паралога С-белка скелетных мышц кролика. ДСН-гель-электрофорез и вестерн-блот анализ препарата очищенного С-белка (2 и 4 дорожки левой и правой частей риунка). 1 и 3 дорожки – m. soleus кролика (контроль). Белковые маркеры с молекулярными массами в диапазоне 15-180 кДа (5 дорожка). Молекулярный вес «быстрого» паралога С-белка скелетных мышц кролика на основании его электрофоретической подвижности составил 125-134 кДа (данные денситометрического анализа с использованием программного обеспечения Total Lab v1.11). Вестерн-блот С-белка был выполнен с использованием моноклональных антител anti-MYBPC2. ТЦМ – тяжелые цепи миозина (м.м. 205 кДа). Воспроизведено из работы (Bobyleva et al., 2021), выполненной при участии автора диссертации.

Проведенный вестерн-блоттинг с использованием моноклональных антител anti-MYBPC1 и anti-MYBPC2 также идентифицировал «быстрый» паралог скелетномышечного С-белка (Рис. 8 Б). Таким образом, на основании полученных данных мы сделали вывод, что исследуемый нами белок является «быстрым» паралогом скелетномышечного С-белка.

3.1.1.2. ДСН-гель электрофорез, вестерн-блоттинг и ВЭЖХ-МС/МС гладкомышечного титина

На геле в препарате очищенного титина гладких мышц (Рис. 9 А (средняя и правые дорожки)) видны полосы, соответствующие, по данным денситометрии, титину с молекулярной массой ~1500 кДа (средняя дорожка) и с молекулярной массой ~500 кДа (правая дорожка) (Рис. 9 А). Мы показали, что наши образцы кроме самого титина содержат еще ~10% низкомолекулярной примеси. Соответственно чистота выделенного белка составляет ~90%. Данные вестерн-блоттинга с использованием моноклональных антител 9D10 подтвердили, что очищенный белок с м.м. 500 кДа является титином (Рис. 9 Б).

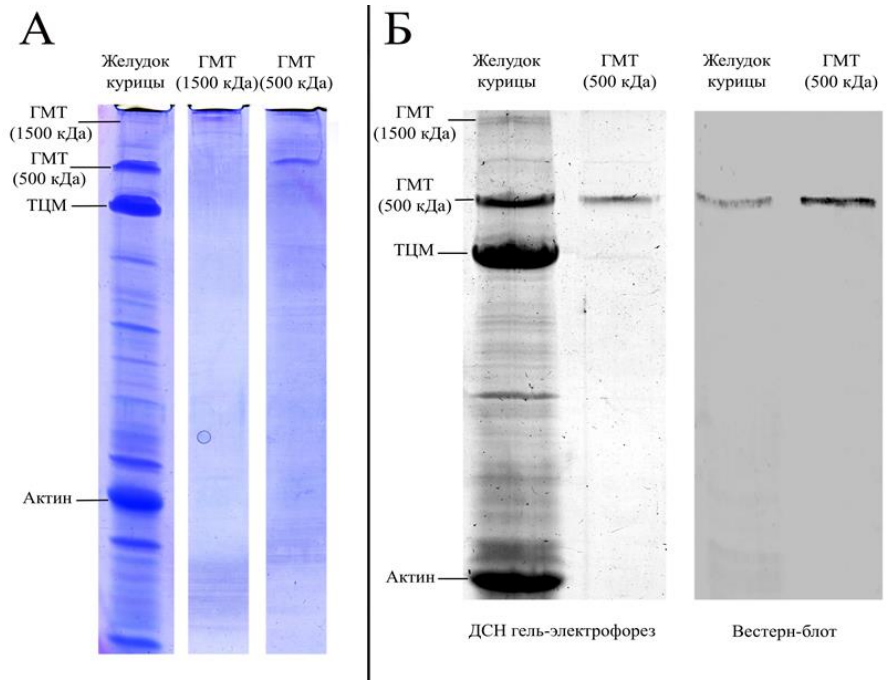


Рис. 9. А – ДСН-гель-электрофорез препарата желудка курицы (левая дорожка) и очищенного ГМТ с м.м. 1500 кДа и 500 кДа (средняя и правая дорожки). Молекулярные массы белков приведены в соответствии с проведенным денситометрическим анализом с использованием программного обеспечения Total Lab v1.11. На геле показаны ТЦМ – тяжелые цепи миозина (м.м. 205 кДа) и актин (м.м. 42 кДа); Б – ДСН-гель-электрофорез (левая часть рисунка) и вестерн-блот анализ (правая часть рисунка) препарата желудка курицы и очищенного ГМТ с м.м. 500 кДа. Вестерн-блот анализ титина в экстракте желудка курицы и препарате очищенного гладкомышечного титина был выполнен с применением антител 9D10. Воспроизведено из работы (Bobylev et al., 2016), выполненной при участии автора диссертации.

Из-за относительно низкого количества высокомолекулярной изоформы ГМТ (м.м. 1500 кДа) не удалось идентифицировать этот белок с помощью вестерн-блот анализа. Поэтому был проведен масс-спектрометрический анализ очищенных препаратов титина, который подтвердил наличие этого белка в образцах.

Таким образом, полученные результаты показали, что объектами исследования были следующие белки: «быстрый» паралог миозин-связывающего белка С (С-белок), высокомолекулярная изоформа гладкомышечного титина (м.м. 1500 кДа, $ГМТ_{ВМИ}$) и низкомолекулярная изоформа гладкомышечного титина (м.м. 500 кДа, $ГМТ_{НМИ}$).

3.1.2. Исследование динамики агрегации ГМТ и С-белка методом ДРС

3.1.2.1. Исследование динамики агрегации $ГМТ_{НМИ}$

Для исследования динамики образования агрегатов исследуемых белков нами был выбран метод ДРС. Это наиболее удобный метод изучения динамики агрегации белков, в том числе амилоидных (Hill et al., 2009).

На рисунке 10 показано изменение автокорреляционной функции рассеянного света при формировании агрегатов $ГМТ_{НМИ}$ в течение 180 минут, в растворе, содержащем 0.15 М глицин–КОН при pH 7.0. Обнаружено, что в течение первых 60 минут инкубации наблюдается почти одноэкспоненциальное затухание автокорреляционной функции $g_1(t)$ (Рис. 10 А) с последующим появлением плеча на больших временных интервалах времени задержки корреляции. Это указывает на процесс формирования крупных агрегатов белка, характеризующихся меньшим коэффициентом диффузии. После 180 минут кривая корреляционной функции $g_1(t)$ имела еще более выраженное плечо на больших временных интервалах задержки, что указывает на увеличение доли агрегатов $ГМТ_{НМИ}$.

На рисунке 10 также приведены графики, показывающие присутствие определенного количества размерных фракций с разными гидродинамическими радиусами (Rh), представленные для конкретного времени агрегации (0, 20, 60, 180 мин и 21 час). Выбранное время агрегации, представленное на графике (Рис. 10 Б), отражает наиболее важные этапы агрегации и формирует представление о динамике

агрегации ГМТ$_{НМИ}$. При этом в препаратах неагрегированного (молекулярного) ГМТ$_{НМИ}$ наблюдалось присутствие только двух размерных фракций, имеющих средние (Rh) ~12-13 нм (~90%) и 45 нм (~10%). Первая размерная фракция, по всей вероятности, соответствует молекулам ГМТ$_{НМИ}$, в то время как второй пик может указывать на наличие олигомерных форм данного белка.

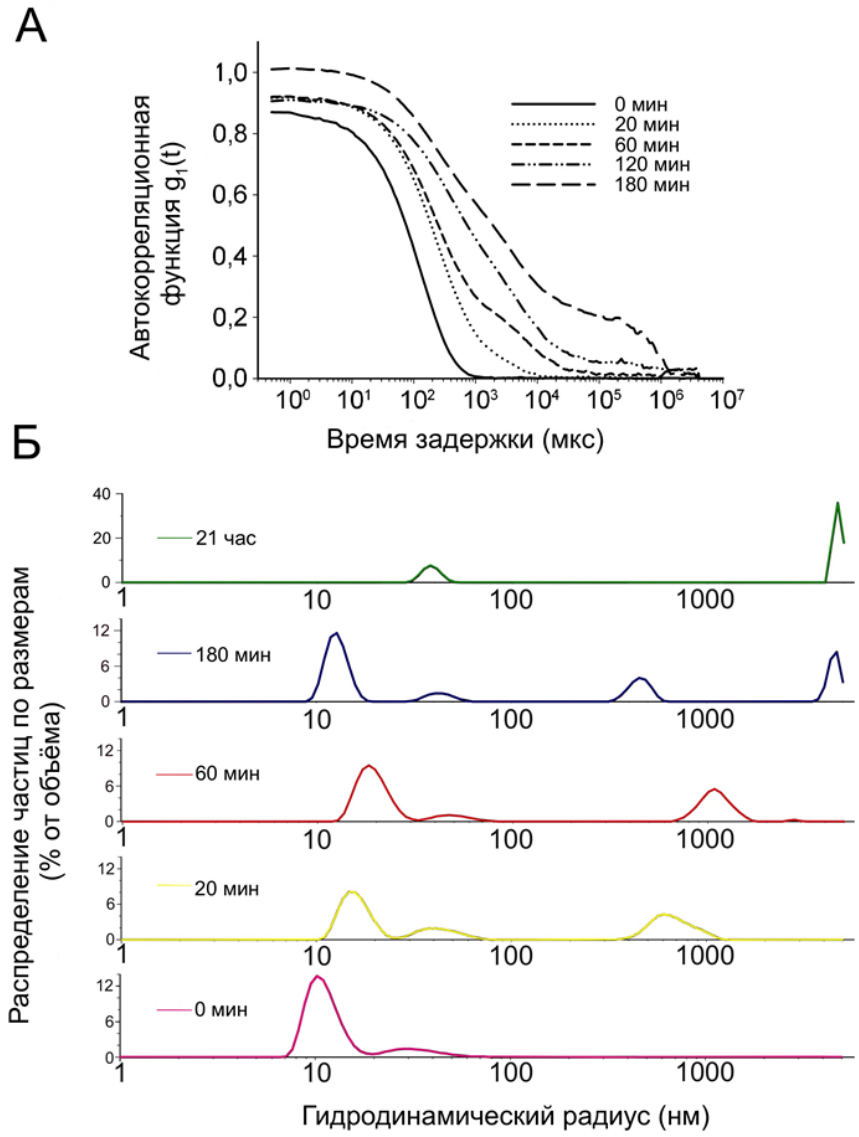


Рис. 10. Исследование динамики агрегации ГМТ$_{НМИ}$ методом ДРС. А – автокорреляционная функция рассеянного света в разные временные интервалы агрегации ГМТ$_{НМИ}$. Б – Распределение частиц по размеру. Показано образование агрегатов и их рост во времени. Условия агрегации: 0.15 М глицин–КОН при pH 7.0. Измерения проводились при T=25°C. Воспроизведено из работы (Bobylev et al., 2016), выполненной при участии автора диссертации.

После 20 минут агрегации наблюдалось появление третьей размерной фракции с Rh ~700 нм (Рис. 10 Б), что свидетельствует об относительно высокой скорости агрегации этого белка. Далее наблюдается рост данной размерной фракции относительно времени агрегации. Через 180 мин появляется размерная фракция с гидродинамическим радиусом Rh ~4500 нм, что указывает на появление стабильной фракции более крупных агрегатов белка, а размер частиц уже не детектируется.

Через 21 час агрегации $ГМТ_{НМИ}$ наблюдалось присутствие двух основных белковых фракций с Rh ~4500 нм (основная размерная фракция, соответствующая наиболее крупным агрегатам белка) и с Rh ~40 нм (по всей видимости является фракцией стабильных олигомеров).

3.1.2.2. Исследование динамики агрегации $ГМТ_{ВМИ}$

На рисунке 11 показано изменение автокорреляционной функции рассеянного света при формировании агрегатов $ГМТ_{ВМИ}$ в течение 60 минут в растворе, содержащем 0.15 М глицин–КОН при pH 7.0. В течение первых 20 мин инкубации наблюдалось почти одноэкспоненциальное затухание автокорреляционной функции $g_1(t)$ с последующим появлением плеча на больших временных интервалах времени задержки корреляции (Рис. 11 А). Это свидетельствует об образовании крупных агрегатов, характеризующихся меньшими коэффициентом диффузии.

Через 40 мин автокорреляционная функция $g_1(t)$ характеризовалась бóльшим временем затухания и более выраженным плечом при более высоких временных интервалах времени задержки корреляции, что свидетельствовует об увеличении агрегации. Выраженное плечо автокорреляционной функции также наблюдалось в течение 40, 50 и 60 мин инкубации (Рис. 11 А).

На рисунке 11 также приведены графики, показывающие присутствие размерных фракций $ГМТ_{ВМИ}$ с разными Rh, представленные для конкретного времени агрегации (0, 20, 40, 50, 60 мин). Выбранное время агрегации, представленное на графике (Рис. 11 Б), на наш взгляд, отражает наиболее важные этапы агрегации и формирует представление о динамике агрегации $ГМТ_{ВМИ}$. В образце, содержащем неагрегированную форму $ГМТ_{ВМИ}$ (на графике 0 мин), наблюдались только два хорошо разрешенных пика, представляющие собой

размерные фракции со средним Rh ~16 нм (доминирующий пик ~73%) и 86 нм (второстепенный пик ~27%). Первый пик (основной) соответствует, скорее всего, молекулам $ГМТ_{ВМИ}$, тогда как второй (минорный) может соответствовать олигомерам белка. Далее, в течение уже первых 20 мин агрегации $ГМТ_{ВМИ}$ наблюдалось появление размерной фракции с Rh ~479 нм, что свидетельствует о развитии процесса агрегации этого белка (Рис. 11 Б).

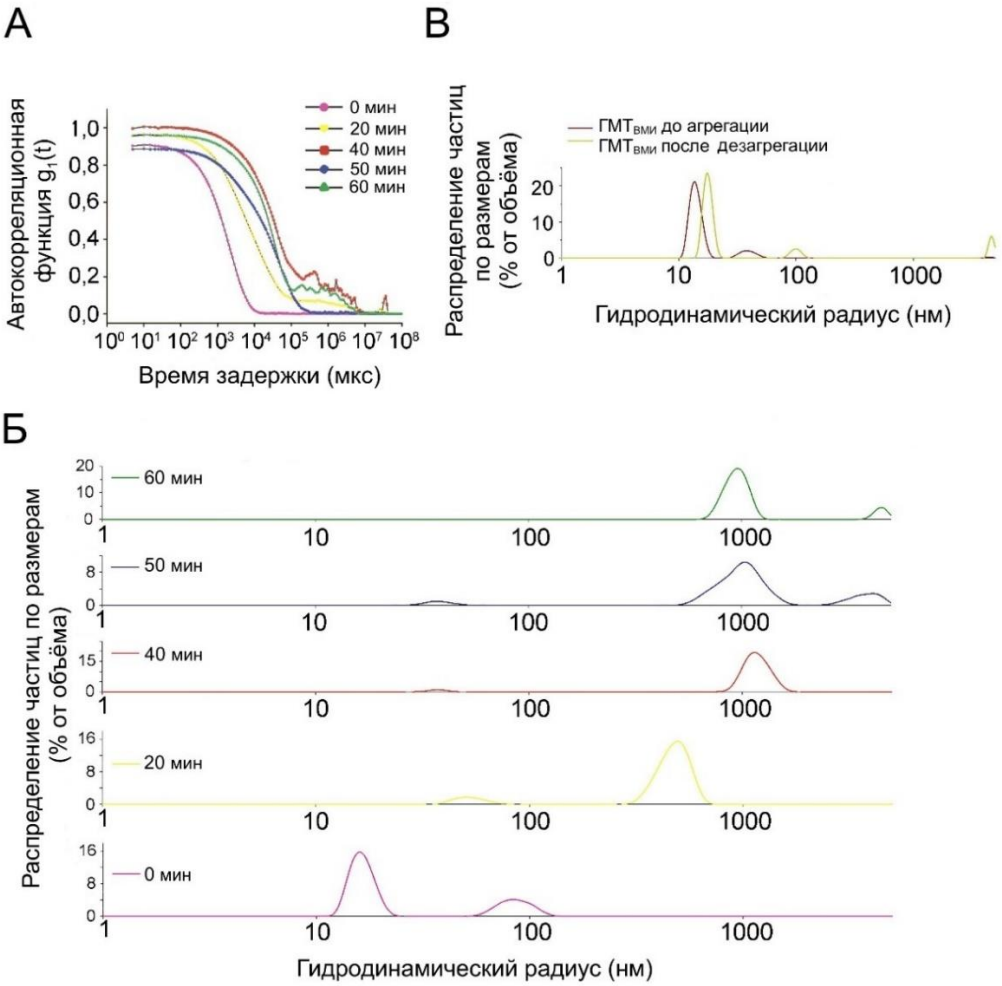


Рис. 11. Исследование динамики агрегации $ГМТ_{ВМИ}$ методом ДРС. А – автокорреляционная функция рассеянного света в разные временные интервалы агрегации $ГМТ_{НМИ}$. Б – Распределение частиц по размеру. Показано образование агрегатов и их рост во времени. В – распределение частиц $ГМТ_{ВМИ}$ после дезагрегации в течение 60 мин. Приведены два графика с распределениями частиц по размеру молекулярной формы $ГМТ_{ВМИ}$ и после дезагрегации в течение 60 мин (белок был предварительно агрегирован также в течение часа). Условия агрегации: 0.15 М глицин–КОН при pH 7.0. Измерения проводились при T=25°C. Воспроизведено из работы (Bobylev et al., 2023), выполненной при участии автора диссертации.

Через 40 мин эксперимента появилась устойчивая размерная фракция более крупных агрегатов $ГМТ_{ВМИ}$ с гидродинамическим радиусом ~1175 нм (96.7%). Эта размерная фракция наблюдалась также через 50 и 60 мин агрегации (Рис. 11 Б). И наконец пик, характеризующий размерную фракцию с Rh ~4500 нм, представляющий собой наиболее крупные агрегаты ГМТ, появляется через 50 мин агрегации. А через 60 мин агрегации уже не наблюдался пик (Rh ~50 нм), который, по всей видимости, представлял собой олигомерную форму белка $ГМТ_{ВМИ}$.

Таким образом, процесс агрегации высокомолекулярной изоформы ГМТ от начала до формирования наиболее крупных частиц завершился уже к 60 минуте агрегации. Следует отметить, что скорость агрегации до появления наиболее крупных агрегатов (Rh ~4500 нм) у $ГМТ_{ВМИ}$ больше (50 мин) по сравнению со скоростью агрегации $ГМТ_{НМИ}$ (180 мин).

Одной из наших следующих задач при изучении динамики агрегации стало выяснение способности ГМТ к обратимой агрегации (дезагрегации). Методом ДРС были получены данные, которые свидетельствуют о способности $ГМТ_{ВМИ}$ дезагрегировать (Рис. 11 В). После часа агрегации в растворе, содержащем 0.15 М глицин–КОН при pH 7.0, образец агрегированного $ГМТ_{ВМИ}$ был помещён в буферный раствор, содержащий 0.6 М KCl, 30 мМ KH_2PO_4, pH 7.0 (раствор, в котором обычно содержится молекулярная форма белка). Через 60 мин. наблюдалось уменьшение доли частиц с большими гидродинамическими радиусами и – увеличение числа частиц с меньшими гидродинамическими радиусами (Рис. 11 В).

Здесь следует отметить, что для $ГМТ_{НМИ}$ способность к дезагрегации в подобных условиях обнаружена не была. Следовательно, отличительными особенностями высокомолекулярной изоформы гладкомышечного титина относительно низкомолекулярной его изоформы являются: способность агрегировать за более короткие временные интервалы и способность к дезагрегации.

3.1.2.3. Исследование динамики агрегации С-белка

Следующей целью нашего исследования было выяснение динамики агрегации С-белка. Динамика агрегации отличалась от таковой, полученной для ГМТ. На рисунке 12 (А) показано изменение автокорреляционной функции рассеянного света при формировании агрегатов С-белка в течение 1040 минут (более 17 часов), в растворе, содержащем 0.15 М глицин–КОН при pH 7.0. Важно отметить, что интенсивная агрегация наблюдалась уже в первые 0-5 мин после снижения ионной силы до заданных значений. На это указывает одноэкспоненциальное затухание автокорреляционной функции $g_1(t)$ с последующим появлением плеча на больших временных интервалах времени задержки корреляции (Рис. 12А).

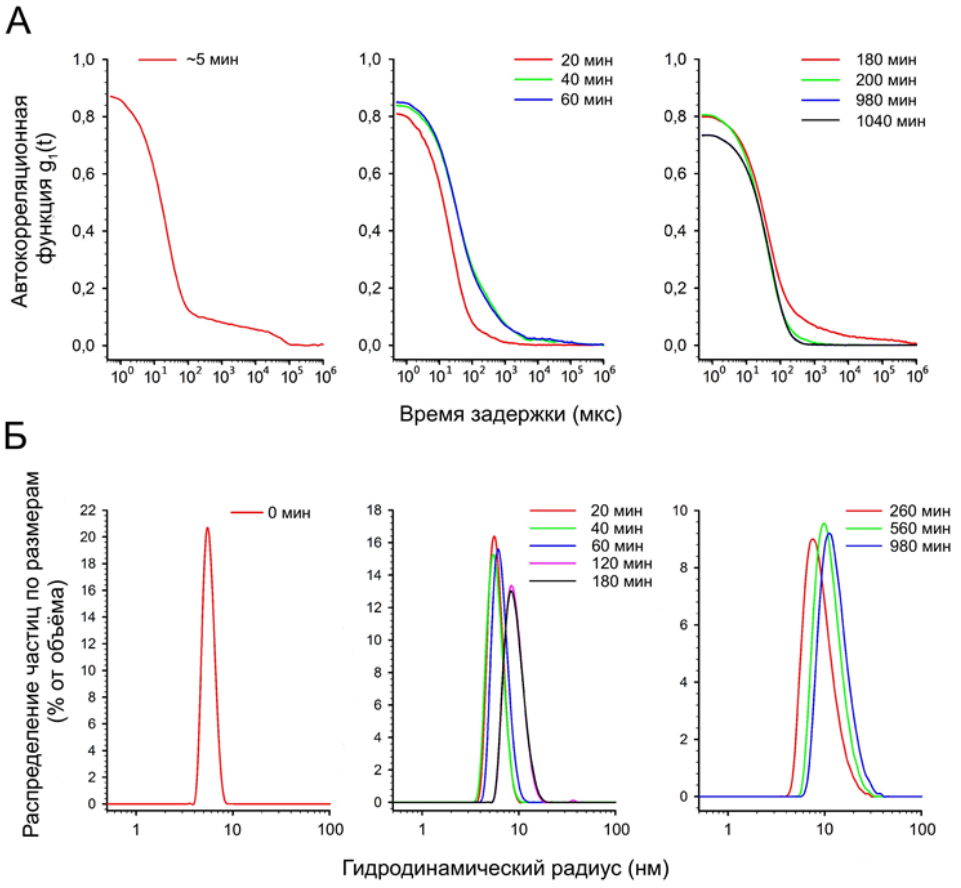


Рис. 12. Исследование динамики агрегации С-белка методом ДРС. А – автокорреляционная функция рассеянного света в разные временные интервалы агрегации С-белка. Б – Распределение частиц по размеру. Показано образование агрегатов и их рост во времени. Условия агрегации: 0.15 М глицин–КОН при pH 7.0. Измерения проводились при T=10°C. Воспроизведено из работы (Bobyleva et al., 2021), выполненной при участии автора диссертации.

Это свидетельствует об образовании крупных агрегатов с меньшим коэффициентом диффузии. При этом, забегая наперёд, пик на графике размерных фракций, который соответствует этому времени корреляции, мы зафиксировать не смогли. Это связано, по всей видимости, с появлением в первые минуты агрегации крупных частиц, не входящих в измерительный диапазон данного метода. А наблюдаемый нами далее незначительный рост размерной фракции, вероятно, и что было в дальнейшем подтверждено, указывает на фракцию олигомеров этого белка.

Небольшое плечо на больших временных интервалах времени задержки корреляции наблюдалось также через 40, 60 и 180 минут агрегации, а к 200 минуте данное плечо исчезало. Это указывает на процесс формирования относительно крупных агрегатов (олигомеров) белка, характеризующихся меньшим коэффициентом диффузии. Таким образом, мы наблюдали вторую волну агрегации (олигомеризации) С-белка, которая происходила в интервале 20–200 мин.

На рисунке 12 (Б) приведена серия графиков, показывающих присутствие всего одной размерной фракции С-белка, представленных для разных временных интервалов агрегации (5, 20-180, 260-980 мин). До образования агрегатов наблюдался только один хорошо разрешенный пик, представляющий собой размерную фракцию со средним гидродинамическим радиусом Rh ~5.6 нм (~99.9%). Этот пик соответствует, скорее всего, молекулам С-белка (Рис. 12 Б (0 мин)).

Мы наблюдали одну преобладающую размерную фракцию (~99.0%) в течение всего времени измерения (Рис. 12 Б). Установлено, что за период 20-980 мин этот пик, представляющий собой размерную фракцию, смещается в сторону увеличения размера до Rh ~13 нм. Через 980 мин Rh этой размерной фракции перестал увеличиваться. Мы предполагаем, что увеличение этой размерной фракции (от Rh ~5.6 нм до Rh ~13 нм) связано с образованием олигомеров С-белка. Если считать, что образующиеся агрегаты/олигомеры имеют сферическую форму, то олигомеры (Rh ~13 нм) состоят из ~10-12 мономеров, исходя из того, что Rh ~5.6 нм это размер одной молекулы С-белка.

Таким образом, можно заключить, что в отличие от титина С-белок в первые минуты агрегации формирует наиболее крупные частицы, которые седиментируют и не участвуют в дальнейшем измерении, а зафиксированная нами дальнейшая агрегация является образованием и ростом фракции стабильных олигомеров.

Поэтому, С-белок по сравнению с ГМТ имеет более высокую скорость агрегации. Также необходимо учитывать в целом, что скорость агрегации, показанная для всех исследуемых объектов, является относительно высокой. Ещё один вывод, который можно сделать – это отсутствие как такового лаг периода и стадии зародышеобразования. Это является отличительной особенностью для процесса агрегации исследуемых мышечных белков.

3.1.3. Исследование морфологии агрегатов ГМТ и С-белка

3.1.3.1. Исследование морфологии агрегатов $ГМТ_{НМИ}$ методами ПЭМ и АСМ

Исходя из полученных методом ДРС данных, для приготовления образцов при исследовании морфологии агрегатов ГМТ и С-белка методом АСМ и ПЭМ были выбраны определённые временные точки. Для $ГМТ_{ВМИ}$ это 1 час и 24 часа агрегации, для $ГМТ_{НМИ}$ – 3 часа и 24 часа агрегации, для С-белка – 5-10 мин и 24 часа агрегации.

На рисунке 13 представлены электронные микрофотографии аморфных агрегатов $ГМТ_{НМИ}$, сформированных в течение 3 часов (Рис. 13 А) и 24 часов (Рис. 13 Б). Можно отметить, что аморфные агрегаты, сформированные в течение 24 часов, состоят из более крупных частиц (Рис. 13 Б), чем агрегаты, которые сформированы в течение 3 часов (Рис. 13 А).

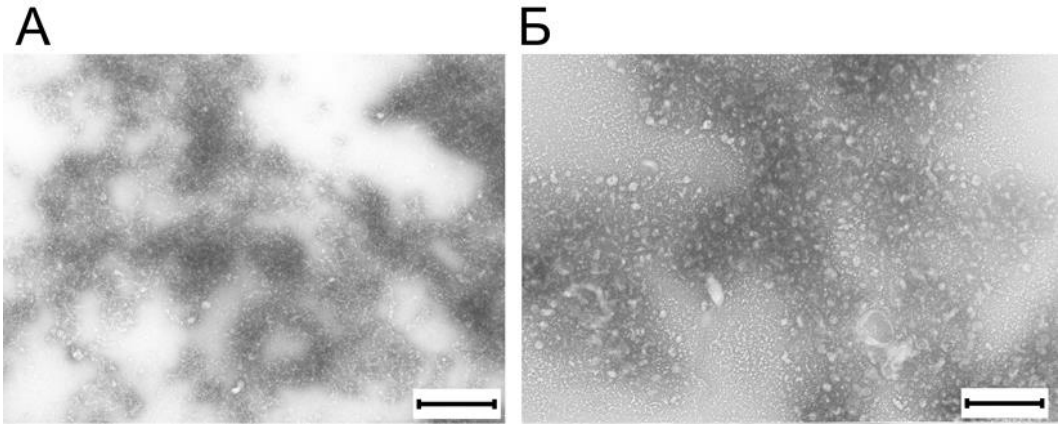


Рис. 13. ПЭМ негативно окрашенных агрегатов $ГМТ_{НМИ}$. А – Аморфные агрегаты $ГМТ_{НМИ}$, сформированные в течение 3 часов; Б – Аморфные агрегаты $ГМТ_{НМИ}$, сформированные в течение 24 часов. Условия формирования агрегатов: 0.15 М глицин–КОН, pH 7.0, 4°С. Для окрашивания использовался 2% водный раствор уранилацетата. Шкала 500 нм. Воспроизведено из работы (Bobylev et al., 2020), выполненной при участии автора диссертации.

По данным АСМ на полученных изображениях агрегатов $ГМТ_{НМИ}$, сформированных в течение 3 часов, наблюдались скопления частиц сферической формы до 4 мкм в ширину и до 400 нм в высоту (Рис. 14 А). При этом диаметр отдельных крупных сферических частиц составлял ~1 мкм. Наблюдались также и другие более мелкие (ветвящиеся) агрегаты, высота которых составляла ~45-50 нм, а диаметр ~2-3 мкм (Рис. 14 А (красная стрелка)). Данные агрегаты в свою очередь также состоят из более мелких сферических частиц диаметром 50-70 нм. Агрегаты $ГМТ_{НМИ}$, сформированные в течение 24 часов, по данным АСМ представляли собой разветвленные цепи, состоящие из сферических агрегатов диаметром ~300-500 нм и высотой до 35-40 нм (Рис. 14 Б). По-видимому, наблюдаемые короткие ветвящиеся структуры после 3 часов агрегации (Рис. 14 А (стрелка)), являются предшественниками крупных ветвящихся структур (Рис. 14 Б).

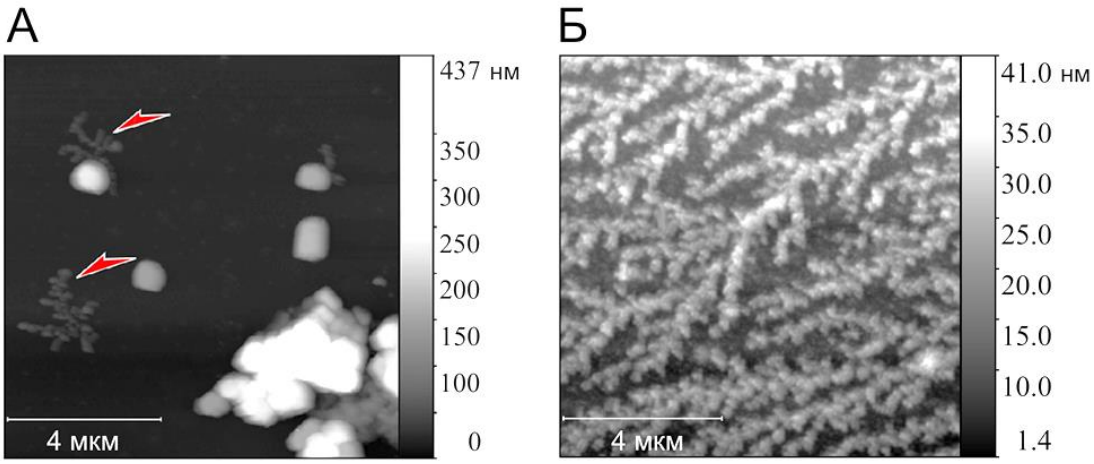


Рис. 14. АСМ агрегатов $ГМТ_{НМИ}$. А – Аморфные агрегаты $ГМТ_{НМИ}$, сформированные в течение 3 часов; Б – Аморфные агрегаты $ГМТ_{НМИ}$, сформированные в течение 24 часов. Условия формирования агрегатов: 0.15 М глицин–КОН, pH 7.0, 4°C. Воспроизведено из работы (Yakupova et al., 2018), выполненной при участии автора диссертации.

Здесь следует отметить, что изображения агрегатов $ГМТ_{НМИ}$, полученные методами АСМ и ПЭМ, отличаются. В частности, на снимках ПЭМ мы не видим той упорядоченности, что на изображениях, полученных методом АСМ. Связано это с особенностями методов исследования и подготовки образцов. Поэтому, применение двух данных методов в комплексе позволяет получить больше информации об исследуемом объекте, так как методы дополняют друг друга.

3.1.3.2. Исследование морфологии агрегатов ГМТ$_{ВМИ}$ методами ПЭМ и АСМ

На рисунке 15 представлены электронные микрофотографии аморфных агрегатов ГМТ$_{ВМИ}$, сформированных в течение 1 часа (Рис. 15 А) и 24 часов (Рис. 15 Б, В). Также, как и в случае с ГМТ$_{НМИ}$ (Рис. 13 Б), аморфные агрегаты ГМТ$_{ВМИ}$, сформированные в течение 24 часов, состояли из более крупных частиц, чем агрегаты, которые были сформированы в течение 1 часа.

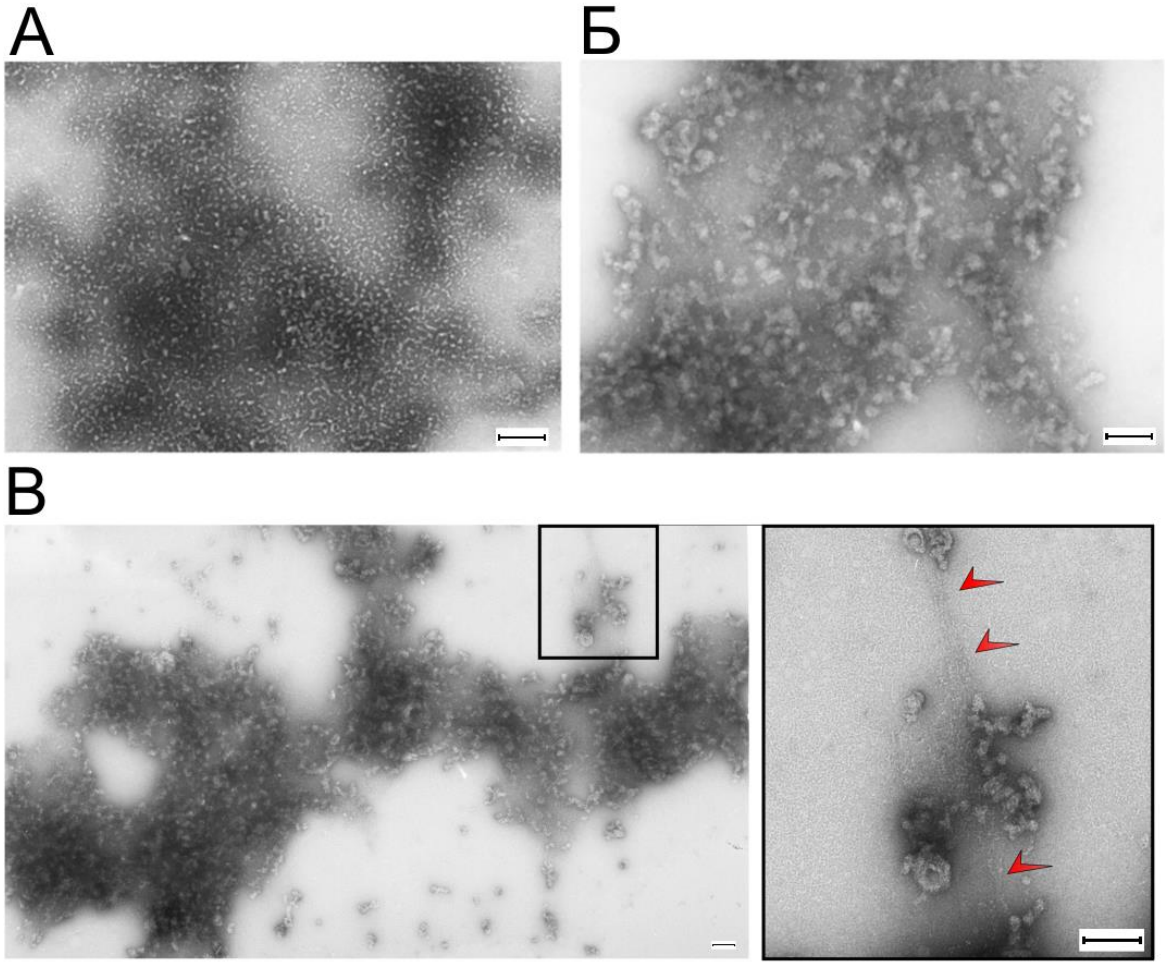


Рис. 15. ПЭМ негативно окрашенных агрегатов ГМТ$_{ВМИ}$. А – Аморфные агрегаты ГМТ$_{НМИ}$, сформированные в течение 1 часа; Б – Аморфные агрегаты ГМТ$_{ВМИ}$, сформированные в течение 24 часов; В – Аморфные агрегаты ГМТ$_{ВМИ}$, сформированные в течение 24 часов, у которых показано наличие белковых нитей диаметром ~4 нм между аморфными агрегатами (показаны красными стрелками на вставке). Условия формирования агрегатов: 0.15 М глицин–КОН, pH 7.0, 4°C. Для окрашивания использовался 2% водный раствор уранилацетата. Шкала 100 нм. Воспроизведено из работы (Bobylev et al., 2023), выполненной при участии автора диссертации.

В ряде случаев между аморфными агрегатами наблюдались нитевидные структуры диаметром ~4 нм (представленные, по всей видимости, молекулами титина) (Рис. 15 В). Таким образом, можно предположить, что при агрегации $ГМТ_{ВМИ}$ в процессе формирования межмолекулярных связей участвует не вся молекула белка.

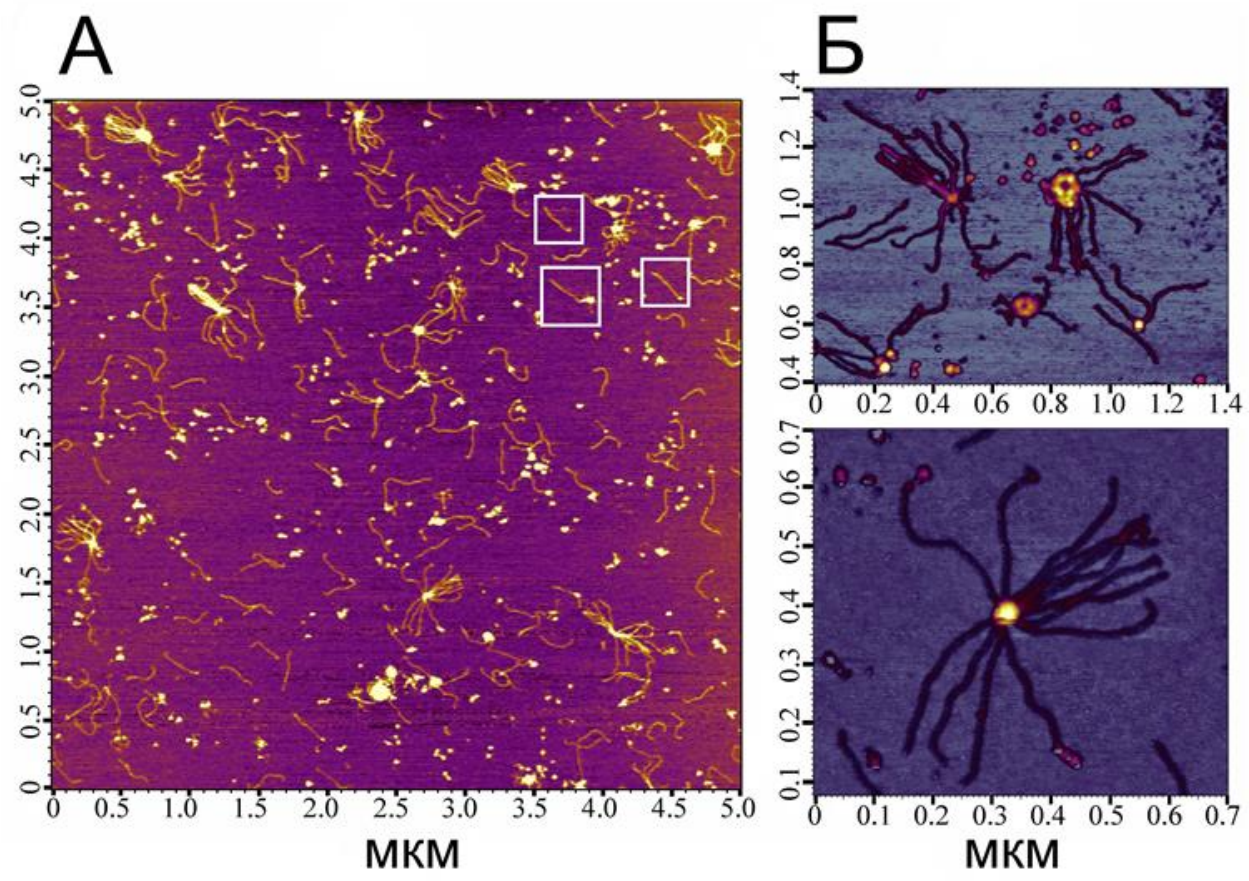


Рис. 16. АСМ молекул $ГМТ_{ВМИ}$ в колоночном буфере (0.6 М KCl, 2 мМ $MgCl_2$, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 0.5 мМ ДТТ, 0.2 мМ ФМСФ, 10 мМ имидазола, pH 7.0). А – Отдельно лежащие нитевидные молекулы $ГМТ_{ВМИ}$ (некоторые отмечены внутри белых прямоугольников) и олигомеры; Б – олигомеры $ГМТ_{ВМИ}$. Воспроизведено из работы (Bobylev et al., 2023), выполненной при участии автора диссертации.

На основании данных ДРС, представленных выше, для того чтобы идентифицировать размерную фракцию Rh=86 нм (Рис. 11 Б (0 мин)), составляющую существенную объёмную долю (27%), мы провели исследование неагрегированной формы $ГМТ_{ВМИ}$ методом АСМ высокого разрешения (Рис. 16). Было обнаружено, что, как и в случае с титином поперечно-полосатых мышц (Kellermayer et al., 2003; Tskhovrebova, Trinick, 2003; Вихлянцев и др., 2011), молекулы $ГМТ_{ВМИ}$ имеют форму нити толщиной 3–4 нм и длиной ~300 нм (в среднем) с шаровидной головкой на одном конце нити (Рис. 16 А (внутри белых квадратов)). Однако кроме отдельных молекул обнаружены и олигомеры этого белка, представляющие собой несколько молекул $ГМТ_{ВМИ}$, связанных друг стругом в одной точке (центре олигомера) (Рис. 16 Б). Подобные олигомеры были обнаружены ранее в препаратах титина, выделенных из скелетных мышц кролика (Kellermayer et al., 2003).

По данным АСМ после 1 ч агрегации $ГМТ_{ВМИ}$ наблюдались крупные аморфные структуры длиной в несколько микрометров и высотой до 350 нм (Рис. 17 А). Через 24 ч агрегации они имели вид ветвящихся уплощенных структур длиной более 10 мкм и высотой 200–250 нм (Рис. 17 Б, В).

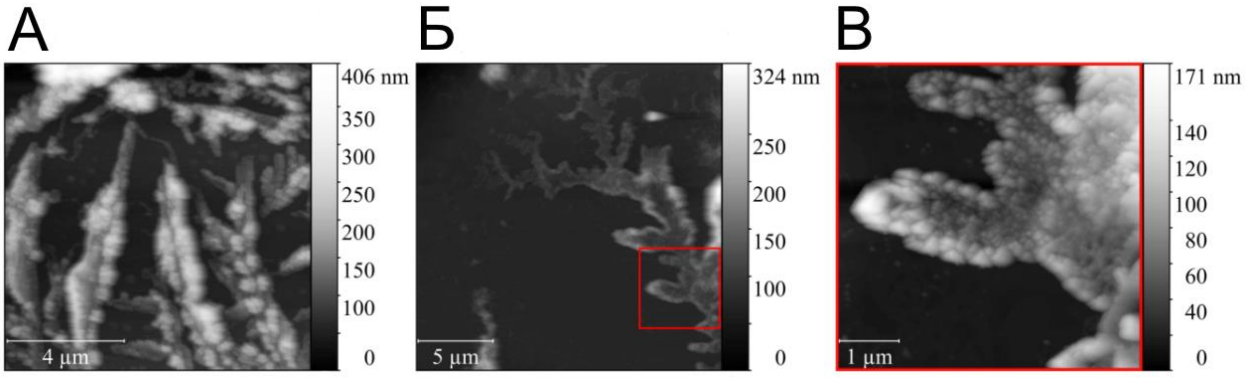


Рис. 17. АСМ агрегатов $ГМТ_{ВМИ}$. А – Аморфные агрегаты $ГМТ_{ВМИ}$, сформированные в течение 1 часа; Б, В – Аморфные агрегаты $ГМТ_{ВМИ}$, сформированные в течение 24 часов. Условия формирования агрегатов: 0.15 М глицин–КОН, pH 7.0, 4°C. Воспроизведено из работы (Bobylev et al., 2023), выполненной при участии автора диссертации.

3.1.3.3. Исследование морфологии агрегатов С-белка методами ПЭМ и АСМ

На рисунке 18 представлены электронные микрофотографии аморфных агрегатов С-белка, сформированных в течение ~5 мин (Рис. 18 А) и 24 часов (Рис. 18 Б). В отличие от ГМТ, аморфные агрегаты С-белка, сформированные в течение 5 мин и 24 часов, имели приблизительно одинаковый размер частиц. Также можно отметить, что на электронных микрофотографиях агрегатов, сформированных в течение 24 часов, помимо аморфных агрегатов присутствуют олигомеры диаметром ~40 нм (Рис. 18 Б).

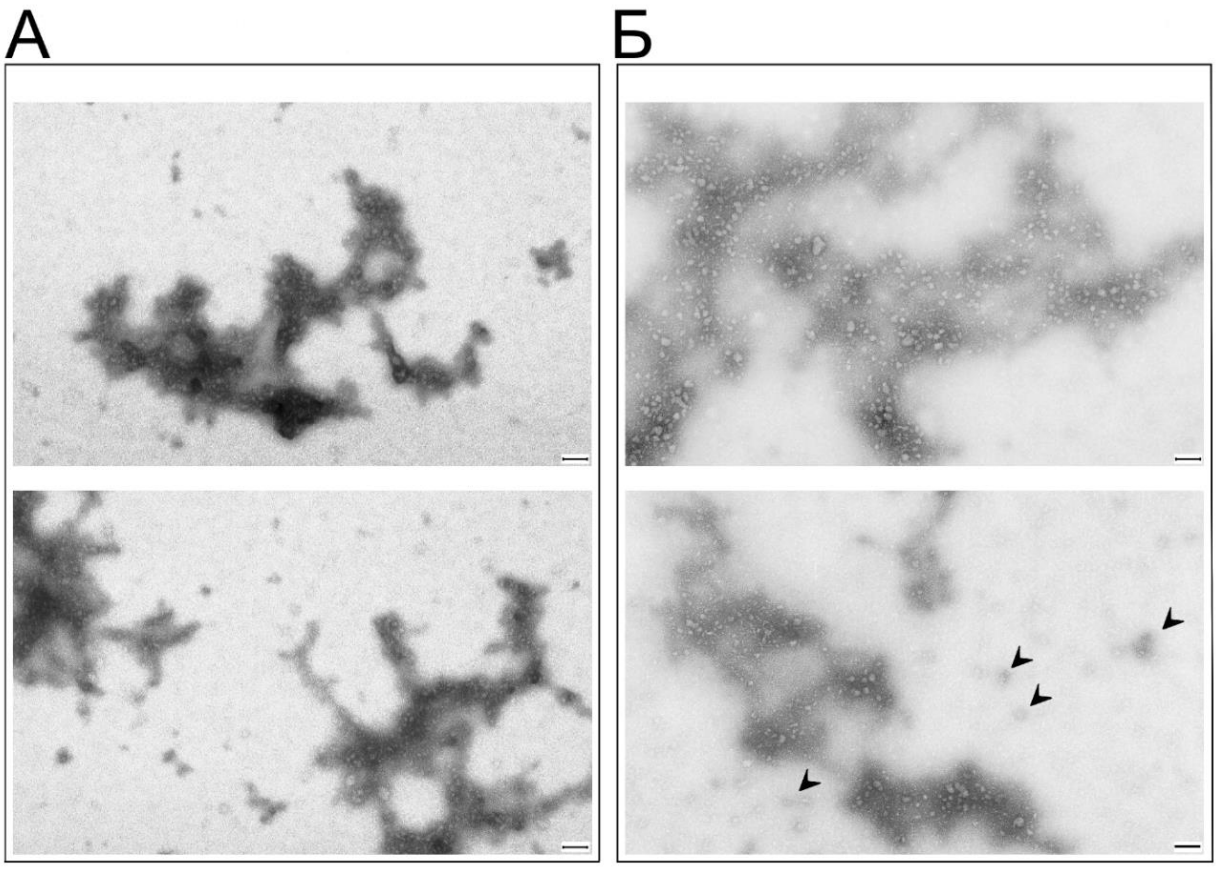


Рис. 18. ПЭМ негативно окрашенных агрегатов С-белка. А – Аморфные агрегаты С-белка, сформированные в течение ~5 мин; Б – Аморфные агрегаты С-белка, сформированные в течение 24 часов. Чёрными стрелками отмечены олигомеры. Условия формирования агрегатов: 0.15 М глицин-КОН, pH 7.0, 4°С. Для окрашивания использовался 2% водный раствор уранилацетата. Шкала 100 нм. Воспроизведено из работы (Bobyleva et al., 2021), выполненной при участии автора диссертации.

Далее были проведены исследования агрегатов С-белка методом АСМ. Поскольку значительной разницы между аморфными агрегатами С-белка, сформированными в течение первых минут агрегации и 24 часов агрегации, по данным ПЭМ обнаружено не было, наибольший интерес представляли агрегаты, сформированные в течение 24 часов из-за наличия олигомеров. На полученных изображениях АСМ наблюдались крупные аморфные агрегаты длиной до 4 мкм и высотой ~25-35 нм (Рис. 19 А, Б). Также были обнаружены небольшие сферические структуры диаметром ~50 нм и высотой ~10 нм и короткие вытянутые структуры длиной до 200 нм, шириной ~50-60 нм и высотой 10-15 нм (Рис. 19 Б). Небольшие сферические структуры диаметром ~50 нм, по-видимому, являются олигомерами С-белка.

Таким образом, исследованные белки (ГМТ и С-белок) формируют схожие по морфологическим признакам агрегаты: аморфные агрегаты, состоящие из более мелких сферических структур.

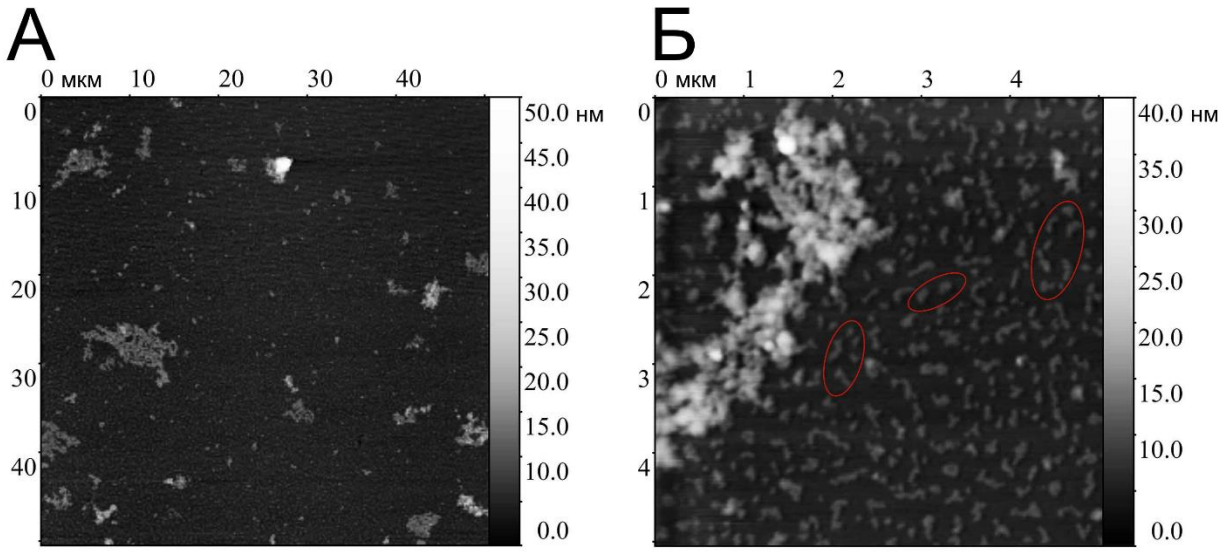


Рис. 19. АСМ агрегатов С-белка. А – Аморфные агрегаты С-белка, сформированные в течение 24 часов; Б – Аморфные агрегаты и олигомеры С-белка, сформированные в течение 24 часов. Олигомеры отмечены внутри красных эллипсов. Условия формирования агрегатов: 0.15 М глицин-КОН, pH 7.0, 4°С. Воспроизведено из работы (Bobyleva et al., 2021), выполненной при участии автора диссертации.

3.2. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И АМИЛОИДНЫХ СВОЙСТВ ГЛАДКОМЫШЕЧНОГО ТИТИНА И СКЕЛЕТНОМЫШЕЧНОГО С-БЕЛКА

3.2.1. Исследование амилоидных свойств ГМТ и С-белка

Для начала мы должны были определить являются ли аморфные агрегаты исследуемых белков амилоидными. Для этого обычно используют метод рентгеновской дифракции в сочетании с красителями КК и ТТ. Однако КК является ненадёжным маркером амилоидной природы агрегатов и имеет ряд ограничений (Yakupova et al., 2019), а самым надёжным методом определения амилоидной природы агрегатов считается метод рентгеновской дифракции.

3.2.1.1. Исследование агрегатов С-белка и ГМТ методом рентгеновской дифракции

Амилоидные и амилоидо-подобные структуры образуются за счет формирования межмолекулярной кросс-β-структуры. Наличие характерного рассеяния рентгеновских лучей, ориентированных определённым образом препаратов, проявляемое в виде двух основных рефлексов на ~4.6-4.8 Å и ~10 Å (может варьировать по разным литературным источникам в пределах 8-12 Å), характеризует исследуемый белковый объект как амилоидный (Makin, Serpell, 2005(a); Jahn et al., 2010).

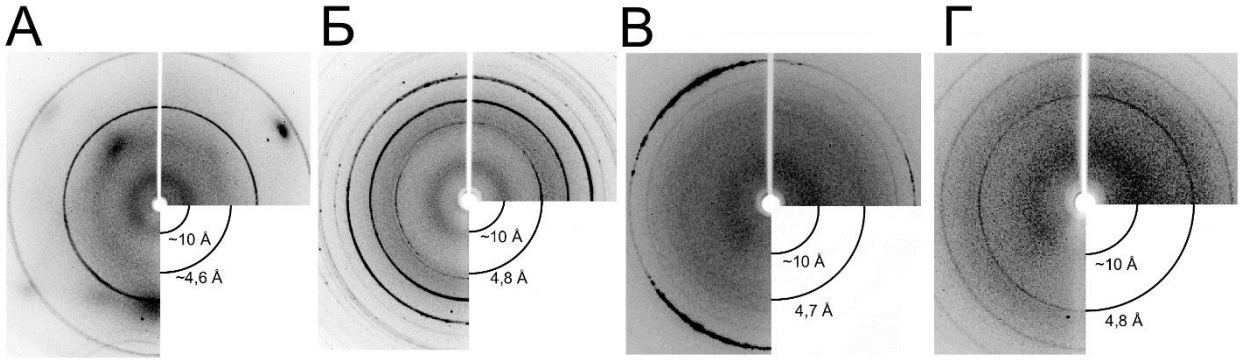


Рис. 20. Данные рентгеновской дифракции аморфных агрегатов С-белка и ГМТ. А – Картина рентгеновской дифракции аморфных агрегатов С-белка, сформированных в течение 24 часов. Обнаружены 2 размытых кольцевых рефлексов ~10 Å и ~4.6 Å, которые подтверждают наличие кросс-β-структуры; Б – Картина рентгеновской дифракции

аморфных агрегатов $ГМТ_{НМИ}$, сформированных в течение 24 часов. Размытый кольцевой рефлекс ~10 Å и выраженный кольцевой рефлекс ~4.6 Å подтверждают наличие кросс-β-структуры; В – Картина рентгеновской дифракции аморфных агрегатов $ГМТ_{ВМИ}$, сформированных в течение 1 часа. Размытый кольцевой рефлекс ~10 Å и слабо выраженный кольцевой рефлекс ~4.7 Å подтверждают наличие кросс-β-структуры; Г – Картина рентгеновской дифракции аморфных агрегатов $ГМТ_{ВМИ}$, сформированных в течение 24 часов. Размытый кольцевой рефлекс ~10 Å и выраженный кольцевой рефлекс ~4.8 Å подтверждают наличие кросс-β-структуры. Воспроизведено из работ (Yakupova et al., 2018; Bobyleva et al., 2021; Bobylev et al., 2023), выполненных при участии автора диссертации.

На рисунке 20 представлены данные, полученные методом рентгеновской дифракции на выровненных препаратах ГМТ и С-белка. Важно отметить, что у всех исследуемых агрегатов были обнаружены рефлексы ~10 Å и ~4.6-4.8 Å, которые по литературным данным соотносят с четвертичной кросс-β-структурой. У всех исследуемых агрегатов рефлекс ~10 Å, который указывает на расстояние между β-листами, является размытым и кольцевым. У С-белка рефлекс ~4.6 Å, который указывает на расстояние между полипептидными цепями в кросс-β-структуре также размыт (Рис. 20 А), в то время как у ГМТ данный рефлекс является ярко выраженным (Рис. 20 Б-Г). Также отдельно следует отметить, что четвертичная кросс-β-структура присутствовала у агрегатов $ГМТ_{ВМИ}$, сформированных в течение 1 часа. Таким образом, 60 минут агрегации достаточно, чтобы данный белок мог сформировать амилоидные структуры.

3.2.1.2. Исследование связывания агрегатов С-белка и ГМТ с красителем ТТ

Другим распространённым методом подтверждения амилоидной природы белковых агрегатов, хотя и не столь надёжным, как метод рентгеновской дифракции (см п. 1.8.), является метод связывания красителя ТТ с агрегатами. На рисунке 21 представлены графики интенсивности флуоресценции красителя ТТ в присутствии С-белка и ГМТ, а также их агрегированных форм. Показано увеличение

интенсивности флуоресценции ТТ в присутствии агрегатов всех 3 белков как после 24 часов агрегации, так и после определённых временных интервалов, согласно которым по данным ДРС происходит формирование крупных частиц (агрегатов) см. п. 5.2. Также на графике (Рис. 21 Б) можно наблюдать низкие значения интенсивности флуоресценции ТТ (на уровне молекулярной формы белка) в присутствии агрегатов $ГМТ_{ВМИ}$, сформированных в течение 1 часа, после их дезагрегации также в течение 1 часа. Это свидетельствует об отсутствии амилоидных структур в образцах, которые подверглись дезагрегации. Также следует отметить относительно слабое увеличение интенсивности флуоресценции ТТ в присутствии агрегированных форм С-белка, но, тем не менее, увеличение флуоресценции присутствует (Рис. 21 В).

Таким образом, учитывая данные рентгеновской дифракции и дополнительные данные по связыванию агрегатов исследуемых белков с красителем ТТ, можно сделать вывод об амилоидной природе агрегатов исследуемых мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов.

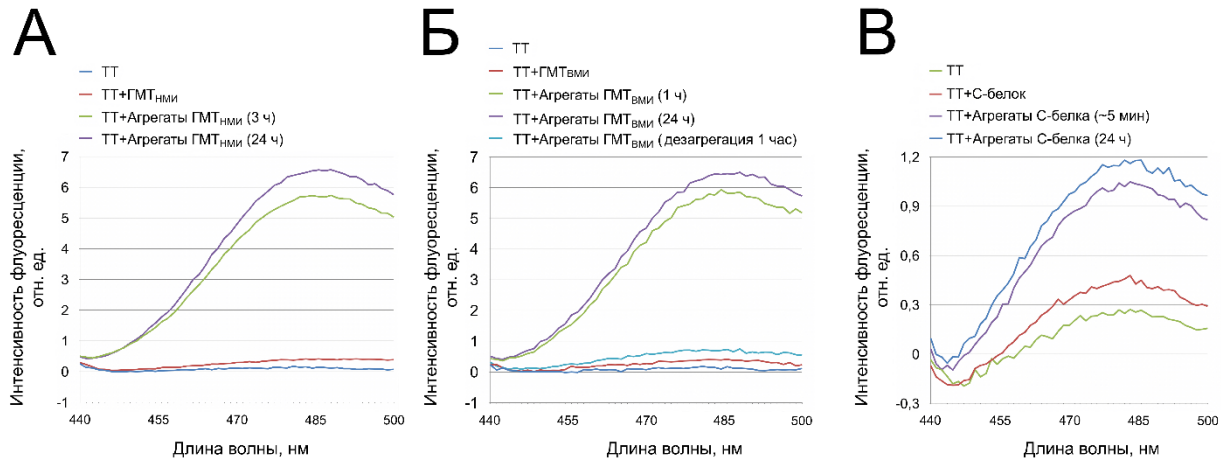


Рис. 21. А – Интенсивность флуоресценции ТТ в присутствии $ГМТ_{НМИ}$ и агрегатов этого белка, сформированных в течение 3 и 24 часов; Б – Интенсивность флуоресценции ТТ в присутствии $ГМТ_{ВМИ}$ и его агрегатов, сформированных в течение 1 и 24 часов, а также после 1 часа дезагрегации; В – Интенсивность флуоресценции ТТ в присутствии С-белка и его агрегатов, сформированных в течение ~5 мин и 24 часов. Условия агрегации: 0.15 М глицин–КОН при pH 7.0. Измерения проводились при T=25°C. Адаптировано из работ (Bobyleva et al., 2021; Bobylev et al., 2016; 2023).

3.2.2. Исследование изменения вторичной структуры ГМТ и С-белка при агрегации

После того, как была подтверждена амилоидная природа агрегатов ГМТ и С-белка, было проведено исследование их вторичной структуры. Для большинства исследованных белков при формировании ими амилоидных агрегатов наблюдается увеличение процента β-структуры (Waeytens et al., 2021). У исследуемых нами титина и С-белка изначально во вторичной структуре преобладает β-структура. В связи с этим, было интересно выяснить какие изменения происходят во вторичной структуре при агрегации исследуемых нами мышечных белков.

3.2.2.1. Исследование вторичной структуры ГМТ и С-белка методом КД

На рисунке 22 и в таблице 4 представлены данные кругового дихроизма ГМТ и С-белка, полученные до и после агрегации этих белков в течение 24 часов. Основной результат данного исследования – это отсутствие изменений во вторичной структуре при агрегации исследуемых белков.

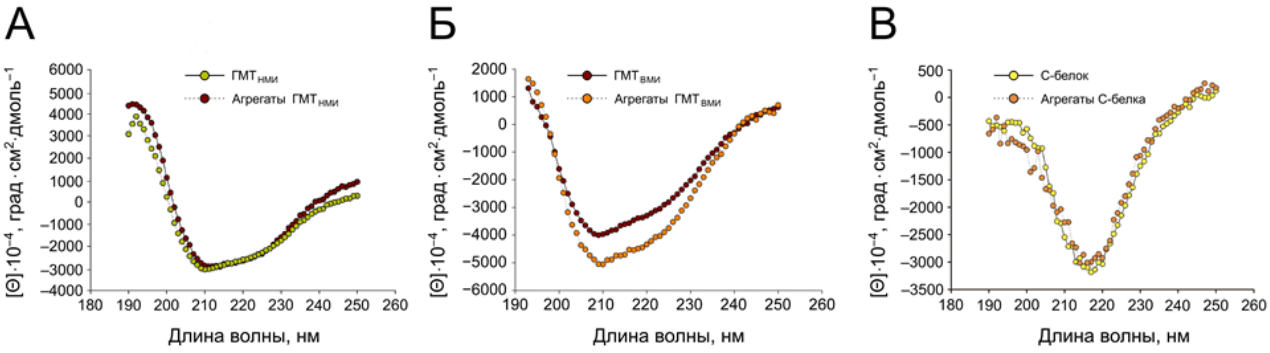


Рис. 22. Спектры кругового дихроизма $ГМТ_{НМИ}$ (А), $ГМТ_{ВМИ}$ (Б) и С-белка (В). Спектры представлены для агрегированных и неагрегированных форм белков. Условия агрегации: 0.15 М глицин-КОН при pH 7.0. Измерения проводились при T=25°C. Воспроизведено из работ (Bobylev et al., 2016; Bobyleva et al., 2021; Bobylev et al., 2023), выполненных при участии автора диссертации.

Содержание α-спиральных участков у $ГМТ_{НМИ}$ в неагрегированной форме составило 6.1%. Содержание α-спиральных участков у агрегированной формы белка составило 5.5%. Содержание β-складчатых структур у неагрегированной формы

белка составило 40.5%, а у агрегированной формы белка – 40.2%. Аналогичные результаты, получены для $ГМТ_{ВМИ}$. Содержание α-спиральных участков в молекулах неагрегированного $ГМТ_{ВМИ}$ составило 6.1%. Содержание α-спиральных участков агрегированной формы этого белка составило 5%. Содержание β-складчатых структур у неагрегированной формы $ГМТ_{ВМИ}$ составило 41%, а у агрегированной формы белка – 53%. И наконец, у неагрегированной формы С-белка было обнаружено 4.5% α-спиральных участков и 30.7% β-складчатых структур. После агрегации было обнаружено 4.9% α-спиральных участков и 29.7% β-складчатых структур (Табл. 4). Оставшиеся проценты скорее всего относится к участкам неупорядоченности; по полученным нами данным для всех трех исследуемых белков таковых участков ~ 50%.

Анализируя полученные данные, можно отметить два ключевых момента: во-первых, процентное соотношение α-спиральных участков и β-складчатых структур в исследуемых белках является сопоставимым, учитывая погрешность; во-вторых, у всех исследуемых нами белков при агрегации не происходит изменений во вторичной структуре белка, в частности, значительного увеличения β-структуры. Отсутствие изменений во вторичной структуре при формировании амилоидных агрегатов не свойственно для большинства амилоидных белков, так как для истинных амилоидных белков характерно увеличение β-складчатых структур при агрегации. Поэтому мы провели дополнительное исследование изменений вторичной структуры ГМТ методом ИК-Фурье спектроскопии.

Таблица 4. Содержание вторичной структуры в образцах агрегированной и неагрегированной форм ГМТ и С-белка.

Исследуемый белок	*Форма белка*	*α-спирали, %*	*β-участки, %*
$ГМТ_{НМИ}$ n=3	До агрегации	6.1±5.5	40.5±5.5
	После агрегации	5.5±3.5	40.2±5.5
$ГМТ_{ВМИ}$ n=3	До агрегации	6.0±4.0	41.0±6.0
	После агрегации	5.0±3.5	42.0±6.0
С-белок n=3	До агрегации	4.5±3.5	30.7±3.5
	После агрегации	4.9±3.5	29.7±3.5

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

3.2.2.2. Исследование вторичной структуры ГМТ методом ИК-Фурье спектроскопии

На рисунке 23 и в таблице 5 представлены данные исследования вторичной структуры ГМТ методом ИК-Фурье спектроскопии, полученные при 20°C и скорректированные на спектральный вклад водяного пара и CO_2. Экспериментальные данные анализировались в соответствии с принципами, описанными в (Yang et al., 2015). Полученные оценки содержания элементов вторичной структуры в образцах ГМТ и его агрегатов приведены в таблице 5.

Как и данные кругового дихроизма, данные ИК-Фурье свидетельствуют о том, что вторичная структура белка не изменяется при агрегации. Также стоит отметить относительно высокий процент α-спиральных участков, не свойственный титину. Возможно, некий процент α-спиральных участков вносят структурные элементы головки молекул ГМТ. Известно также, что в структуре молекулы ГМТ имеется 3 участка «Coiled coil».

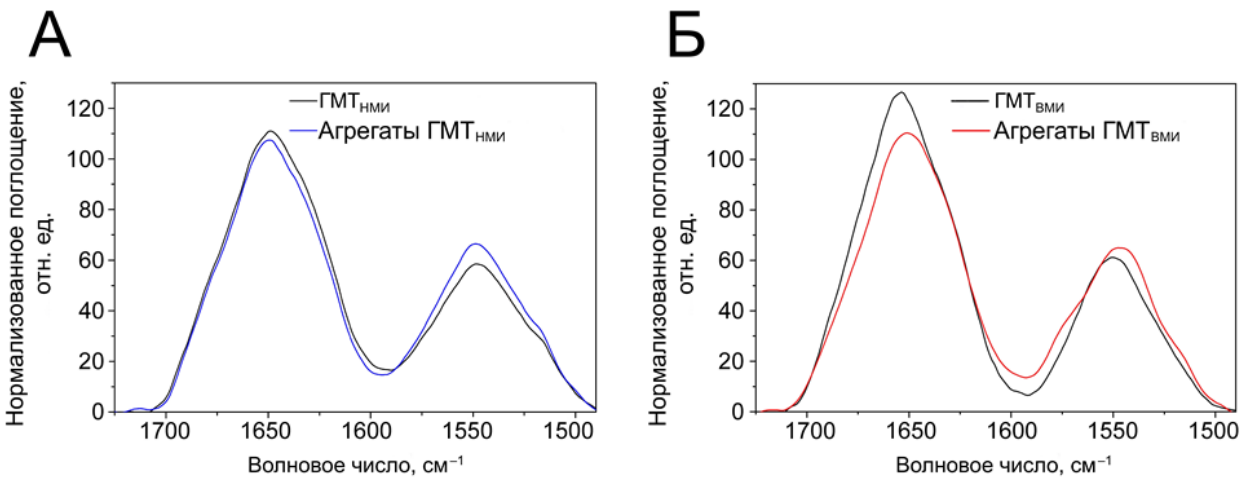


Рис. 23. ИК-Фурье спектры титина и его агрегатов. А – ИК-Фурье спектры $ГМТ_{НМИ}$; Б – ИК-Фурье спектры $ГМТ_{ВМИ}$. Условия агрегации: 0.15 М глицин–КОН при pH 7.0. Измерения проводились при T=25°C. Воспроизведено из работ (Bobylev et al., 2023; Timchenko et al., 2024), выполненных при участии автора диссертации.

Анализируя данные, полученные методом ИК-Фурье, можно заключить, что полученные результаты о содержащихся компонентах вторичной структуры немного отличаются от таковых, полученных методом КД. Различия могут быть связаны с особенностями применяемых подходов.

В целом, полученные результаты позволяют сделать общий вывод о том, что у исследуемых нами белков во вторичной структуре имеется большое количество (> 30%) неупорядоченной структуры. Но самый главный вывод – это отсутствие изменений во вторичной структуре исследуемых белков при их амилоидной агрегации. Это важная особенность, которая указывает на уникальный путь амилоидной агрегации, который характерен данным белкам.

Таблица 5. Содержание вторичной структуры в образцах агрегированной и неагрегированной форм ГМТ

Исследуемый белок	*Форма белка*	*α-спирали, %*	*β-участки, %*	*Повороты, %*	*Неупорядоченная структура, %*
$ГМТ_{НМИ}$ n=3	До агрегации	20.4±1.9	31.5±0.5	12.4±0.7	31.7±1.2
	После агрегации	20.3±2.1	30.9±2.0	12.4±2.2	31.6±1.0
$ГМТ_{ВМИ}$ n=3	До агрегации	26.0 ±1.0	25.0±2.0	11.7±0.6	32.0±2.0
	После агрегации	24.6±1.6	26.0±2.0	10.7±0.4	34.0±2.0

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

Также следует отметить, что у полученных для ГМТ ИК-спектров есть ряд особенностей, которые можно соотнести с некоторыми структурными особенностями амилоидных фибрилл. Например, ранее считалось, что пик в области 1620-1630 $см^{-1}$, соответствует структуре β-листа (Susi, Byler, 1986; Oberg, Fink, 1998). Сейчас существуют данные, что для амилоидных фибрилл на ИК-спектре полосы амида I' характерен диапазон волновых чисел от 1611 $см^{-1}$ до 1630 $см^{-1}$, тогда как для нативных белков, имеющих β-укладку, характерен диапазон от 1630 $см^{-1}$ и 1643 $см^{-1}$ (Zandomeneghi et al., 2004).

У двух изоформ ГМТ на графике основной пик амида I' как у агрегированной, так и у неагрегированной форм белка находится на 1650 $см^{-1}$ и скорее соответствует белкам с преимущественно неупорядоченной и альфа-спиральной структурой, т.е. не содержащим β-слоев (Röhr et al., 2020). Таким образом, ИК-Фурье спектры агрегатов ГМТ не совсем характерны для спектров, полученных для других известных амилоидных белков. Однако, на графиках присутствует небольшое плечо полосы амида I', расположенное в диапазоне волновых чисел 1620-1630 $см^{-1}$ (Рис. 24 (область, выделенная серым цветом)).

По имеющимся данным, диапазон волновых чисел 1611-1630 $см^{-1}$ характерен для амилоидных фибрилл (полоса межмолекулярного β-слоя) (Zandomeneghi et al., 2004). Это плечо, хотя и слабо выраженное, присутствует на графике как у агрегированной, так и у неагрегированной форм обеих изоформ ГМТ (Рис. 24), что вместе с другими данными, полученными методами рентгеновской дифракции и флуоресценции с ТТ, указывает на вклад небольшого процента содержания β-участков, которые участвуют в образовании межмолекулярных связей.

В литературе также имеются данные о том, что плечо на 1622 $см^{-1}$ полосы амида I' характерно для амилоидоподобных агрегатов ox-ApoA-I (Krishnamoorthy et al., 2018). В нашем случае такое плечо указывает на наличие небольшого количества межмолекулярного β-слоя в агрегированной форме ГМТ, и, что примечательно, в неагрегированной форме белка тоже, т.е. может свидетельствовать о наличии отдельных амилоидных участков этого белка. Это может указывать на наличие межмолекулярных взаимодействий внутри отдельных олигомеров неагрегированной формы белка.

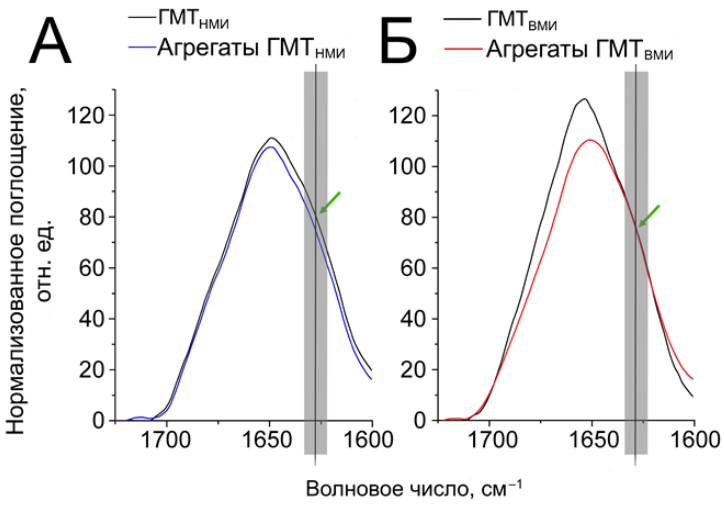


Рис. 24. ИК-Фурье спектры титина и его агрегатов (спектры в области амида I' (1600-1700 $см^{-1}$), которая преимущественно соответствует валентному колебанию карбонила амида). А – ИК-Фурье спектры $ГМТ_{НМИ}$; Б – ИК-Фурье спектры $ГМТ_{ВМИ}$. Условия агрегации: 0.15 М глицин-КОН при pH 7.0. Измерения проводились при T=25°C. Наблюдается плечо на 1618-1637 $см^{-1}$ (отмечена на графике серым цветом с центром на ~1627 $см^{-1}$). Воспроизведено из работ (Bobylev et al., 2023; Timchenko et al., 2024), выполненных при участии автора диссертации.

3.2.3. Исследование структуры ГМТ и С-белка методом СМУРР

Метод СМУРР использовали для получения информации о конформации молекул исследуемых мышечных белков в растворе. Для таких высокомолекулярных соединений, как титин, этот метод позволяет приближенно оценить их внутреннюю конформацию с учетом тангенса наклона ($tg\ A$) зависимости log I–log S. Известно, что для стержнеобразной конформации $tg\ A = 1$, для плоской конформации tan $A = 2$, для глобулярных частиц $tg\ A = 4$. С помощью программы DAMMIF (Franke, Svergun, 2009) также можно визуализировать приближенные трехмерные объемные структуры белка.

3.2.3.1. Исследование структуры $ГМТ_{НМИ}$ методом СМУРР

Из полученных данных следует, что неагрегированная форма $ГМТ_{НМИ}$ имеет вытянутую форму (стержнеобразная конформация) ($tg\ A = –1.2$) (Рис. 25 А). Это также хорошо видно на трёхмерной модели (Рис. 25 В). Агрегированная форма белка

близка к плоской (*tg A* = –1.95) (Рис. 25 Б). Следовательно, после агрегации стержнеобразная конформация изменилась на плоскую.

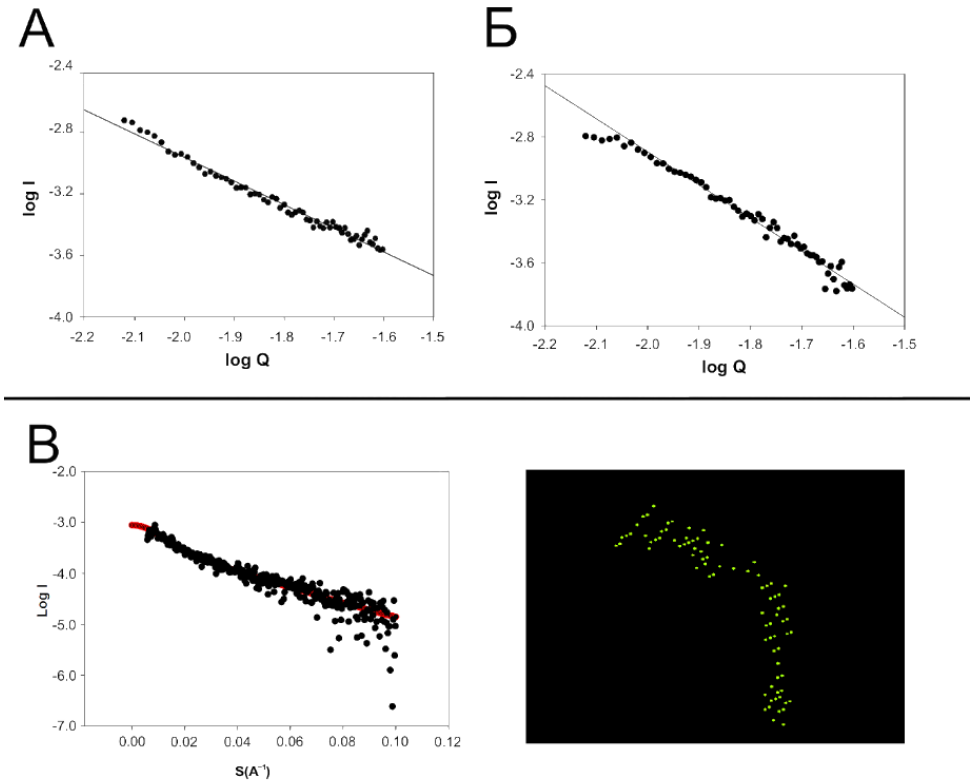


Рис. 25. Исследование агрегатов $ГМТ_{НМИ}$ методом СМУРР. Кривые рассеяния рентгеновского излучения в логарифмическом представлении, log *I* против log *Q*, где *I* – интенсивность рассеяния; *Q* – модуль вектора рассеяния (А, Б); А – Кривая рассеяния рентгеновского излучения неагрегированной формы $ГМТ_{НМИ}$. *tg A* = –1.2; Б – Кривая рассеяния рентгеновского излучения агрегированной формы $ГМТ_{НМИ}$. *tg A* = –1.95. В – Кривая рассеяния рентгеновского излучения в координатах log *I* от *S*, где *S* – вектор рассеяния неагрегированной формы $ГМТ_{НМИ}$. В чёрном секторе изображение, представляющее собой трёхмерную модель белка, полученное путём аппроксимации данных с помощью программы DAMMIF (Franke, Svergun, 2009). Условия агрегации: 0.15 М глицин-КОН, pH 7.0, при T=4°C. Измерения проводились при T=25°C, концентрация белка c = 0.5 мг/мл. Воспроизведено из работы (Timchenko et al., 2024), выполненной при участии автора диссертации.

3.2.3.2. Исследование структуры $ГМТ_{ВМИ}$ методом СМУРР

Из полученных данных (Рис. 26) следует, что неагрегированный $ГМТ_{ВМИ}$ имеет плоскую форму (пластинчатую конформацию) (*tg A* = –2.7) (Рис. 26 А). Это видно

на полученной трёхмерной модели (Рис. 26 В). Скорее всего эти данные отражают наличие олигомеров белка, которых, по данным ДРС, в образце до 30% от общего количества (Рис. 11 Б (0мин)). Агрегированная форма частиц $ГМТ_{ВМИ}$ также близка к плоской (*tg A* = –2.65) (Рис. 26 Б).

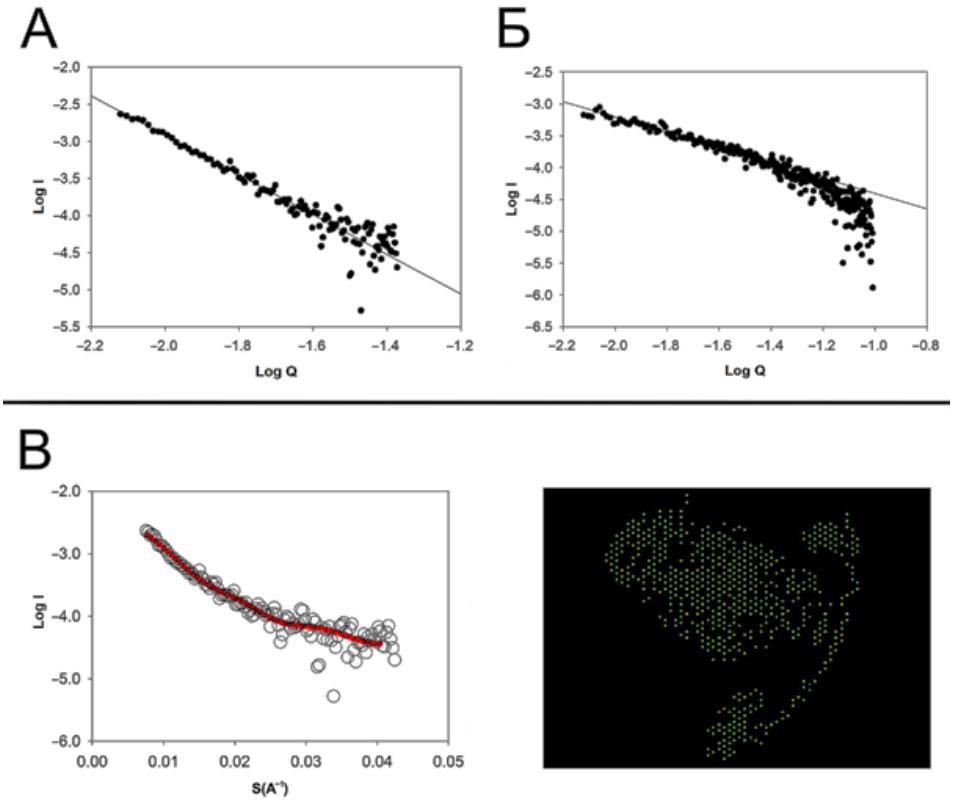


Рис. 26. Исследование агрегатов $ГМТ_{ВМИ}$ методом СМУРР. Кривые рассеяния рентгеновского излучения в логарифмическом представлении, log *I* против log *Q*, где *I* — интенсивность рассеяния; Q – модуль вектора рассеяния (А, Б); А – Кривая рассеяния рентгеновского излучения неагрегированной формы $ГМТ_{НМИ}$. *tg A* = –2.7; Б – Кривая рассеяния рентгеновского излучения агрегированной формы $ГМТ_{НМИ}$. *tg A* = –2.65. В – Кривая рассеяния рентгеновского излучения в координатах log *I* от *S*, где *S* – вектор рассеяния неагрегированной формы $ГМТ_{ВМИ}$. В чёрном секторе изображение, представляющее собой трёхмерную модель белка, полученное путём аппроксимации данных с помощью программы DAMMIF (Franke, Svergun, 2009). Условия агрегации: 0.15 М глицин–КОН при pH 7.0, 4°С. Измерения проводились при Т=25°С, концентрация белка с = 0.5 мг/мл. Воспроизведено из работы (Bobylev et al., 2023), выполненной при участии автора диссертации.

3.2.3.3. Исследование структуры С-белка методом СМУРР

Для С-белка, ввиду меньших размеров его молекулы и частичной седиментации крупных агрегатов, удалось получить больше информации о конформации молекулярной и агрегированной форм белка, чем для ГМТ. Сначала была оценена молекулярная масса его молекулярной и агрегированной форм путем сравнения с известной массой БСА при экстраполяции кривой рассеяния к нулевому углу рассеяния. Молекулярная масса молекулярного С-белка составила 150±10 кДа, в то время как агрегированной формы – 900±60 кДа. Полученные значения для молекулярной формы С-белка (150±10 кДа) близки к его истинной молекулярной массе (125-134 кДа), а также к значениям, полученным при оценке его молекулярной массы в зависимсти от электрофоретической подвижности (~134 кДа) (Рис. 8). Что касается агрегированной формы, то значение 900 кДа, по-видимому, соответствует олигомерам белка, состоящим из 6-7 молекул этого белка. Эти данные совпадают с данными, полученными методом ДРС (Рис. 12 Б) и методом АСМ (Рис. 19 Б).

Из полученных данных (Рис. 27) следует, что неагрегированный С-белок имеет вытянутую форму (палочкообразную конформацию) ($tg\ A = –1.1$) (Рис. 27 А). Это видно на полученной трёхмерной модели (Рис. 27 Г). Агрегированная форма частиц С-белка является сочетанием вытянутой и плоской форм ($tg\ A = –1.7$) (Рис. 27 Д). На полученной трёхмерной модели (Рис. 27 З) можно наблюдать форму, напоминающую олигомер.

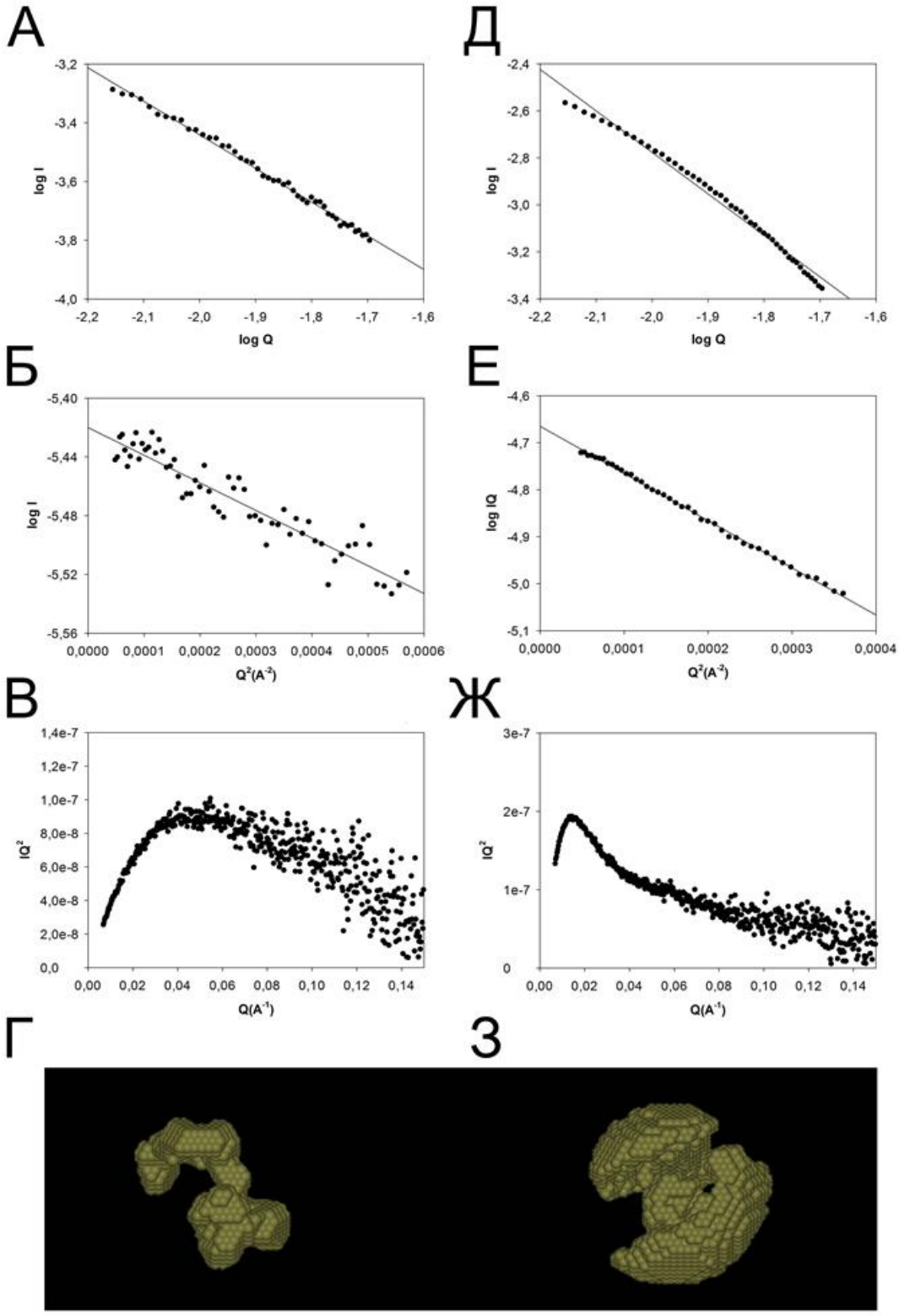


Рис. 27. Исследование агрегатов С-белка методом СМУРР. (А, Д) – Кривые рассеяния рентгеновского излучения в логарифмическом представлении, log *I* против log *Q*, где *I* – интенсивность рассеяния; *Q* – модуль вектора рассеяния; А – Кривая рассеяния рентгеновского излучения неагрегированной формы С-белка. *tg A* = –1.1; Б – Кривая рассеяния рентгеновского излучения агрегированной формы С-белка. *tg A* = –1.7; (Б, Е) –

Кривые рассеяния рентгеновского излучения в логарифмическом представлении, log *IQ* против Q^2 неагрегированной (Б) и агрегированной (Е) форм белка; (В,Ж) – Кривые рассеяния рентгеновского излучения, представленные в координатах Кратки для неагрегированной (В) и агрегированной (Ж) форм белка. В чёрном секторе изображение, представляющее собой трёхмерные модели молекулы С-белка (Г) и агрегированной формы (З), полученные путём аппроксимации данных с помощью программы DAMMIF (Franke, Svergun, 2009). Условия агрегации: 0.15 М глицин–КОН при pH 7.0, при *T*=4°C. Измерения проводились при *T*=25°C, концентрация белка c = 4.3 мг/мл. Воспроизведено из работы (Bobyleva et al., 2021), выполненной при участии автора диссертации.

Также для обеих структур был рассчитан радиус поперечного сечения (*Rc*). *Rc* можно оценить, построив зависимость log (*IQ*)-Q^2 (Svergun, 1999). В случае круглого цилиндра *Rc* = *R/2*, где *R* – радиус цилиндра. Расчетное значение *Rc* для неагрегированной формы С-белка составило 30.0±2 Å (Рис. 27 Б), в то время как для агрегированной формы этого белка *Rc* = 68±2 Å (Рис. 27 Е). Дополнительную информацию о структуре белков и агрегатов также можно получить, построив кривую рассеяния в координатах IQ^2 и Q (координаты Кратки).

На рисунке 27 (В) представлены данные рассеяния неагрегированной формы С-белка, построенные в координатах Кратки. Кривая графика имеет форму, напоминающую колокол, что предполагает компактную структуру белка. По его максимуму был вычислен радиус гирации белка (*Rg*), который составил 30.0±2 Å. Рассчитанное значение *Rg* агрегированной формы С-белка, согласно данным (Рис. 27 Ж), составило 86±4 Å.

Таким образом, были дополнительно получены сведения о стабильных олигомерах С-белка, которые дополняют имеющиеся данные и согласуются с другими данными, полученными с использованием методов ДРС, ПЭМ и АСМ.

3.2.4. Исследование денатурационной стабильности ГМТ$_{ВМИ}$ методом ДСК

Известно, что амилоидные агрегаты являются более стабильными, чем их белки предшественники, поэтому было проведено исследование стабильности агрегированной и неагрегированной форм ГМТ$_{ВМИ}$.

Термическую стабильность агрегатов ГМТ$_{ВМИ}$ определяли методом ДСК. На рисунке 28 представлены температурные зависимости избыточной теплоемкости ГМТ$_{ВМИ}$ в неагрегированной и агрегированной формах. Как видно из рисунка, на кривых имеются пики поглощения тепла, которые могут соответствовать кооперативному разрушению структуры. Повторное нагревание препаратов подтверждает необратимость процесса. Максимальная температура пика теплопоглощения неагрегированной формы ГМТ$_{ВМИ}$, T_m, составила 317.7±0.1°К; значение калориметрической энтальпии перехода, ΔHcal = 870±90 кДж моль$^{-1}$. Максимальная температура пика теплопоглощения агрегатов ГМТ$_{ВМИ}$, T_m, составила 321.7±0.1°К; значение калориметрической энтальпии перехода, ΔHcal = 1090±110 кДж моль$^{-1}$.

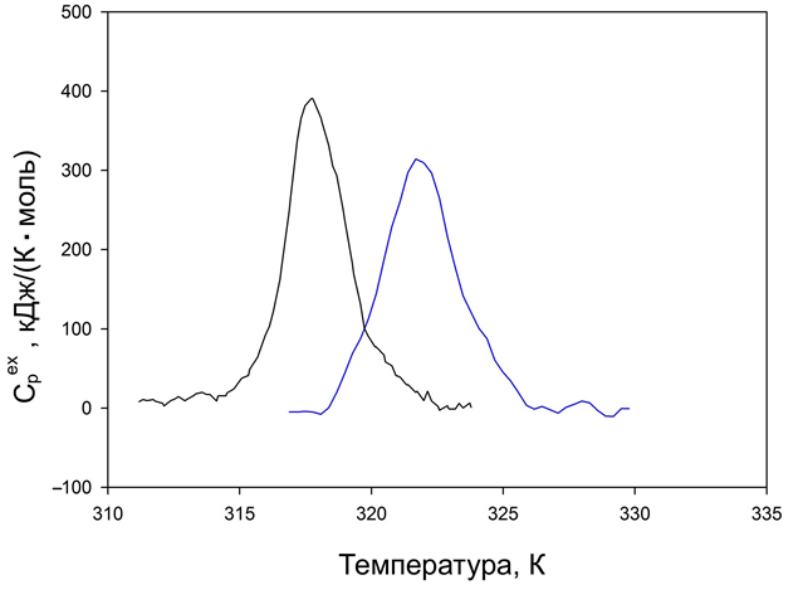


Рис. 28. Температурные зависимости избыточной теплоемкости ГМТ$_{ВМИ}$ в мономерной (черный) и агрегированной (синий) формах. Воспроизведено из работы (Bobylev et al., 2023), выполненной при участии автора диссертации.

На основе зарегистрированных температур плавления можно отметить, что стабильность неагрегированной формы ГМТ$_{ВМИ}$ ниже (T_m=317.7°К), чем стабильность его агрегатов (T_m=321.7°К). Однако, разница максимальной температуры пика теплопоглощения между агрегированной и неагрегированной формами белка не столь существенна как в случае с истинными амилоидными белками. Также разницы практически не наблюдалось между значениями калориметрической энтальпии перехода. Относительно низкие значения температуры плавления белка в исследуемом диапазоне могут быть связаны с большим количеством неупорядоченной структуры, что было показано ранее для всех исследуемых нами белков методом ИК-Фурье и КД (см. п. 6.2).

3.3. ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ОБРАЗОВАНИЯ ОЛИГОМЕРОВ ГМТ И С-БЕЛКА

3.3.1. Изучение олигомеров С-белка.

Появление олигомеров на разных стадиях агрегации исследуемых белков заслуживает отдельного внимания, так как это может влиять как на сам процесс агрегации, так и на свойства агрегатов, что может быть связано с токсичностью. Известно, что накопление белковых отложений, как правило, связывают с тяжелой клеточной дегенерацией в местах отложений, при этом точный механизм патогенеза остается малоизученным. В настоящее время предлагается несколько возможных механизмов цитотоксичности, связанной с белковыми отложениями (Uversky, 2010).

Известно, что помимо амилоидных фибрилл белки могут образовывать другие типы агрегатов, такие как растворимые олигомеры и аморфные агрегаты. Аморфные агрегаты обычно образуются быстрее, чем фибриллы. Для их образования не требуется какой-то особой укладки (конформации), многие белки с неупорядоченной структурой и частично развернутые белки формируют аморфные агрегаты. С другой стороны, для фибриллообразования необходимы особые условия, способствующие образованию специфической укладки в амилоидную структуру. Данная специфическая укладка может появляться уже на стадии формирования растворимых олигомеров (Uversky, 2010). Исследуемые нами белки

формируют амилоидные аморфные агрегаты. Это расходится с общепринятой научной точкой зрения о том, что амилоидами могут быть только фибриллы белков.

Также, согласно распространенной модели, на начальных этапах фибриллообразования мономерный амилоидогенный белок может образовывать одновременно несколько типов олигомерных форм с различной внутренней конформацией. Различные типы олигомеров могут давать начало более крупным агрегатам различной структуры, как фибриллярным, так и аморфным, либо представлять собой относительно стабильные структуры, не запускающие дальнейшую агрегацию (Uversky, 2010). Это соответствует полученным нами результатам. Так, например, С-белок после формирования крупных аморфных агрегатов в первые 5 минут агрегации формировал в последующем ряд стабильных олигомеров, претерпевающих незначительный рост в течение ~16 часов (Рис. 11 Б). Данные олигомеры не участвовали в формировании крупных агрегатов. С другой стороны, олигомеры $ГМТ_{ВМИ}$ наблюдались нами на начальной стадии агрегации и, скорее всего, участвовали в формировании более крупных агрегатов, а также ускоряли процесс агрегации.

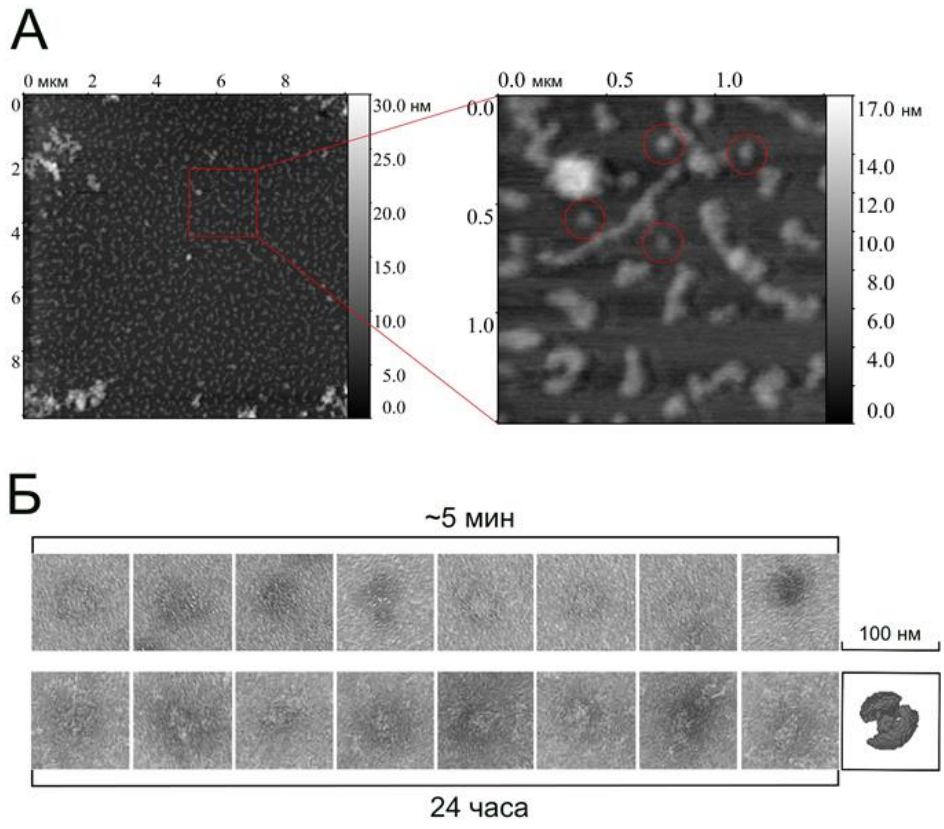


Рис. 29. АСМ и ПЭМ олигомеров С-белка. А – АСМ аморфных агрегатов и олигомеров С-белка, сформированных в течение 24 часов. Отдельно лежащие олигомеры

показаны в красных кругах; Б – ПЭМ олигомеров С-белка, сформированных в течение ~5 минут и 24 часов. Справа внизу приведена для сравнения смоделированная структура олигомера С-белка, полученная с помощью программы DAMMIF, на основе данных СМУРР. Размер одного квадрата 100×100 нм. Условия формирования агрегатов: 0.15 М глицин–КОН, pH 7.0, 4°С. Воспроизведено из работы (Bobyleva et al., 2023(b)), выполненной при участии автора диссертации.

Мы исследовали С-белок методом СМУРР и определили, что образуемые данным белком олигомеры имеют молекулярную массу 900±60 кДа и радиус гирации 86±4 Å. При этом в составе больших олигомеров С-белок остается довольно компактным, на что указывает наличие выраженного максимума на графике Кратки (Рис. 27 Ж). Учитывая молекулярную массу белка равную ~134 кДа, можно предположить, что олигомер С-белка состоит из ~7 молекул. Из данных, полученных методом ДРС, мы рассчитали количество мономеров в олигомере: их количество составило 10-12 мономеров.

По данным АСМ и ПЭМ препаратов С-белка олигомеры представляют собой частицы сферической формы с радиусом ~40-50 нм и высотой до 10 нм (Рис. 29 А, Б). Примечательно, что смоделированная трехмерная структура олигомеров С-белка, полученная на основе данных СМУРР, также близка к сферической (Рис. 29 Б) и (Рис. 27 З).

3.3.2. Изучение олигомеров ГМТ

Отдельного внимания заслуживает анализ структуры олигомеров $ГМТ_{ВМИ}$. Способность скелетномышечного титина формировать олигомеры разного порядка была впервые показана в 2003 году. С использованием метода АСМ было обнаружено, что молекулы титина скелетных мышц кролика при понижении ионной силы раствора в течение 10 минут формируют олигомеры (Kellermayer et al., 2003). Изначальные условия, в которых находился титин перед формированием олигомеров: 30 мМ К-фосфата, 0.6 М KCl, 0.1 мМ ЭГТА, 0.3 мМ ДТТ, 0.1% NaN_3, 40 мкг/мл леупептина, 20 мкМ Е-64 и 0.05% Tween-20, pH 7.0. Условия в которых титин формировал олигомеры: 25 мМ имидазола–HCl, 0.2 М KCl, 4 мМ $MgCl_2$, 1 мМ

ЭГТА, 0.01% NaN_3, 1 мМ ДТТ, 20 мкг/мл леупептина, 10 мкМ E-64, pH 7.4 (Kellermayer et al., 2003).

В данных условиях авторы наблюдали отдельно лежащие молекулы титина и олигомеры этого белка. Обнаруженные олигомеры титина были разного порядка: от димеров, триммеров и тетраметров до более 10 молекул титина в олигомере. Кроме того, у каждого олигомера титина наблюдалась уплотнение в центре – взаимодействующие головки отдельных молекул титина (Kellermayer et al., 2003).

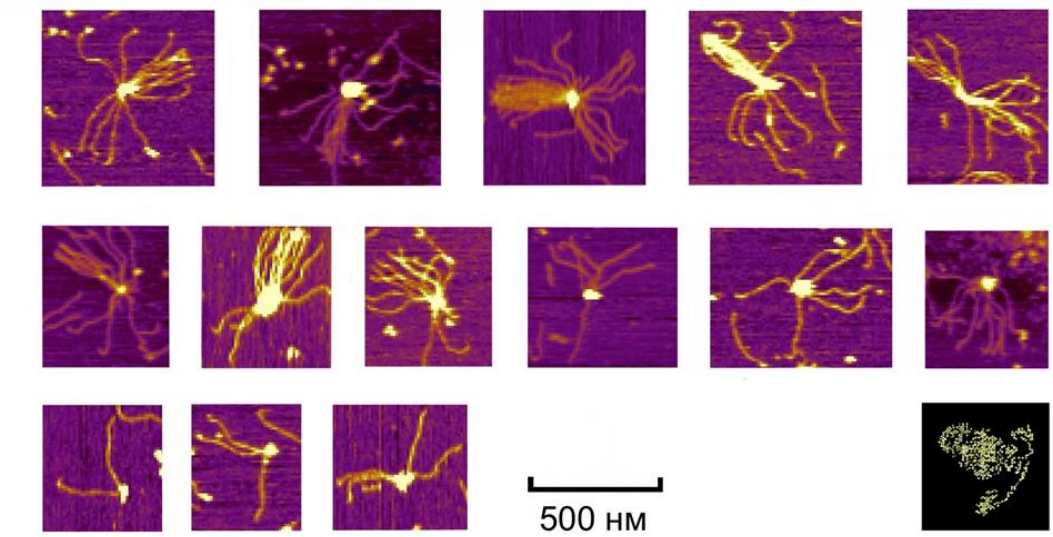


Рис. 30. АСМ олигомеров $ГМТ_{ВМИ}$. В основном встречаются олигомеры высокого порядка. Однако в поле зрения обнаружены также димеры, тримеры и тетрамеры (нижний ряд). Шкала 500 нм. Справа внизу в черном секторе приведена для сравнения смоделированная структура олигомера $ГМТ_{ВМИ}$, полученная с помощью программы DAMMIF, на основе данных СМУРР. Раствор: 0.6 М KCl, 2 мМ $MgCl_2$, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 0.5 мМ ДТТ, 0.2 мМ ФМСФ, 10 мМ имидазола, pH 7.0. Воспроизведено из работы (Bobylev et al., 2023), выполненной при участии автора диссертации.

Проведенные нами исследования выявили наличие олигомеров у $ГМТ_{ВМИ}$ по форме и морфологии аналогичные олигомерам титина поперечно-полосатых мышц, описанным выше. В частности, мономеры в олигомерах гладкомышечного титина также были связаны головками (Рис. 30). Эта головка, вероятно, соответствует участку белка, расположенному в М-линии саркомера в случае с титином поперечно-полосатых мышц (Kellermayer et al., 2003) или белка плотных тел гладкомышечных клеток, в случае с титином гладких мышц. Из этих наблюдений

мы сделали вывод о том, что у $ГМТ_{ВМИ}$ встречаются в основном олигомеры высшего порядка (от 10 до 20 мономеров в олигомере) (Рис. 30). Однако мы также наблюдали олигомеры низшего порядка (димеры, тримеры, тетрамеры и т.д.) (Рис. 30 (нижний ряд)).

Итак, мы обнаружили два отличия олигомеров титина поперечно-полосатых мышц и $ГМТ_{ВМИ}$. Во-первых, это размеры олигомеров: 500 нм для $ГМТ_{ВМИ}$ и ~1 мкм для титина (Т2) поперечно-полосатых мышц (Kellermayer et al., 2003). По-видимому, это связано с различиями в размерах молекул титина. Вторая и наиболее важная особенность – это условия олигомеризации. Для формирования олигомеров титином поперечно-полосатых мышц требуется снижение ионной силы (с ~0.6 до ~0.2), в то время как для $ГМТ_{ВМИ}$ этого не требуется. Олигомеры $ГМТ_{ВМИ}$ присутствуют в «колоночном» буфере сразу после очистки с изначально высокой ионной силой (0.6 М KCl, 2 мМ $MgCl_2$, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 0.5 мМ ДТТ, 0.2 мМ ФМСФ, 10 мМ имидазола, pH 7.0). Из этого можно сделать вывод о том, что титин гладких мышц больше склонен к агрегации и олигомеризации, чем изоформа этого белка из поперечно-полосатых мышц. Этим объясняется высокая скорость агрегации этой гладкомышечной изоформы белка.

Итак, мы наблюдали стабильные олигомеры С-белка, которые не участвовали в образовании крупных агрегатов, а также олигомеры высокомолекулярной изоформы ГМТ с м.м. 1500 кДа, которые участвовали в формировании крупных амилоидных аморфных агрегатов. Однако процесс агрегации и формирования промежуточных продуктов не ясен, поскольку из-за высокой скорости агрегации сложно выявить и проанализировать стадию, на которой происходит сборка крупных агрегатов из более мелких надмолекулярных структур. Для возможного ответа на этот вопрос мы проанализировали ЭМ данные агрегатов низкомолекулярной изоформы ГМТ с м.м. 500 кДа, полученных после 3 часов агрегации. Эта изоформа гладкомышечного титина помимо отличий в молекулярной массе имеет более низкую скорость агрегации. В проведённых нами исследованиях методом динамического светорассеяния было обнаружено, что ГМТнми после 3 часов агрегации формировал относительно крупные частицы, мономеры и олигомеры (Рис. 31 В).

На рисунке 31 (А) приведены ПЭМ-изображения агрегатов ГМТ с м.м. 500 кДа, сформированных после 3 часов агрегации. Можно наблюдать отдельно лежащие олигомеры (Рис. 31 А (обведены в черный круг)), крупные агрегаты и множество более мелких частиц, предположительно мономеров белка. На рисунке 31 Б также представлен ряд олигомеров разной формы, имеющих размеры 500-700 нм. Ряд олигомеров белка по данным ДРС имеют более крупные размеры (Рис. 31 В). На изображении также можно наблюдать, что крупный агрегат состоит из отдельных олигомеров (Рис. 31 А (стрелка)).

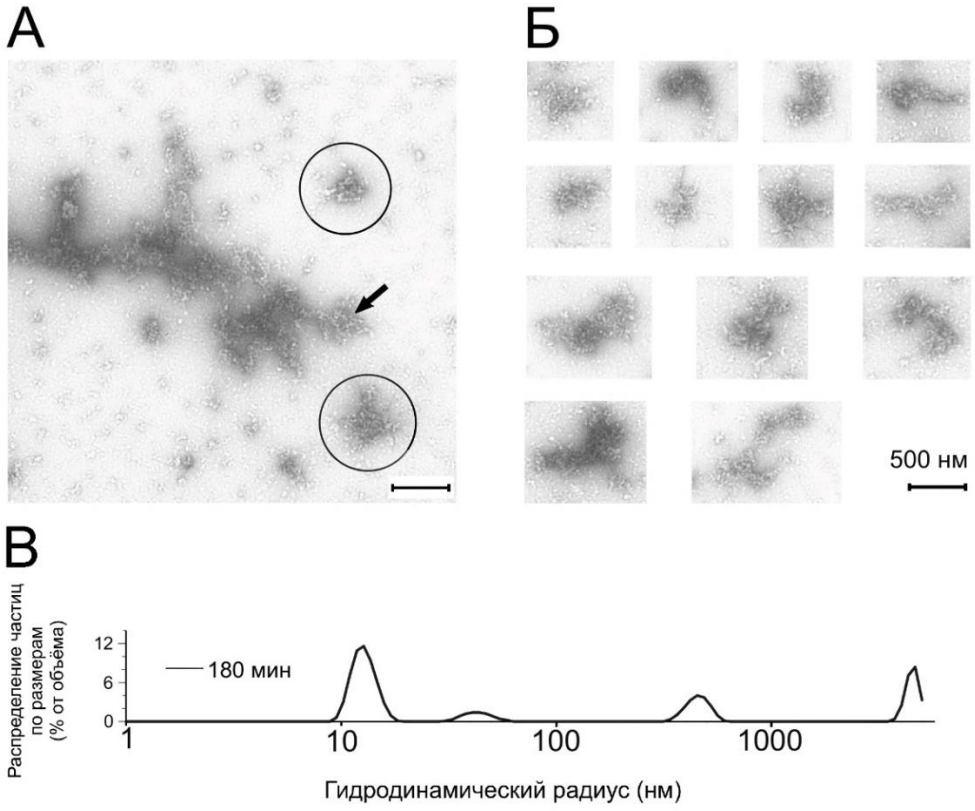


Рис. 31. ПЭМ аморфных агрегатов и олигомеров $ГМТ_{НМИ}$, сформированных в течение 3 часов. А,Б – ПЭМ аморфных агрегатов и олигомеров $ГМТ_{НМИ}$, сформированных в течение 3 часов. Отдельно лежащие олигомеры показаны в черных кругах. В – данные ДРС аморфных агрегатов и олигомеров $ГМТ_{НМИ}$, сформированных в течение 3 часов. Четыре размерные фракции частиц белка с гидродинамическими радиусами соответствуют мономерам (Rh ~12-13 нм), олигомерам низго (Rh ~45 нм) и высокого (Rh ~700 нм) порядков и крупным агрегатам (Rh ~4500 нм). Условия формирования агрегатов 0.15 М глицин–КОН, pH 7.0, 4°C. Шкала 500 нм. Воспроизведено из работы (Bobyleva et al., 2023(b)), выполненной при участии автора диссертации.

Таким образом, мы можем предположить, что укрупнение и рост агрегатов гладкомышечного титина может происходить за счет олигомеров белка. Олигомеры ГМТ, в свою очередь, представляющие собой связанные концами в одной точке молекулы белка с неизмененной вторичной структурой, являются промежуточным продуктом для формирования более крупных аморфных агрегатов.

3.4. ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ФОРМИРОВАНИЯ ДВУХ ТИПОВ АМИЛОИДНЫХ АГРЕГАТОВ ГМТ$_{НМИ}$

В процессе исследования амилоидной агрегации мультидоменных мышечных белков ГМТ и С-белка мы выяснили, что для них свойственно образование амилоидных аморфных агрегатов, которое сопровождается отсутствием изменений во вторичной структуре. Для некоторых белков, характерно несколько различных путей формирования амилоидных агрегатов, которые имеют структурные различия. Поэтому мы предположили, что исследуемые белки тоже могут формировать амилоидные агрегаты нескольких типов. В процессе поиска мы обнаружили, что в растворе, содержащем 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0, ГМТ$_{НМИ}$ формирует аморфные агрегаты, способные к дезагрегации при повышении ионной силы. Эти условия оказались более приближены к физиологическим, чем используемые нами ранее (в растворе 0.15 М глицин–КОН, pH 7.0). Кроме того, были обнаружены различия в морфологии у агрегатов ГМТ$_{НМИ}$, сформированных в двух вышеуказанных растворах. Таким образом, мы решили выяснить, существуют ли различия на структурном уровне между двумя типами агрегатов ГМТ$_{НМИ}$.

3.4.1. Сравнительное изучение морфологии двух типов агрегатов ГМТ$_{НМИ}$

3.4.1.1. Изучение морфологии двух типов агрегатов ГМТ$_{НМИ}$ методом ПЭМ

На рисунке 32 представлены электронно-микроскопические данные, двух типов агрегатов ГМТ$_{НМИ}$. Исследуемый белок в обоих условиях формировал аморфные агрегаты (Рис. 32), однако агрегаты ГМТ$_{НМИ}$, сформированные в растворе,

содержащем 0.15 М глицин–КОН, pH 7.0, представляли из себя аморфные структуры, состоящие из более крупных частиц (Рис. 32 Б, Г). Также следует отметить, что агрегаты $ГМТ_{НМИ}$, сформированные в растворе, содержащем 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0, формировали достаточно крупные агрегаты через 3 часа (Рис. 32 А).

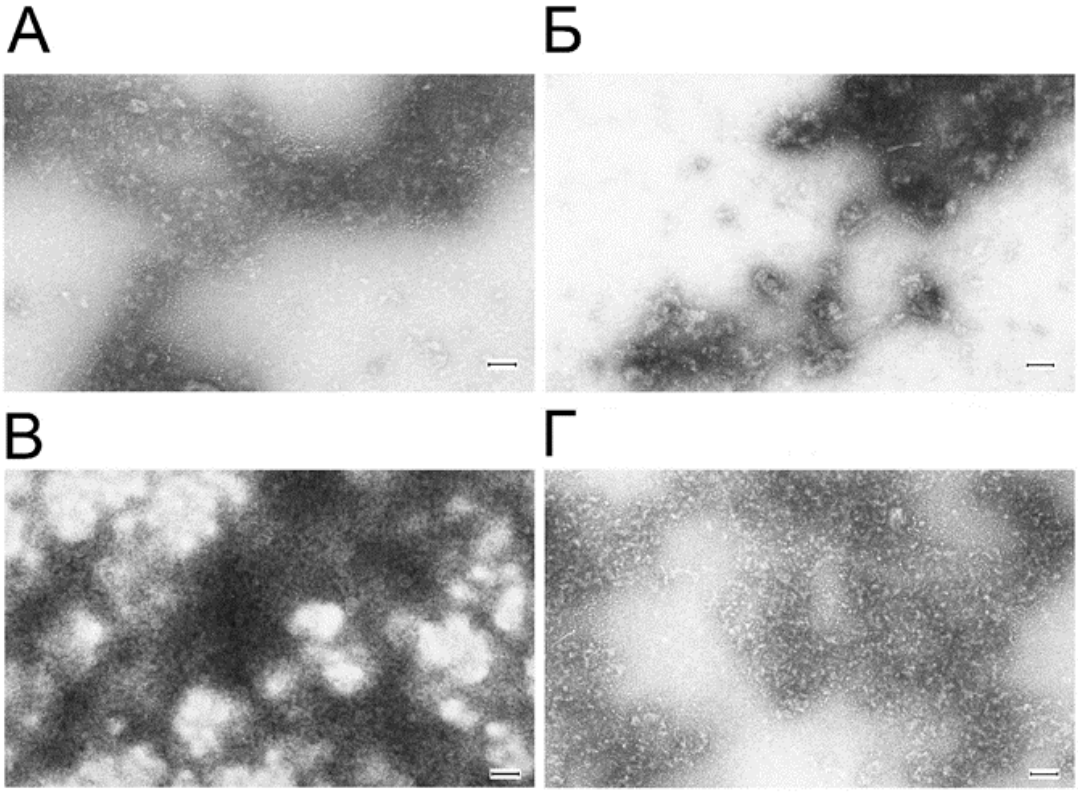


Рис. 32. ПЭМ негативно окрашенных агрегатов $ГМТ_{НМИ}$. Аморфные агрегаты $ГМТ_{НМИ}$, сформированные в течение 3 часа (А) и через 24 часа (В) агрегации, в растворе, содержащем 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0; Аморфные агрегаты $ГМТ_{НМИ}$, сформированные в течение 3 часа (Б) и через 24 часа (Г) агрегации, в растворе, содержащем 0.15 М глицин–КОН, pH 7.0. Для окрашивания использовался 2% водный раствор уранилацетата. Шкала 100 нм. Воспроизведено из работы (Yakupova et al., 2018), выполненной при участии автора диссертации.

3.4.1.2. Изучение морфологии двух типов агрегатов $ГМТ_{НМИ}$ методом АСМ

Согласно данным АСМ во всех исследуемых образцах агрегаты титина (Рис. 33) имели аморфный вид. При этом агрегаты $ГМТ_{НМИ}$, сформированные в растворе,

содержащем 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0, после 3 часов агрегации имели размер от 30-50 нм до одного микрометра по ширине и до 25 нм по высоте (Рис. 33 А). После 24 часов агрегации наблюдались пористые структуры высотой 8-10 нм (Рис. 33 В). Агрегаты $ГМТ_{НМИ}$, сформированные в растворе, содержащем 0.15 М глицин–КОН, pH 7.0, представлены на рисунке 33 Б,Г (они также описаны выше в п. 5.3.1, Рис. 13). Агрегаты $ГМТ_{НМИ}$, сформированные в течение 3 часов, имели сферическую форму, 4 мкм в ширину и до 400 нм в высоту (Рис. 33 Б). При этом диаметр отдельных крупных сферических частиц составлял ~1 мкм. Агрегаты $ГМТ_{НМИ}$, сформированные в течение 24 часов, представляли собой разветвленные цепи, состоящие из сферических агрегатов диаметром ~300-500 нм и высотой до 35-40 нм (Рис. 33 Г).

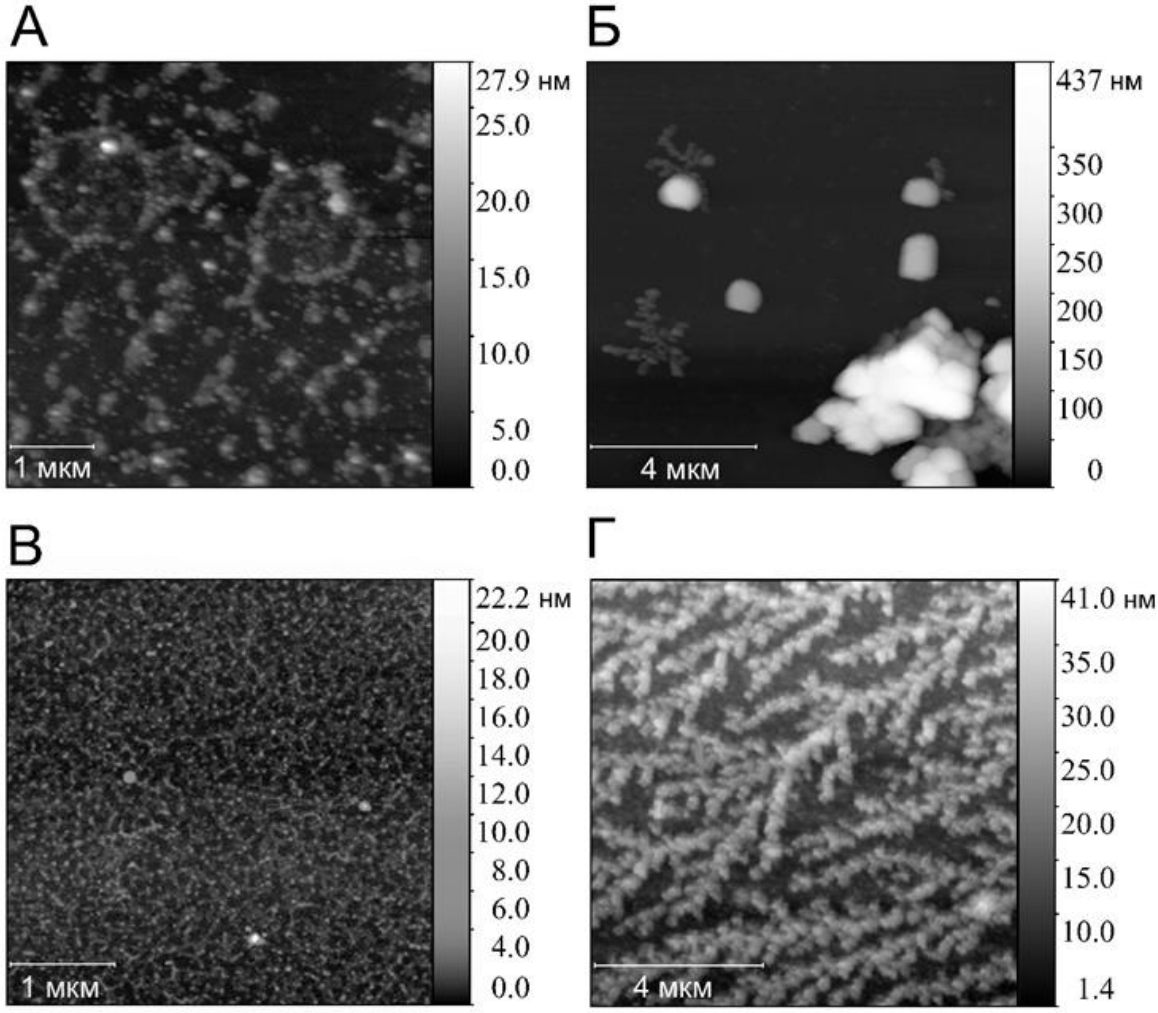


Рис. 33. АСМ агрегатов $ГМТ_{НМИ}$. Аморфные агрегаты $ГМТ_{НМИ}$, сформированные в течение 3 часа (А) и через 24 часа (В) агрегации, в растворе, содержащем 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0; Аморфные агрегаты $ГМТ_{НМИ}$, сформированные в течение 3 часа (Б) и

через 24 часа (Г) агрегации, в растворе, содержащем 0.15 М глицин–КОН, pH 7.0. Воспроизведено из работы (Yakupova et al., 2018), выполненной при участии автора диссертации.

Исходя из полученных данных, можно сделать следующие выводы. Во-первых, на ранних стадиях (3 часа) агрегации низкомолекулярной изоформы гладкомышечного титина в обоих выбранных нами растворах наблюдается формирование крупных частиц $ГМТ_{НМИ}$ (Рис. 33 А, Б), но после 24 часов агрегации в поле зрения преобладают аморфные агрегаты, состоящие из меньших по размеру частиц, но взаимосвязанных друг с другом и занимающих большие площади (Рис. 33 В, Г). Второй вывод, он же основной, заключается в том, что размер частиц аморфных агрегатов $ГМТ_{НМИ}$, сформированных в растворе, содержащем 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0, на ранних стадиях агрегации явно меньше (Рис. 33 А), чем размер таковых, сформированных в растворе, содержащем 0.15 М глицин–КОН, pH 7.0 (Рис. 33 Б). Это же относится и к агрегатам, сформированным в течение 24 часов (Рис. 33 В, Г). Таким образом, наблюдаются различия в морфологии между агрегатами $ГМТ_{НМИ}$, сформированными в разных условиях.

3.4.2. Сравнительное изучение обратимости агрегации $ГМТ_{НМИ}$

На рисунке 34 представлены результаты, полученные методом ДРС, демонстрирующие скорость агрегации и способность к дезагрегации агрегатов $ГМТ_{НМИ}$, которые были получены в разных условиях. Динамика агрегации была исследована в течение 3 часов. В первую очередь стоит отметить, что не обнаружено существенных различий в размерах частиц и в их процентном соотношении у агрегатов обоих типов. В препаратах неагрегированной формы $ГМТ_{НМИ}$, как было уже описано выше в п. 5.2, наблюдалось две размерные фракции частиц, средний гидродинамический радиус (Rh) которых был приблизительно 12-15 нм (доминирующий пик ~90%) и ~45 нм (минорный пик ~10%). Размерная фракция Rh=12-15 нм, скорее всего, соответствует отдельным молекулам титина, тогда как вторая размерная фракция Rh ~45 нм может принадлежать олигомерам белка. После 180 минут агрегации в препаратах белка наблюдалось три фракции частиц. При

агрегации $ГМТ_{НМИ}$ в растворе, содержащем 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0, присутствовали размерные фракции с Rh ~20 нм, ~200 нм, ~8000 нм (Рис. 34 А). При агрегации $ГМТ_{НМИ}$ в растворе, содержащем 0.15 М глицин-КОН, pH 7.0, присутствовали размерные фракции с Rh ~20 нм, ~700 нм, ~8000 нм (Рис. 34 Б). Полученные данные для двух типов агрегатов $ГМТ_{НМИ}$, сформированных в разных условиях в течение 3 часов агрегации, демонстрируют схожую картину по распределению размерных фракций, за исключением средней размерной фракции. У агрегатов $ГМТ_{НМИ}$, сформированных в растворе, содержащем 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0, данная размерная фракция имела значение Rh=200 нм. У агрегатов $ГМТ_{НМИ}$, сформированных в растворе, содержащем 0.15 М глицин-КОН, pH 7.0, данная размерная фракция имела значение Rh=700 нм. В обоих условиях присутствовали крупные частицы с Rh=8000 нм, что свидетельствует об одинаковой скорости агрегации, так как это наиболее крупные частицы, которые можно обнаружить данным методом.

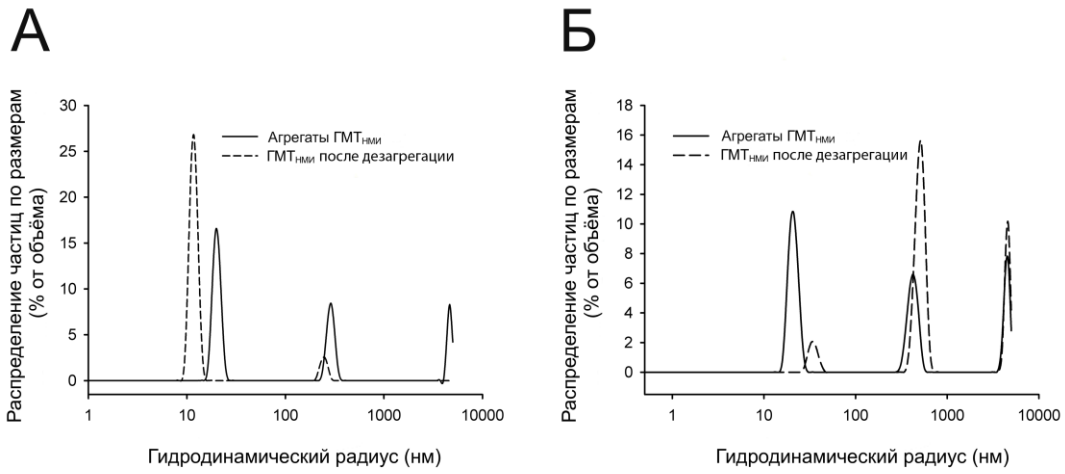


Рис. 34. Распределение частиц $ГМТ_{НМИ}$ по размеру через 3 часа агрегации, а также после дезагрегации в течение трех часов (белок был предварительно агрегирован также в течение 3 часов). А – агрегаты $ГМТ_{НМИ}$, сформированные в растворе, содержащим 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0, а также агрегаты этого белка, после дезагрегации, в растворе, содержащем 0.6 М KCl, 30 мМ KH_2PO_4, 1 мМ ДТТ, 0.1 М NaN_3, pH 7.0 в течение 3 часов; Б – агрегаты $ГМТ_{НМИ}$, сформированные в растворе, содержащим 0.15 М глицин–КОН 10 мМ имидазола, pH 7.0, а также агрегаты этого белка, после дезагрегации, в растворе, содержащем 0.6 М KCl, 30 мМ KH_2PO_4, 1 мМ ДТТ, 0.1 М NaN_3, pH 7.0 в течение 3 часов. Измерения проводились при T=25°C. Воспроизведено из работы (Yakupova et al., 2018), выполненной при участии автора диссертации.

При исследовании обратимой агрегации (дезагрегации) путём повышения ионной силы раствора (диализ против буферного раствора, содержащего 0.6 М KCl, 30 мМ KH_2PO_4, 1 мМ ДТТ, 0.1 М NaN_3, pH 7.0) в образцах агрегатов $ГМТ_{НМИ}$, сформированных в растворе, содержащем 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0 была обнаружена почти полная их дезагрегация (Рис. 34 А (пунктирная линия)). В частности, была обнаружена размерная фракция частиц с Rh ~12 нм, что указывает на появление неагрегированных отдельных молекул этого белка. В случае с другим типом агрегатов (сформированных в растворе, содержащим 0.15 М глицин–КОН 10 мМ имидазола, pH 7.0) подобная фракция частиц не наблюдалась (Рис. 34 Б (пунктирная линия)). Более того, процент частиц с самыми малыми значениями Rh даже после повышения ионной силы раствора в данных образцах уменьшался, а число частиц с бóльшими гидродинамическими радиусами увеличивался, что указывает на необратимость агрегации $ГМТ_{НМИ}$, агрегаты которого сформированы в растворе, содержащем 0.15 М глицин–КОН, pH 7.0.

Таким образом, помимо различий в морфологии, выявленных методом АСМ и ПЭМ, была выявлена другая особенность агрегатов $ГМТ_{НМИ}$, сформированных в двух разных растворах: агрегаты $ГМТ_{НМИ}$, сформированные в растворе, содержащем 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0, дезагрегировали при повышении ионной силы.

3.4.3. Изучение амилоидной природы двух типов агрегатов $ГМТ_{НМИ}$

3.4.3.1. Исследование агрегатов $ГМТ_{НМИ}$ методом рентгеновской дифракции

С помощью рентгеновской дифракции для агрегатов $ГМТ_{НМИ}$, сформированных в растворе 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола (pH 7.0), выявлены характерные рефлексы: диффузный максимум около ~10 Å и выраженный рефлекс 4.8 Å (рис. 35А).

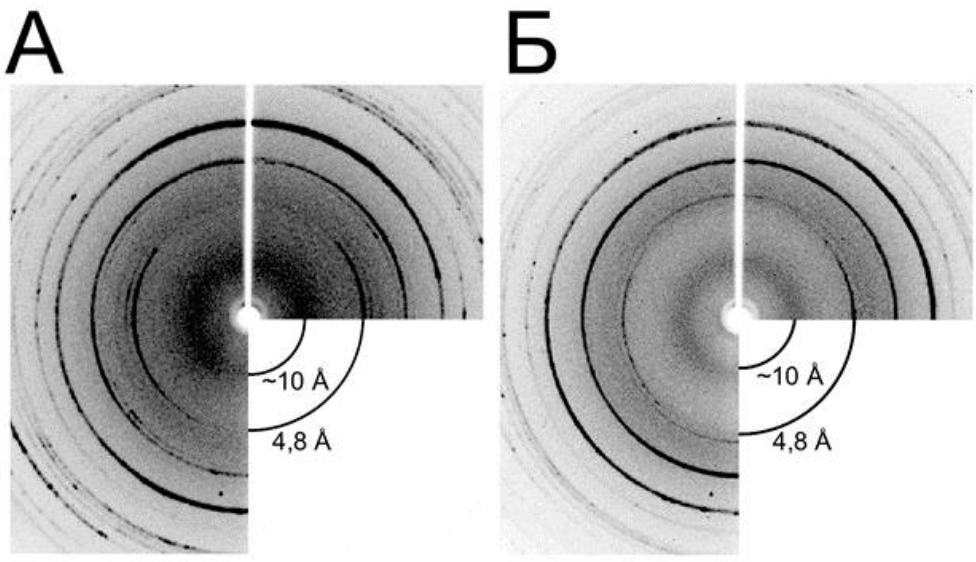


Рис. 35. Рентгеновская дифракция агрегатов титина гладких мышц после 24 часов агрегации. А – Картина рентгеновской дифракции аморфных агрегатов $ГМТ_{НМИ}$, сформированных в растворе, содержащем 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0; Б – Картина рентгеновской дифракции аморфных агрегатов $ГМТ_{НМИ}$, сформированных в растворе, содержащем 0.15 М глицин–KOH, pH 7.0. Размытый кольцевой рефлекс ~10 Å и кольцевой рефлекс ~4.8 Å (А,Б) подтверждают наличие кросс-β-структуры. Воспроизведено из работы (Yakupova et al., 2018), выполненной при участии автора диссертации.

Для агрегатов, полученных в растворе 0.15 М глицин–KOH (pH 7.0), наблюдались сходные рефлексы – соответственно ~10 Å и 4.8 Å (рис. 35В). При этом рефлекс около ~10 Å, отражающий расстояние между β-листами, в образцах, сформированных в 0.15 М глицин–KOH (pH 7.0), менее размытый по сравнению с агрегатами, полученными в 200 мМ KCl/10 мМ имидазол (pH 7.0), что может указывать на более упорядоченную упаковку β-листов. В целом набор рефлексов соответствует кросс-β-структуре, характерной для амилоидных агрегатов.

3.4.3.2. Исследование связывания агрегатов $ГМТ_{НМИ}$ с красителем ТТ

В ходе эксперимента мы проводили измерения интенсивности флуоресценции ТТ в присутствии агрегатов титина обоих типов после 3 и 24 часов агрегации (Рис. 36). Интенсивность флуоресценции ТТ в присутствии агрегатов $ГМТ_{НМИ}$,

сформированных в растворе, содержащем 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0, в течение 3 и 24 часов, практически не увеличивалась по сравнению с ее интенсивностью в присутствии молекулярной формы титина (Рис. 36) и была значительно ниже интенсивности флуоресценции агрегатов этого белка, сформированных в других условиях. Интенсивность флуоресценции ТТ в присутствии агрегатов титина, сформированных в растворе, содержащем 0.15 М глицин-КОН, pH 7.0, в течение 3 и 24 часов, была значительно выше интенсивности флуоресценции красителя в присутствии молекулярной формы титина (Рис. 36).

Таким образом, отсутствие связывания ТТ с амилоидными агрегатами $ГМТ_{НМИ}$, сформированными в растворе, содержащем 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0, является еще одним отличием этого типа агрегатов от агрегатов $ГМТ_{НМИ}$, сформированных в растворе, содержащем глицин.

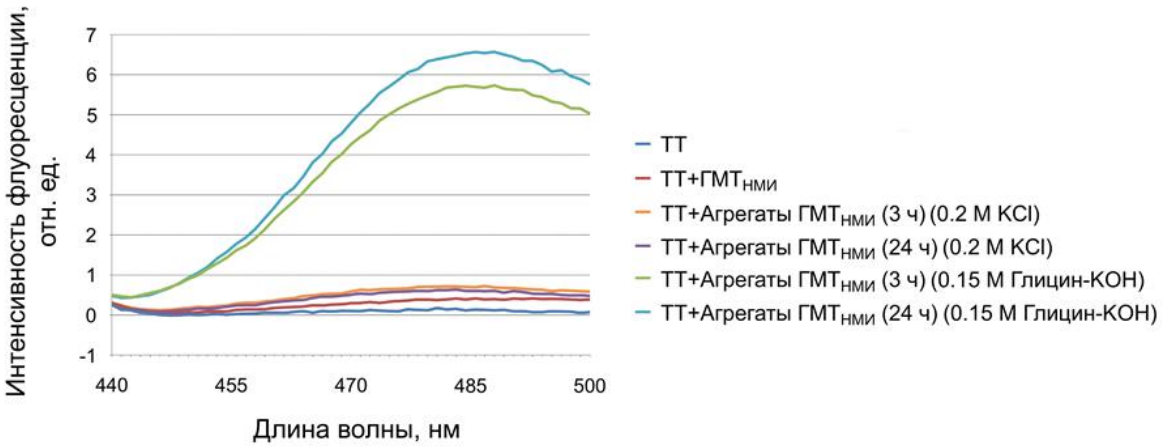


Рис. 36. Интенсивность флуоресценции ТТ в присутствии $ГМТ_{НМИ}$ и агрегатов этого белка, сформированных в течение 3 и 24 часов в растворах, содержащих 0.15 М глицин–КОН, pH 7.0 и 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0. Измерения проводились при T=25°C. Воспроизведено из работы (Yakupova et al., 2018), выполненной при участии автора диссертации.

3.4.4. Изучение вторичной структуры двух типов агрегатов $ГМТ_{НМИ}$

Для исследования вторичной структуры разных типов агрегатов $ГМТ_{НМИ}$ мы использовали ИК-Фурье спектроскопию. На рисунке 37 представлены данные ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье.

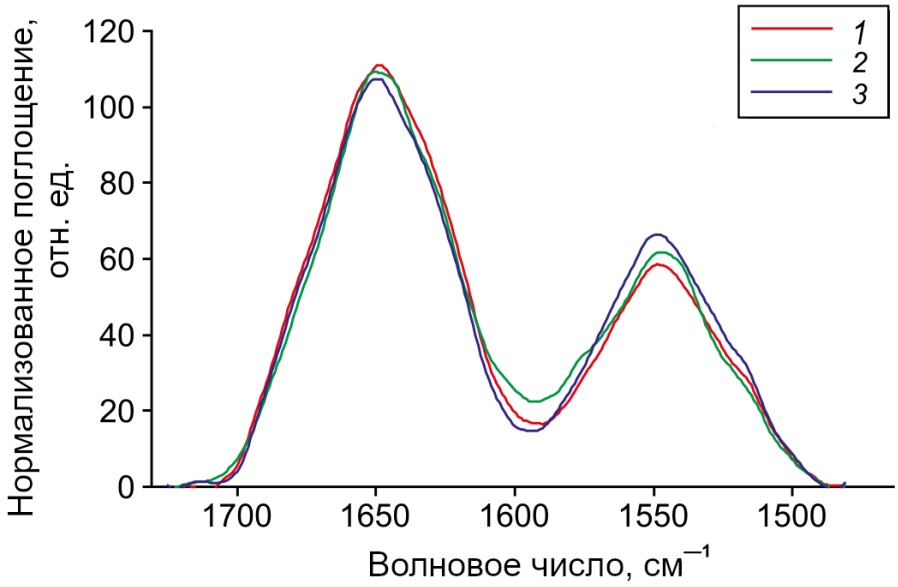


Рис. 37. ИК-Фурье спектры $ГМТ_{НМИ}$ (1) и его агрегатов, сформированных в растворах, содержащих 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0 (2) и 0.15 М глицин-КОН, pH 7.0 (3). Воспроизведено из работы (Timchenko et al., 2024), выполненной при участии автора диссертации.

Таблица 6. Оценка содержания вторичной структуры в образцах $ГМТ_{НМИ}$ и его агрегатов.

Образец	*α-спирали, %*	*β-складки, %*	*Повороты, %*	*Неупорядоченная структура, %*
Неагрегированная форма $ГМТ_{НМИ}$	20.4±1.9	31.5±0.5	12.4±0.7	31.7±1.2
Агрегаты $ГМТ_{НМИ}$, сформированные в растворе 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0	22.0±2.2	29.2±2.3	13.0±0.6	31.7±0.7
Агрегаты $ГМТ_{НМИ}$, сформированные в растворе 0.15 М глицин-КОН, pH 7.0	20.3±2.1	30.9±2.0	12.4±2.2	31.6±1.0

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

Полученные оценки содержания элементов вторичной структуры в образцах $ГМТ_{НМИ}$ и его двух типов агрегатов представлены в Таблице 6. Из полученных данных видно, что у этой изоформы гладкомышечного титина в процессе формирования двух типов амилоидных агрегатов не происходит изменений во вторичной структуре.

3.4.5. Изучение структуры двух типов агрегатов $ГМТ_{НМИ}$ методом СМУРР

СМУРР был использован для получения информации о конформации двух типов агрегатов $ГМТ_{НМИ}$. На рисунке 38 представлены результаты СМУРР. Из полученных нами данных, и как уже было описано ранее в п. 6.3.1, следует, что молекула $ГМТ_{НМИ}$ имеет вытянутую форму (палочкообразную конформацию) (tan A = –1.2) (Рис. 38 А). Форма частиц агрегатов $ГМТ_{НМИ}$ близка к пластинчатой, как у полученных в растворе, содержащем 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.5, (*tg A* = –1.86) (Рис. 38 Б), так и в растворе, содержащем 0.15М Глицин-КОН, pH 7.5 (*tg A* = –1.95) (Рис. 38 В). Значения тангенса угла наклона кривой рентгеновского рассеяния, полученные для обоих типов агрегата, являются близкими. Это свидетельствует о том, что несмотря на разную морфологию агрегатов $ГМТ_{НМИ}$, полученных в разных условиях, данные агрегаты состоят из одинаковых частиц. Соответственно, различия в их морфологии, выявленные методами ПЭМ и АСМ, обусловлены особой организацией и упаковкой уже сформированных частиц.

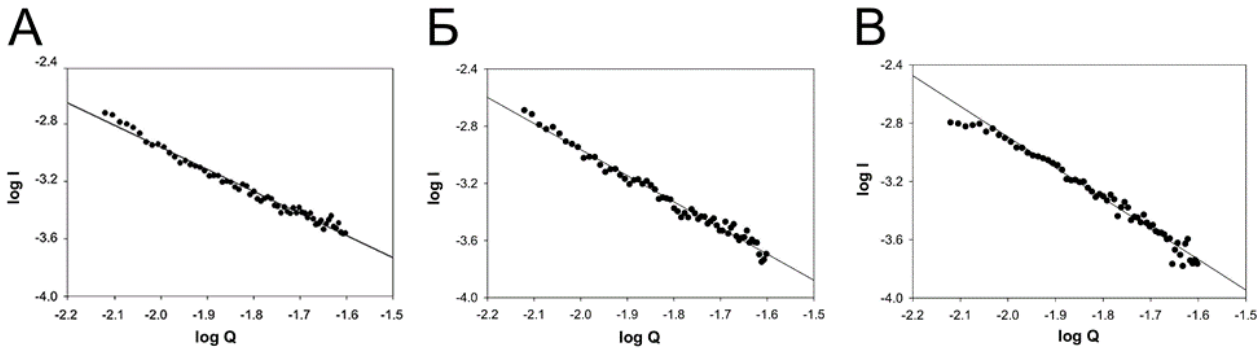


Рис. 38. Исследование агрегатов $ГМТ_{НМИ}$ методом СМУРР. Кривые рассеяния рентгеновского излучения в логарифмическом представлении, log I против log Q, где I – интенсивность рассеяния; Q – модуль вектора рассеяния; А – Кривая рассеяния рентгеновского излучения неагрегированной формы $ГМТ_{НМИ}$. *tg A* = –1.2; Б – Кривая

рассеяния рентгеновского излучения агрегатов $ГМТ_{НМИ}$, сформированных в растворе, содержащем 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0. *tg A* = –1.86; В – Кривая рассеяния рентгеновского излучения агрегатов $ГМТ_{НМИ}$, сформированных в растворе, содержащем 0.15 М глицин-КОН, pH 7.0. *tg A* = –1.95. Измерения проводились при T=25°C, концентрация белка c = 0.5 мг/мл. Воспроизведено из работ (Bobylev et al., 2023; Timchenko et al., 2024), выполненных при участии автора диссертации.

Итак, результаты наших исследований показывают, что низкомолекулярная изоформа гладкомышечного титина формирует *in vitro* разные по морфологии аморфные агрегаты, отличающиеся по связыванию красителя ТТ и способности к дезагрегации. Оба типа агрегатов по имеющимся данным, имеют четвертичную кросс β-структуру и одинаковую вторичную структуру.

3.5. СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АМИЛОИДНЫХ АГРЕГАТОВ ГМТ И С-БЕЛКА

3.5.1. Идентификация рефлексов, полученных методом рентгеновской дифракции

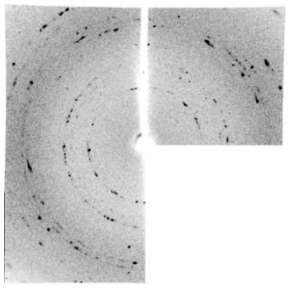
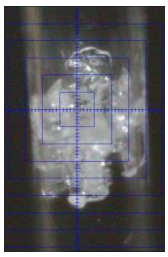
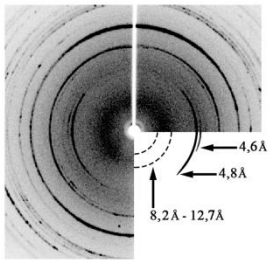
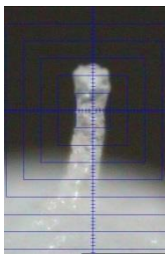
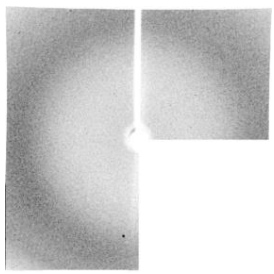
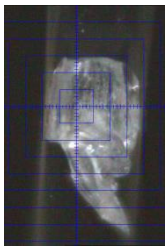
Итак, проведенные нами исследования показали, что ГМТ и С-белок формируют *in vitro* амилоидные агрегаты. Было обнаружено, что гладкомышечный титин способен формировать амилоидные агрегаты двух типов, которые имели четвертичную кросс-β структуру, но отличались по способности связываться с красителем ТТ. При этом у одного из типов амилоидных агрегатов, имеющих низкую способность к связыванию с ТТ, была выявлена способность к дезагрегации. Методами кругового дихроизма и ИК-Фурье спектроскопии не было выявлено изменений во вторичной структуре ГМТ и С-белка при формировании агрегатов. Также было показано, что ГМТ и С-белок формировали именно амилоидные агрегаты, что подтверждалось наличием четвертичной кросс-β структуры, полученной методом рентгеновской дифракции. В данном разделе будут приведены и в какой-то мере обсуждены дополнительные результаты, полученные методом рентгеновской дифракции.

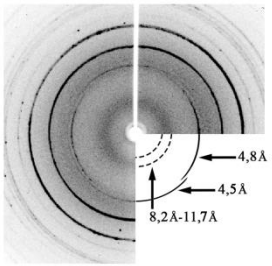
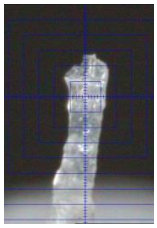
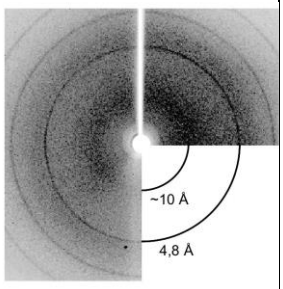
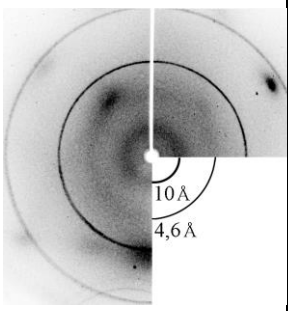
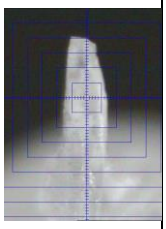
Известно, что основное свойство всех амилоидных агрегатов – это наличие преобладающей четвертичной кросс-β структуры (Sunde et al., 1997; Nelson, Eisenberg, 2006). Наличие подобной структуры определяется методом рентгеновской дифракции. На рентгенограммах препаратов частично выровненных (ориентированных) амилоидных фибрилл регистрируются два дифракционных рефлекса в меридиональном и экваториальном направлениях (Astbury et al., 1935; Eanes, Glenner, 1968; Makin, Serpell, 2005(b); Jahn et al., 2010). Первый тип дифракционных рефлексов, расположенных вертикально на дифракционной картине (меридиональные рефлексы), соответствует периоду 4.7-4.8 Å. Этот период указывает на то, что полипептидные цепи расположены перпендикулярно оси фибриллы, и расстояние между ними 4.7-4.8 Å. Второй тип дифракционных рефлексов, расположенные по горизонтали дифракционной картины (экваториальные рефлексы), соответствуют периоду 10-11 Å. Данные рефлексы указывают на то, что полипептидные цепи организованы в β-листы, которые находятся на расстоянии 10-11 Å друг от друга (Wille et al., 2009; Eisenberg, Jucker, 2012).

В случае менее ориентированных фибрилл оба типа рефлексов размываются и отображаются на дифракционной картинке в виде кольца (Morris, Serpell, 2012). Поэтому при исследовании амилоидных структур методом рентгеновской дифракции проводят специальную подготовку образца, позволяющую получить хорошо ориентированные фибриллы. В нашем исследовании структуры агрегатов титина и С-белка методом рентгеновской дифракции применялась именно такая техника приготовления образца. В частности, каплю концентрированного препарата белка в буферном растворе помещали между двумя стеклянными палочками, покрытыми парафином и находящимися на расстоянии 3-5 мм. При высыхании капли белок ориентировался в одном направлении, вытягиваясь между двумя стеклянными палочками, превращаясь в тонкую нить. Подобная техника приготовления образца описана в работе (Morris, Serpell, 2012) и использовалась нами (Табл. 7). Далее образец помещали в пучок рентгеновских лучей. Мы получили ряд рефлексов, которые отображались на дифракционной картинке в виде колец. Присутствие других «неамилоидных» рефлексов потребовало проведения дополнительных исследований.

Итак, помимо вышеуказанных «амилоидных» рефлексов были обнаружены и другие (Табл. 7 *б, г, д, е*), которые не удалось идентифицировать, то есть определить, каким структурным элементам они соответствуют в агрегатах титина и С-белка. Одним из предположений наличия дополнительных рефлексов было возможное присутствие примесей в виде кристаллов солей и других компонентов буферных растворов, от которых нам не удалось до конца избавиться на этапе приготовления препарата. Возникло сомнение в принадлежности основных рефлексов (~8-12 Å и ~4.8 Å) к исследуемым нами белкам. Поэтому были проведены дополнительные исследования методом рентгеновской дифракции как образцов используемых буферных растворов, так и агрегатов исследуемых белков.

Таблица 7. Данные, полученные методом рентгеновской дифракции (мод. из Bobylev et al., 2020, с дополнениями).

	Дифракционная картина	**Кристаллы образца**	**Состав исследуемого образца**	**Полученные рефлексы**
(а)			Буферный раствор, содержащий 0.2 М KCl, 10 мМ имидазола	2.8; 3.2; 3.4; 3.7; 3.8, 3.9; 4.1; 4.4; 5.8; 6.3; 8.2 Å
(б)			Гладкомышечный титин (м.м. 500 кДа) в агрегированной форме в 0.2 М KCl, 10 мМ имидазола (агрегация 24 часа)	2.2; 2.4; 2.9;3.1; 3.7; 3.8; 4.3; 4.6; **4.8**; **8.2-12.7** Å**.**
(в)			Буферный раствор, содержащий 0.15 М глицин-KOH	Область диффузии ~3.7 Å

(г)			Гладкомышечный титин (м.м. 500 кДа) в агрегированной форме в 0.15 М глицин-КОН (агрегация 24 часа)	2.2; 2.4; 2.5; 2.6; 2.8; 3.1; 3.7; 4.5; **4.8**; **8.2-11.7** Å
(д)			Гладкомышечный титин (м.м. 1500 кДа) в агрегированной форме в 0.15 М глицин-КОН (агрегация 24 часа)	2.9; 3.8; 4.3; **4.8**; **8-13.** Å**.**
(е)			С-белок в агрегированной форме в 0.15 М глицин-КОН (агрегация 24 часа)	3.1; 3.7; **4.6 (по центру)**; **9-12** Å**.**

В таблице 7 (строки *б* и *г*) приведены полученные нами дифракционные рефлексы агрегатов низкомолекулярной изоформы гладкомышечного титина, сформированных в 2-х растворах: 0.2 М KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0 *(б)* и 0.15 М глицин-КОН, pH 7.0 *(г)*. Как видно, оба типа агрегатов титина имеют схожую дифракционную картину с основными рефлексами (~8-12 Å и ~4.8 Å). Агрегаты $ГМТ_{ВМИ}$, сформированные в растворе, содержащем 0.15 М глицин-КОН, pH 7.0, имеют два кольцевых рефлекса (~8-12 Å и ~4.8 Å) (Табл. 7 *д*). В то же время агрегаты С-белка, сформированные в растворе, содержащем 0.15 М глицин-КОН, pH 7.0, имеют два размытых кольцевых рефлекса (~8-12 Å и размытый кольцевой рефлекс ~4.6 Å по центру) (Табл. 7 *е*). Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что агрегаты исследуемых белков имеют четвертичную кросс-β структуру и являются амилоидными (Sunde, Blake, 1997; Serpell et al., 2000; Ivanova et al., 2004; Ramshini et al., 2011; Papanikolopoulou et al., 2005; Fowler et al., 2006).

В таблице 7 (строки *а, в*) приведены данные рентгеновской дифракции отдельно буферных растворов, использованных для агрегации ГМТ и С-белка. Как видно, компоненты буферного раствора (0.2 М KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0) тоже имеют рефлексы, из которых только 3.7 Å и 3.8 Å совпадают с рефлексами образца белка (Табл. 7 *а*, *б*). В буферном растворе глицина не было обнаружено рефлексов, а наблюдалась лишь область диффузии с центром ~3.7 Å (Табл. 7 *в*). Другие рефлексы (кроме 3.7-3.8 Å) на рентгенодифракционных картинах исследуемых белков и буферных растворов не совпадают. Область диффузии с центром ~3.7 Å в образце с буферным раствором, содержащим 0.15 М глицин-KOH вероятно может соответствовать расстоянию между Cα атомами в транс-конформации C–N связи самого глицина. Таким образом, наше предположение о том, что дополнительные рефлексы (помимо ~8-12 Å и ~4.8 Å) на рентгенодифракционных картинах титина являются следствием присутствия в образце примесей в виде кристаллов солей и других компонентов буферных растворов, не подтвердилось. Анализируя полученные результаты, стоит также отметить следующее. Известно, что рефлексы 9.47, 4.76 и 2.38 Å могут быть первым, вторым и четвертым порядками рефлекса 9.47 Å соответственно (Inouye et al., 1993). Рефлекс 2.4 Å, наблюдаемый на наших рентгенодифракционных картинах титина, может соответствовать четвертому порядку вышеуказанного рефлекса (Табл. 7 *б*, *г*). Также известно, что рефлекс 3.7 Å (Табл. 7 *б, г, е*) соответствует парафину, с помощью которого крепится образец (Selivanova et al., 2016).

3.5.2. Особенность основных «амилоидных» рефлексов, полученных для агрегатов исследуемых белков

Другое наше затруднение было связано с интерпретацией основных «амилоидных» рефлексов на дифракционной диаграмме агрегатов исследуемых белков. Сначала проанилизируем данные, полученные для низкомолекулярной изоформы гладкомышечного титина. Первый дифракционный рефлекс (4.8 Å) у обоих образцов $ГМТ_{НМИ}$ располагался не по вертикали дифракционной картины (меридиональное направление), а по горизонтали (экваториальное направление) (Табл. 7 *б, г*). Исходя из этого, мы сделали предположение, что β-участки в агрегатах

$ГМТ_{НМИ}$ располагаются не перпендикулярно оси фибриллы, как это описано для других амилоидных белков, а – параллельно. Второй рефлекс (~8-12 Å), характеризующий расстояние между β-листами, был диффузным и кольцевым (Табл. 7 *б, г*). Мы предполагаем, что расстояние между β-листами может варьировать, а сами β-листы не являются строго ориентированными по одной из осей. Здесь следует отметить, что подобное явление, когда один из рефлексов, описанных для кросс-β структуры, является кольцевым, а второй не является таковым, в литературе не встречалось. Полученные данные указывают на уникальность и сложность объекта нашего исследования – мультидоменных мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов.

В случае с агрегатами $ГМТ_{ВМИ}$ и С-белка, оба амилоидных рефлекса являются кольцевыми (Табл. 7 *д, е*). Наличие кольцевых рефлексов 4.6-4.8 Å у агрегатов $ГМТ_{ВМИ}$ и С-белка предполагает, что β-участки ориентированы под разными углами относительно оси фибриллы. Несмотря на то, что среди множества исследователей распространена точка зрения о том, что аморфные агрегаты не могут быть амилоидными, полученные нами данные, говорят об обратном. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют, что гладкомышечный титин и скелетномышечный С-белок образуют амилоидные аморфные агрегаты с уникальной структурой.

3.6. РАСЧЕТ ИДЕНТИЧНОСТИ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ МЕЖДУ ПАРАМИ ДОМЕНОВ И НЕСТРУКТУРИРОВАННЫХ УЧАСТКОВ ГМТ И С-БЕЛКА

3.6.1. Расчет идентичности аминокислотной последовательности между парами доменов титина и С-белка

Как известно, устойчивость или склонность белка к агрегации связана с первичной структурой (см. п. 1.3.1). Для выявления участков с большой идентичностью аминокислотной последовательности, которые, по известным данным, имеют повышенную склонность к агрегации (Borgia et al., 2015), мы рассчитали идентичность в аминокислотной последовательности между соседними

парами доменов титина и С-белка. Для расчетов были выбраны куриный титин (UniProtKB – A6BM71_CHICK) и два паралога С-белка скелетных мышц человека: (UniProtKB – Q00872_MYPC1_HUMAN) – «медленный» паралог и (UniProtKB – Q14324_MYPC2_HUMAN) «быстрый» паралог.

Таблица 8. Идентичность аминокислотной последовательности.

Белок	Домен 1 (из пары сравнения)	Число доменов в группе	Средняя длина домена	Домен 2 (из пары сравнения)	**(id) Средняя идентичность, %**	Sid стандартное кв отклонение или разброс идентичности, %	N_0, количество пар доменов с нулевой идентичностью	N, общее количество пар доменов	0/N*100%
Титин (Курица)	Ig	64	81.4	Ig	**20%**	11%	647	4032	16%
	Ig	64	81.4	FnIII	**3%**	4%	223	384	58%
	Ig	64	81.4	none	**2%**	6%	526	704	75%
	FnIII	6	84.3	FnIII	**33%**	7%	0	30	0%
	FnIII	6	84.3	none	**2%**	2%	43	66	65%
	none	11	104.2	none	**3%**	5%	59	110	54%
С-белок, «медленный» паралог (Человек)	Ig	7	90.1	Ig	**13**	10%	10	42	24
	Ig	7	90.1	FnIII	**3**	4%	11	21	52
	Ig	7	102.7	none	**1**	3%	10	14	71
	FnIII	3	102.7	FnIII	**25**	4%	0	6	0
	FnIII	3	88.5	none	**4**	6%	3	6	50
	none	2	96.7	none	**0**	0%	2	2	100
	Ig	7	96.7	Ig	**14**	9%	8	42	19

С-белок, «быстрый» паралог (Человек)	Ig	7	96.7	FnIII	**2**	4%	14	21	67
	Ig	7	96.3	none	**3**	5%	8	14	57
	FnIII	3	96.3	FnIII	**26**	1%	0	6	0
	FnIII	3	75	none	**3**	3%	3	6	50
	none	2	90.1	none	**8**	0%	0	2	0

Идентичность рассчитана по формуле:

$Id = 2*N_{id}/(L_1+L_2)$

N_{id} – число идентичных остатков в выравнивании

L – Число остатков в домене

Аминокислотная последовательность доменов титина курицы взяты с сайта: UniProtKB – A6BM71_CHICK. Эта последовательность соответствует части молекулы титина, расположенной в I-зоне саркомера поперечно-полосатых мышц (Noguchi et. al., 2007). Полная последовательность для гладкомышечной изоформы титина или полноразмерного куриного скелетномышечного титина в литературе отсутствует.

Аминокислотная последовательность доменов «медленного» паралога С-белка была взята с сайта http://www.uniprot.org/uniprot/Q00872

Аминокислотная последовательность доменов «быстрого» паралога С-белка была взята с сайта http://www.uniprot.org/uniprot/Q14324

Если между доменами было расстояние более 50 остатков, то создавался псевдодомен, обозначенный в таблице 8 как «none».

Расчеты, проведенные для титина с помощью программы BLAST, показали, что средняя идентичность в аминокислотной последовательности между соседними FnIII-доменами не превышает 33±7%; между соседними Ig-доменами – 20±11%, что является относительно низким показателем (Табл. 8). Однако в двух случаях наблюдались домены с идентичностью выше 50%.

Результаты идентичности аминокислотной последовательности между доменами, рассчитанные для двух паралогов С-белка, также представлены в таблице 8. Как видно из таблицы, средняя идентичность между соседними доменами в обоих паралогах не превышает 26%, что также является относительно низким показателем. Максимальная идентичность, равная 30% зарегистрирована между доменами Fn1 и Fn2 для «медленного» паралога С-белка.

3.6.2. Расчет идентичности аминокислотной последовательности между парами доменов I-зоны N2B и N2BA-изоформ титина

Вариации в идентичности аминокислотной последовательности доменов титина могут иметь значение в регулировании сложного механизма взаимодействия между доменами титина с разной идентичностью. И хотя в целом наши данные указывают на относительно низкий процент идентичности аминокислотной последовательности между парами доменов титина и С-белка, эти показатели на отдельных участках молекулы белка могут вносить вклад в регуляцию вязкоупругих свойств его молекулы. Мы провели дополнительно расчеты идентичности аминокислотной последовательности у Ig-доменов вариабельного участка I-зоны молекулы титина, имеющегося только у длинной N2BA-изоформы этого белка (Рис. 39).

С помощью программы BLAST нами обнаружено, что домены этого участка имеют более высокую идентичность аминокислотной последовательности (~32%, рассчитанной для 26 доменов) по сравнению с таковой (~23-25%, рассчитанной для 30 доменов) у других доменов I-зоны N2B и N2BA-изоформ титина. Известны данные, полученные методом ДРС, что скорость агрегации доменов титина, имеющих более высокую идентичность аминокислотной последовательности, выше таковой у доменов, имеющих более низкую идентичность аминокислотной последовательности (Wrigh et al., 2005).

До сих пор не существует точного представления о том, как укладывается этот гигантский белок в I-зоне саркомера поперечно-полосатых мышц. Однако, принимая во внимание данные по агрегации титина *in vitro,* а также наше предположение о возможном связывании *in vivo* близко расположенных доменов одной и той же или разных молекул титина, можно предположить, что в этом случае, домены вариабельного участка N2BA-изоформы будут иметь более высокую склонность к агрегации, чем другие домены. Подобные изменения приведут к увеличению жесткости агрегированного участка N2BA-изоформы титина, что может иметь значение в опосредованной регуляции актин-миозинового взаимодействия.

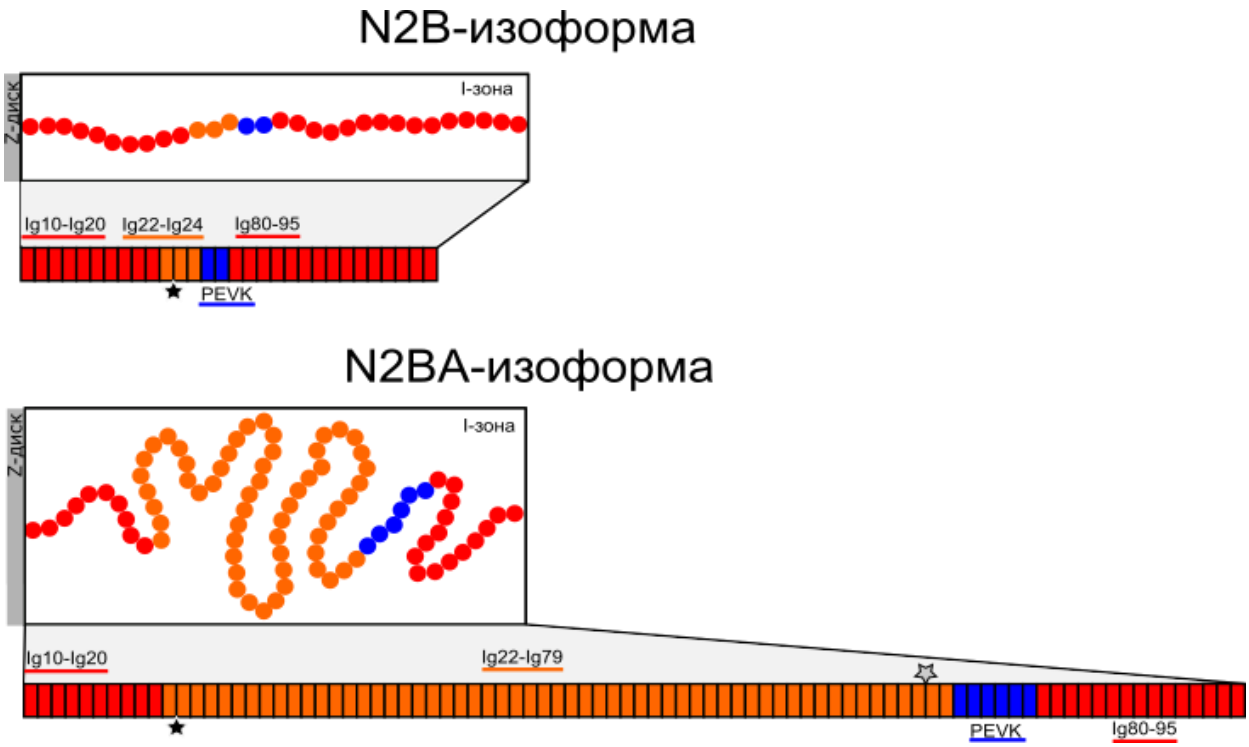


Рис 39. Схематическое изображение доменной структуры сердечных изоформ титина в I-зоне саркомера. Последовательность доменной структуры титина представлена по базе данных UniProtKB – Q8WZ42 (TITIN_HUMAN). Обе изоформы содержат одинаковые последовательности: проксимальную (Ig10-Ig20) и дистальную (Ig80-95). N2BA-изоформа титина в отличие от более короткой и жесткой N2B-изоформы имеет более длинный средний участок, состоящий из иммуноглобулин-подобных доменов (Ig22-Ig79), большая часть из которых является вариабельным (по-разному сплайсируется у разных изовариантов N2BA) участком (Ig25-79). PEVK-последовательность в N2B-изоформе укорочена. В обеих изоформах есть уникальная N2-Bus последовательность, состоящая из трех иммуноглобулиновых доменов и уникальной последовательности, содержащей 572 аминокислотных остатка (располагается после Ig22). В N2BA-изоформе присутствует также N2A-последовательность, состоящая из четырех иммуноглобулин-подобных доменов и участка уникальной последовательности, содержащей 106 аминокислотных остатков (располагается перед PEVK-участком); на схеме их локализация указана звездочками. Воспроизведено из работы (Yakupova et al., 2017), выполненной при участии автора диссертации.

Вариации в идентичности аминокислотной последовательности доменов титина могут иметь значение в регулировании сложного механизма взаимодействия между доменами титина с разной идентичностью. И хотя в целом наши данные

указывают на относительно низкий процент идентичности аминокислотной последовательности между парами доменов титина и С-белка, данные показатели на отдельных участках молекулы белка могут вносить вклад в регуляцию вязкоупругих свойств его молекулы.

В дополнении мы подсчитали количество амилоидогенных сегментов в случайно выбранных доменах фрагмента титина курицы, предсказанное с помощью программы FoldAmyloid (три Ig-подобных и три FnIII-подобных). В каждом из подсчитанных доменов есть как минимум два амилоидогенных сегмента. Ig-подобный (I10) домен имеет пять таких сегментов. Эти данные также свидетельствуют о высокой потенциальной склонности титина к амилоидной агрегации, присущей его доменам.

3.6.3. Расчет неупорядоченных участков в молекуле титина и С-белка

По данным КД и ИК-Фурье спектроскопии содержание неупорядоченных участков у С-белка и ГМТ составляет более 50%. Мы воспользовались математическим подходом прогнозирования неупорядоченных участков, чтобы оценить распределение неупорядоченных областей на отдельных участках молекулы белка. Наличие неупорядоченной структуры у ГМТ было выявлено при анализе аминокислотной последовательности UniProtKB – A6BM71_CHICK с помощью специализированной математической программы IsUnstruct (Lobanov et al., 2013; Lobanov, Galzitskaya, 2011).

На рисунке 40 показана схема доменной структуры фрагмента титина курицы и профили вероятности наличия неупорядоченных участков в белке. Средняя неупорядоченность для фрагмента титина PRK12323 составила 90%.

Для Ig-подобных доменов в среднем также было предсказано 90% неупорядоченности, в то время как для FnIII-подобных доменов было предсказано 30% неупорядоченности. Кроме того, у участков белка, обозначенных как «none», было предсказано в среднем 55% неупорядоченности.

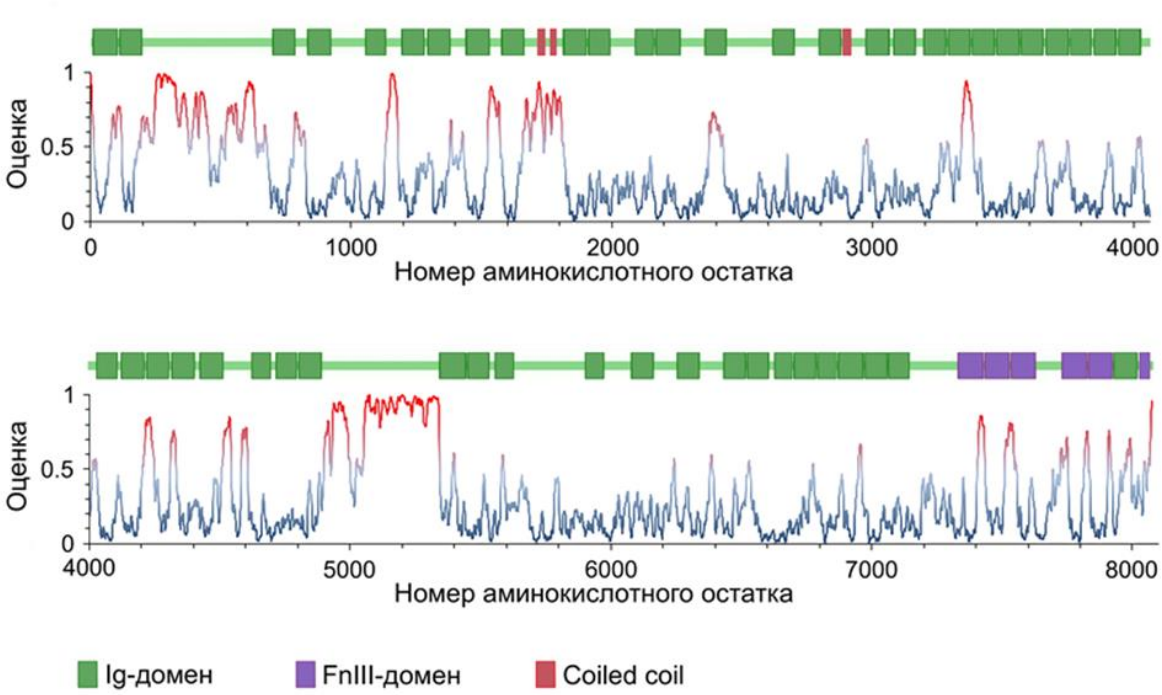


Рис. 40. Схема последовательности доменов титина курицы, совмещенная с графиками прогнозирования неупорядоченной структуры, рассчитанной с помощью программы IsUnstruct (Lobanov et al., 2013). Вероятность ≥0.5 означает неупорядоченную структуру. Воспроизведено из работы (Bobylev et al., 2023), выполненной при участии автора диссертации.

На рисунке 41 показана схема доменной структуры С-белка и профили вероятности наличия неупорядоченных участков в белке. В целом, результаты для обоих паралогов С-белка аналогичны. Большинство неупорядоченных участков находятся в PA- и M-доменах, которые ближе к N-концу молекулы. Другие неупорядоченные участки находятся в C5 Ig-подобном и C6–C7 FnIII-подобных доменах С-белка, а также в C5 Ig-подобном и C6 FnIII-подобных доменах этого белка.

Анализируя полученные данные, можно сделать основный вывод, что достаточно большой процент в молекулах исследуемых белков, особенно титина, предсказывается как неупорядоченная структура. В целом, неструктурированные области равномерно распределены вдоль всей молекулы исследуемых белков. Это, скорее всего, является определённым компонентом стабильности и, по-видимому, играет определённую роль в формировании амилоидных агрегатов с описанными нами структурными особенностями.

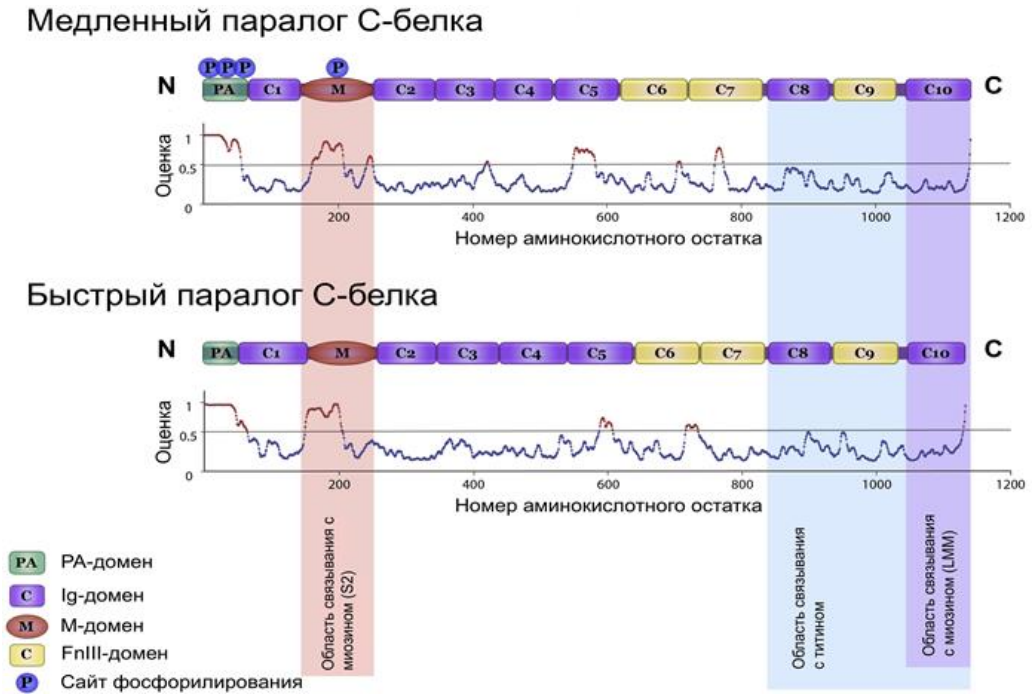


Рис. 41. Схема последовательностей доменов С-белка человека, совмещенная с графиками прогнозирования неупорядоченной структуры, рассчитанной с помощью программы IsUnstruct (Lobanov et al., 2013). Вероятность ≥0.5 означает неупорядоченную структуру. Большинство неупорядоченных участков находятся в PA- и M-доменах, которые ближе к N-концу молекулы. Оба белка также имеют область с неупорядоченными участками аминокислотной последовательности (аминокислотные остатки 550–770, в центральной части молекулы) в области C5 Ig и C6–C7 FnIII доменов. Воспроизведено из работы (Bobyleva et al., 2021), выполненной при участии автора диссертации.

3.7. ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АМИЛОИДНЫХ АГРЕГАТОВ ГМТ И С-БЕЛКА НА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК

3.7.1. Изучение цитотоксического действия амилоидных агрегатов ГМТ и С-белка

Накопление белковых отложений в виде амилоидных фибрилл, как правило, связывают с тяжелой клеточной дегенерацией в местах данных отложений. При этом точный механизм патогенеза амилоидозов не ясен. Главный вопрос состоит в том, являются ли амилоиды причиной клеточной дегенерации или же просто представляют собой видимые побочные продукты процесса разрушения клеток. Тем не менее, установлено, что явления неправильного сворачивания/агрегации белка и

клеточной дегенерации взаимосвязаны. В настоящее время предлагается несколько возможных механизмов цитотоксичности, связанной с белковыми отложениями (Uversky, 2010). И наиболее токсичными для клеток являются олигомеры. Подробно о механизмах токсичности на клетки и организм животных и человека написано выше в п.2.3. Известно, что наиболее токсическое действие на клетки оказывают олигомеры. Поскольку, исследуемые нами мышечные белки являются амилоидными, была поставлена задача выяснить токсический эффект амилоидных агрегатов ГМТ и С-белка на клетки организма. Отдельный интерес представляло исследование цитотоксичности стабильных олигомеров, которые образовывал С-белок.

Для исследования цитотоксичности была выбрана культура гладкомышечных клеток. В качестве контроля был выбран фибриллярный актин.

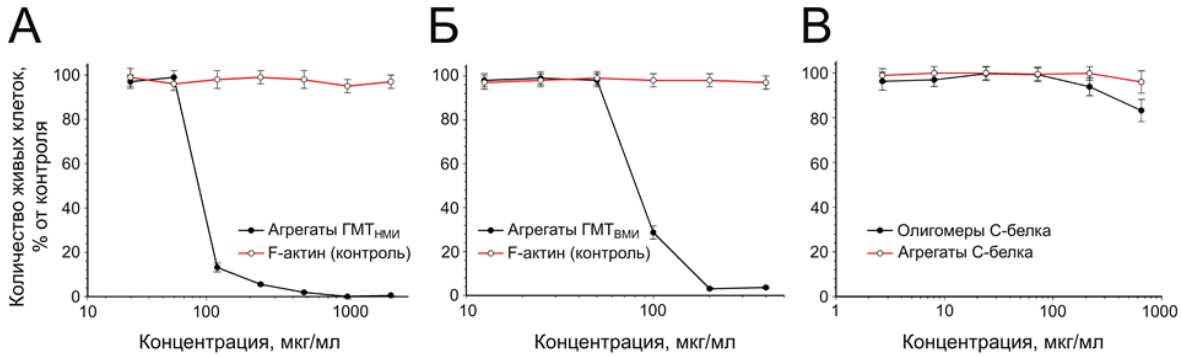


Рис. 42. Исследование цитотоксичности агрегатов ГМТ и С-белка на ГМК аорты крысы. А – Токсическое действие амилоидных агрегатов $ГМТ_{НМИ}$, IC50 =70 мкг/мл; Б – Токсическое действие амилоидных агрегатов $ГМТ_{ВМИ}$, IC50 =70 мкг/мл; В – Влияние агрегатов С-белка (красная линия) и олигомеров С-белка (черная линия). Время инкубации 72 ч. Ф-актин использовали в качестве контроля. Воспроизведено из работ (Bobylev et al., 2016; Bobylev et al., 2021; Bobyleva et al., 2021), выполненных при участии автора диссертации.

На рисунке 42 представлены данные о цитотоксическом действии агрегатов ГМТ и С-белка на культуру гладкомышечных клеток через 72 ч. Стоит отметить, что в течение 72 часов никаких негативных эффектов не наблюдалось. Через 72 часа наблюдался токсический эффект у агрегатов ГМТ (Рис. 42 А, Б). Выживаемость 50% клеток (IC_{50}) в присутствии агрегатов обоих изоформ ГМТ наблюдалась при концентрации белка 70 мкг/мл. Гибели клеток в присутствии агрегатов при более

низких концентрациях не наблюдалось. Вопреки ожиданиям, гибель клеток не наблюдалось в присутствии как агрегатов, так и олигомеров С-белка (Рис. 42 В).

Таким образом, агрегаты ГМТ оказали токсическое действие на гладкомышечные клетки в отличие от агрегатов и олигомеров С-белка. Важно отметить, что гибель клеток наблюдалось только через 72 часа после добавления агрегатов ГМТ в клеточную культуру. Поэтому следующая задача заключалась в выяснении механизма токсического действия агрегатов ГМТ на клетки.

3.7.2. Изучение влияния амилоидных агрегатов ГМТ на актиновый цитоскелет гладкомышечных клеток

Поскольку ГМТ является одним из основных белков гладкомышечной ткани, мы провели исследования влияния амилоидных агрегатов этого белка на гладкомышечные клетки. Влияние агрегатов ГМТ на актиновый цитоскелет гладкомышечных клеток аорты крысы изучали методом конфокальной микроскопии. Через 48 часов присутствия амилоидных агрегатов двух изоформ ГМТ в культуре ГМК наблюдалась дезорганизация актинового цитоскелета (Рис. 43 В-Е). Также наблюдались следующие морфологические изменения клеток: появление филоподий, стрессовых волокон и ламеллоподий. Данные морфологические изменения в первую очередь указывают на нарушение адгезии клеток в присутствии агрегатов ГМТ.

При добавлении к культуре клеток неамилоидного Ф-актина нарушений актинового цитоскелета, а также появления ламеллоподий и филоподий не наблюдалось (Рис. 43 А, Б). Выявленные морфологические изменения указывают на возможное нарушение агрегатами титина клеточной адгезии (Parsons et al., 2010; Shemesh et al., 2009; Hotulainen, Lappalainen, 2006).

Таким образом, нарушение адгезии ГМК при добавлении к ним агрегатов гладкомышечного титина указывало на негативный эффект амилоидных агрегатов этого белка. Однако механизм подобного негативного влияния агрегатов титина на адгезию клеток оставался не ясным, что требовало дополнительных исследований. Прежде всего необходимо было найти ответ на вопрос, как добавление к

распластанным в культуре клеткам белковых агрегатов может приводить к нарушению взаимодействия клеток с поверхностью, на которой они закреплены?

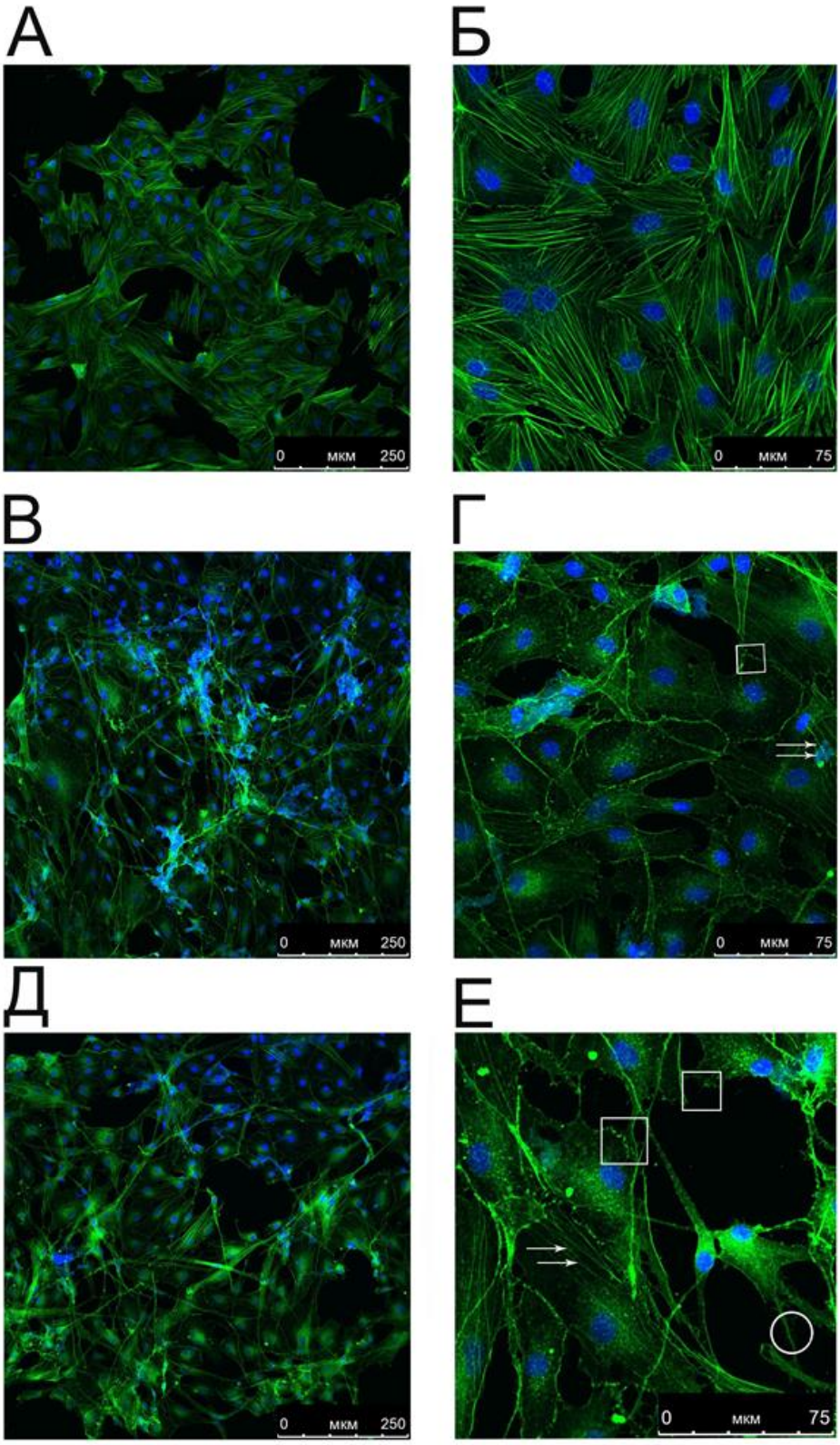


Рис. 43. Конфокальная микроскопия клеток аорты крысы, окрашенных флуоресцентным красителем Phalloidin-Atto 488 для визуализации актинового цитоскелета (зеленый цвет) и Hoechst 33342 (синий цвет) для визуализации ядер клеток. А, Б – гладкомышечные клетки

в присутствии Ф-актина (контроль); В, Г – гладкомышечные клетки в присутствии амилоидных агрегатов $ГМТ_{НМИ}$, время инкубации 48 ч; Д, Е – гладкомышечные клетки в присутствии амилоидных агрегатов $ГМИ_{ВМИ}$, время инкубации 48 ч. Стрелками показаны стрессовые волокна, внутри круга показаны филоподии, внутри квадратов – ламеллоподии. Воспроизведено из работ (Bobylev et al., 2016; Bobylev et al., 2021), выполненных при участии автора диссертации.

При проведении дополнительных исследований визуально было обнаружено, что амилоидные агрегаты ГМТ из-за больших размеров осаждаются на дно и формируют окружение вокруг клеток. Это хорошо было видно на другой исследуемой культуре клеток – пульпы зуба человека (Рис. 44 Б, В). Таким образом, мы предположили, что нарушение адгезии клеток было следствием взаимодействия агрегатов белка непосредственно с клеточной мембраной.

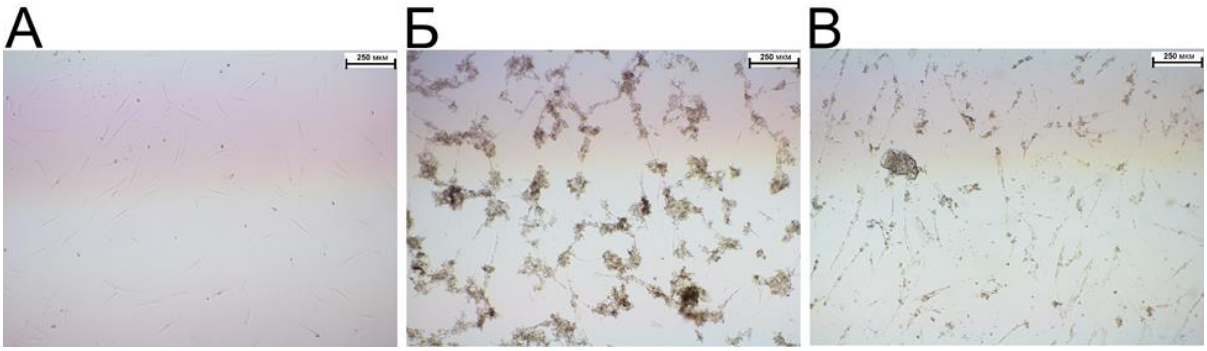


Рис. 44. Световая микроскопия МСК ПЗЧ (мезенхимально-стромальная культура пульпы зуба человека) в отсутствии агрегатов ГМТ – контроль (А), в присутствии амилоидных агрегатов $ГМТ_{НМИ}$ (Б), и в присутствии амилоидных агрегатов $ГМТ_{ВМИ}$ (В). Наблюдаются амилоидные агрегаты, которые локализованы вокруг клеток (Б, В). Изображения получены совместно с сотрудниками Лаборатории фармакологической регуляции и клеточной резистентности ИТЭБ РАН.

3.7.3. Изучение влияния поверхности, покрытой амилоидными агрегатами ГМТ, на адгезию фибробластов

Учитывая, что агрегаты титина, имеют большие размеры (от 5-10 мкм и более), мы предположили, что основной причиной нарушения адгезии и гибели клеток может быть непосредственное взаимодействие агрегатов этого белка с белками мембраны клеток. Более того, агрегаты белка могли прилипать к поверхности лунок

планшета и, тем самым, мешать миграции и адгезии клеток. Клетка, находящаяся на поверхности агрегатов ГМТ, вероятно, не могла прикрепиться, в результате чего мы могли наблюдать морфологические изменения, описанные выше.

Для проверки высказанного предположения мы провели прямое исследование возможности клеток закрепляться и расти непосредственно на поверхности амилоидных агрегатов ГМТ. Для этого на ½ поверхности предметных стекол был нанесен равномерным слоем агрегированный ГМТ. Схема эксперимента представлена на рисунке 45.

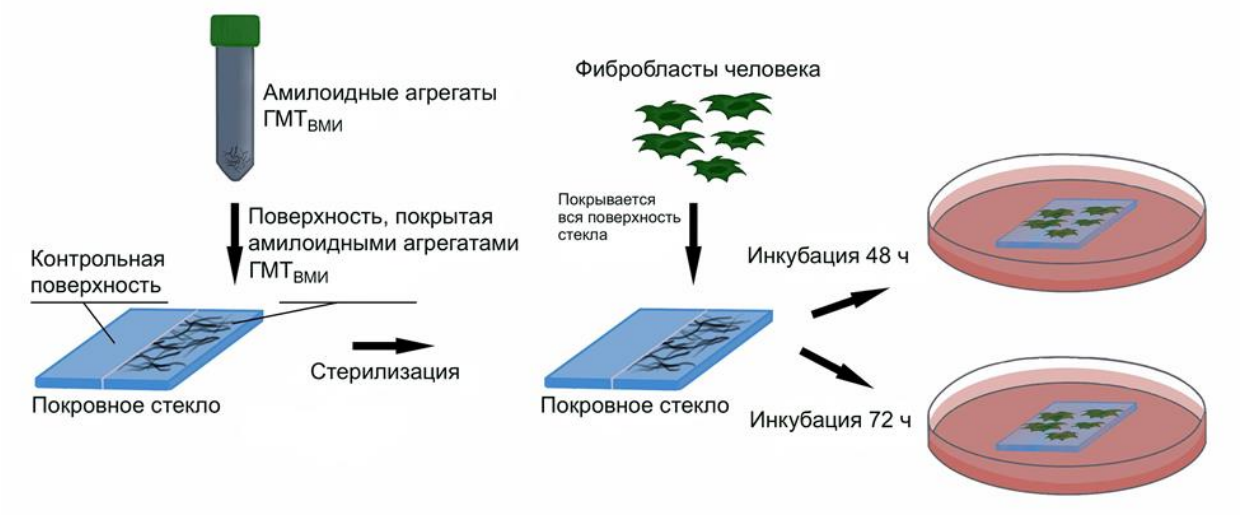


Рис. 45. Рост фибробластов на поверхности, покрытой амилоидными агрегатами $ГМТ_{ВМИ}$. Воспроизведено из работы (Bobylev et al., 2021), выполненной при участии автора диссертации.

В качестве культуры были выбраны культура фибробластов человека. Клетки высаживались непосредственно на поверхность покровного стекла, как покрытую амилоидными агрегатами ГМТ (опыт), так и в отсутствии агрегатов (контроль). Фибробласты являются наиболее многочисленными клетками в различных тканях организма. Они играют важную роль в ангиогенезе и регенерации тканей (Wang et al., 2012; Guerreiro et al., 2012; Guan et al., 2009). Фибробласты секретируют различные факторы роста и ангиогенные факторы, например, фибронектин, трансформирующий фактор роста (TGF-β1), основной фактор роста фибробластов (bFGF), коллаген I и III, фактор роста соединительной ткани и т.д. И эта особенность делает фибробласты ключевыми игроками в контроле внеклеточной среды, а также регуляции поведения соседних клеток и их реакции на окружающую среду.

Мы наблюдали достоверное уменьшение числа фибробластов через 48 и 72 ч роста на поверхности, покрытой амилоидными агрегатами $ГМТ_{ВМИ}$, по сравнению с контролем (Рис. 46). Кроме того, как и в случае с гладкомышечными клетками у фибробластов наблюдали частичную или полную дезорганизацию актинового цитоскелета. Фибробласты, растущие на поверхности, покрытой амилоидными агрегатами $ГМТ_{ВМИ}$, характеризовались морфологическими изменениями в виде наличия филоподий, а также большого количества стрессовых волокон и ламеллоподий, что свидетельствует об усилении миграции клеток. Эти результаты, в свою очередь, свидетельствуют о нарушении клеточной адгезии и, как следствие, снижении скорости роста клеток.

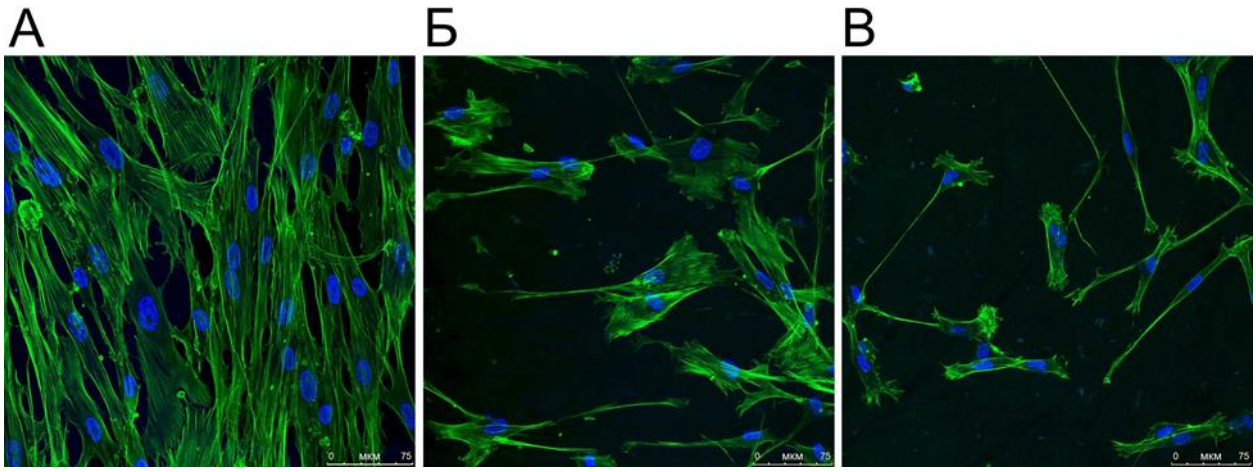


Рис. 46. Конфокальная микроскопия культуры фибробластов кожи человека, окрашенных флуоресцентным красителем Phalloidin-Atto 488 для визуализации актинового цитоскелета (зеленый цвет) и Hoechst 33342 (синий цвет) для визуализации ядер клеток. А – фибробласты (контроль), растущие на поверхности стекла; Б и В – рост фибробластов на поверхности покровного стекла, покрытого амилоидными агрегатами $ГМТ_{ВМИ}$ (Б – 48 ч инкубации; В – 72 ч инкубация). Воспроизведено из работы (Bobylev et al., 2021), выполненной при участии автора диссертации.

Таким образом, мы показали, что ни агрегаты С-белка, ни его олигомеры не оказывают цитотоксического действия в диапазоне исследуемых концентраций, в то время как амилоидные агрегаты обеих изоформ $ГМТ_{ВМИ}$ нарушают адгезию клеток, в результате чего наблюдается их гибель по истечении 72 часов.

Полученные результаты указывают, на то, что агрегаты ГМТ формируют на поверхности наноструктуру, которая может препятствовать адгезии клеток.

3.7.4. Изучение морфологии и наноструктуры поверхностей, покрытых амилоидными агрегатами ГМТ, методом АСМ

Для выяснения причин нарушения клеточной адгезии было проведено исследование влияния рельефа поверхности, покрытой амилоидными агрегатами ГМТ, на адгезию фибробластов. Сначала была сформирована плёнка на поверхности покровного стекла, состоящая из амилоидных агрегатов $ГМТ_{ВМИ}$. Рельеф поверхности полученной плёнки был проанализирован с помощью АСМ. На рисунке 47 представлены АСМ изображения, на которых виден рельеф поверхности покровных стекол с нанесенными амилоидными агрегатами ГМТ. В качестве контроля использовали неагрегированную форму белка (Рис. 47 А). В отличие от агрегатов, неагрегированная форма белка наносилась на поверхность слюды. АСМ-изображения контрольных образцов показали наличие как отдельных молекул белка, так и олигомеров (Рис. 47 А).

На рисунке 47 (Б) и 46 (В) представлены 2-D и 3-D изображения, полученные с помощью АСМ, которые показывают морфологию и наноструктуру поверхности амилоидных агрегатов $ГМТ_{ВМИ}$. На рисунке представлены выборочные сектора, демонстрирующие области с наименьшей и наибольшей шероховатостью поверхности, встречаемые при множестве сканированных областей. Шероховатость определяли путем вычисления среднеквадратичного параметра шероховатости (RMS). Рассчитанные значения шероховатости поверхности варьировали от 2.7 нм до 4.9 нм в зависимости от масштаба сканирования, что значительно больше по сравнению с контрольными покровными стеклами без белкового покрытия (значения RMS менее 1 нм). Полученные значения шероховатости поверхности сопоставимы и даже превышают значения RMS искусственных антиадгезивных покрытий, описанных в литературе (Dang et al., 2015).

Полученные результаты указывают, на то, что агрегаты ГМТ формируют на поверхности наноструктуру, которая может препятствовать адгезии клеток. Данный механизм антиадгезивного действия амилоидных агрегатов описан впервые.

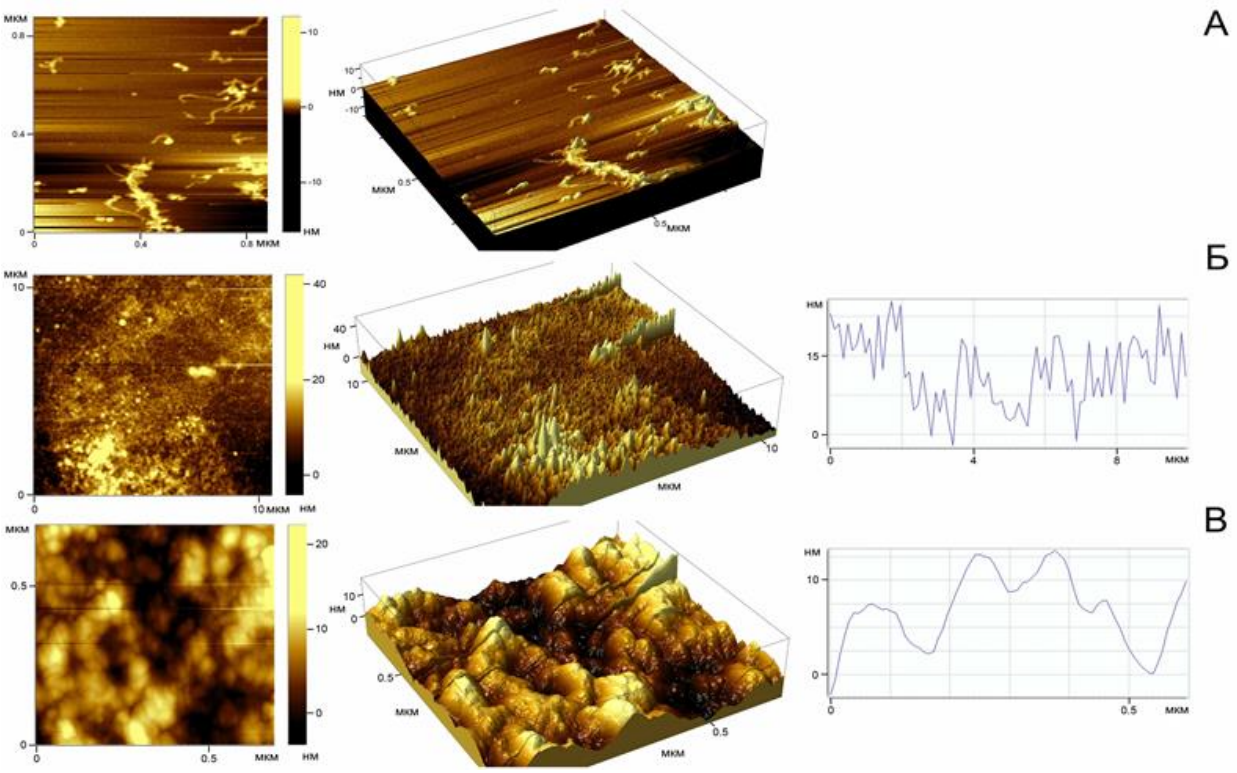


Рис. 47. АСМ изображения неагрегированной формы $ГМТ_{ВМИ}$ и его агрегаты, нанесённые на поверхность покровного стекла. А – 2D и 3D изображения $ГМТ_{ВМИ}$ в растворе, содержащем 0.6 М KCl, 30 мМ KH_2PO_4, 1 мМ ДТТ, 0.1 М NaN_3, pH 7.0; Б, В – 2D и 3D изображения и графики сечения 10 мкм^2 и 0.78 мкм^2 поверхностей, покрытых амилоидными агрегатами $ГМТ_{ВМИ}$. Среднеквадратическая шероховатость (RMS) составила: 4.9 нм для изображения с масштабом 10 мкм, (Б); 2.7 нм для изображения с масштабом 0.5 мкм (В). Воспроизведено из работы (Bobylev et al., 2021), выполненной при участии автора диссертации.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1. ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ АГРЕГАЦИИ, МОРФОЛОГИИ И СТРУКТУРЫ АГРЕГАТОВ ГМТ И С-БЕЛКА

По нашим результатам из мышечной ткани желудка курицы были выделены 2 изоформы гладкомышечного титина (ГМТ) с молекулярной массой ~500 кДа ($ГМТ_{НМИ}$) и ~1500 кДа ($ГМТ_{ВМИ}$) (Рис. 9). В свою очередь из скелетных мышц кролика был получен «быстрый» паралог С-белка с м.м. ~134 кДа (Рис. 8).

Методом ДРС было обнаружено, что при снижении ионной силы гладкомышечный титин и С-белок образовывали крупные агрегаты в течение относительно коротких интервалов времени: в течение первых 5 минут – при агрегации С-белка (Рис. 12 А), в течение 20 минут – при агрегации $ГМТ_{ВМИ}$ (Рис. 11 Б), в течение 3 часов – при агрегации $ГМТ_{НМИ}$ (Рис 10 Б). Скорость агрегации исследуемых мышечных белков была намного выше, чем у большинства известных амилоидных белков. Например, зрелые фибриллы Гелсолина (AGel) образуются через 48 часов (Arya et al., 2014), транстиретина (TTRwt) – от 3 суток до недели и более (Ferreira et al., 2021), Aβ-пептида (1-40) – через 24-48 часов (Kalita et al., 2022). И, что особенно важно, в динамике агрегации гладкомышечного титина и С-белка отсутствует так называемый «лаг-период». Одной из возможных причин отсутствия «лаг-периода» является присутствие в белковых препаратах титина и С-белка олигомеров (Рис. 10 Б, Рис. 11 Б, Рис. 29), которые, как известно, могут служить затравкой для быстрой инициации процесса агрегации (Kumar, Walter, 2011). В таком случае процесс агрегации сразу начинается с фазы элонгации/фазы роста, минуя фазу так называемого «лаг-периода»/задержки, что было показано, например, при агрегации Aβ-пептида (Kumar, Walter, 2011). В наших экспериментах отсутствие «лаг-периода» при агрегации титина и С-белка подтверждается как данными ДРС (см. п. 5.2), так и данными, полученными методами АСМ, ПЭМ (см. описание в Главе 7).

Таким образом, первой особенностью исследуемых нами мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов является их высокая скорость агрегации.

Следующей особенностью агрегации исследуемых нами мышечных белков является способность их амилоидных агрегатов дезагрегировать при увеличении ионной силы раствора. В частности, способность к обратимой агрегации была обнаружена у агрегатов $ГМТ_{ВМИ}$, сформированных в растворе, содержащем 0.15 М глицин–КОН при pH 7.0 (Рис. 11 В), а также у агрегатов $ГМТ_{НМИ}$, сформированных в растворе, содержащем 200 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0 (Рис. 34 А). Из литературных данных известно, что образование патологических амилоидных структур не является обратимым процессом (Mukherjee et al., 2015; Stefani, Dobson, 2003). Однако обратимая агрегация была показана для некоторых функциональных амилоидных агрегатов, например, для агрегатов амилоидных телец (А-телец), которые образуются в ответ на стресс окружающей среды в клетках человека (Lacroix et al., 2021), а также для других функциональных амилоидных агрегатов (Woodruff et al., 2018; Cereghetti et al., 2018). Принято считать, что для функциональных амилоидных агрегатов в процессе эволюции сформированы механизмы, регулирующие процессы сборки и разборки амилоидов. Однако эти механизмы остаются неизвестными.

Опираясь на полученные данные, и, в том числе, данные олигомеризации ГМТ можно предположить, что высокая скорость агрегации титина и С-белка, а также обратимость их амилоидной агрегации могут указывать на функциональную роль возможной агрегации этих белков *in vivo*.

Одним из возможных объяснений высокой скорости и обратимости агрегации исследуемых нами мультидоменных мышечных белков является то, что не вся молекула титина или С-белка, а только отдельные части их молекул участвуют в формировании амилоидных связей. То есть, межмолекулярная связь возникает только между отдельными участками молекул исследуемых белков в то время, как бóльшая часть молекулы титина или С-белка сохраняет свою нативную структуру и в формировании межмолекулярных связей не участвует. Этому есть косвенные и прямые доказательства. Среди них: нативные нити (участки молекул) титина между агрегатами этого белка на электронно-микроскопических снимках (Рис. 15 В), а также отсутствие изменений во вторичной структуре при формировании аморфных амилоидных агрегатов. Мы считаем, что межмолекулярная связь может возникать между отдельными частично-раскрытыми домена исследуемых мультидоменных

мышечных белков. Более детально образование амилоидной межмолекулярной связи в агрегатах титина и С-белка можно рассмотреть, обратившись к олигомерам данных белков.

Итак, оба белка формируют олигомеры *in vitro*. Олигомеры гладкомышечного титина наблюдались нами на начальной стадии агрегации и, скорее всего, участвовали в формировании более крупных его агрегатов, а также ускоряли скорость агрегации. Полученные данные указывают на то, что крупные агрегаты титина состоят из олигомеров. Подробнее об этом описано в главе 7. Особо стоит отметить, что амилоидная структура обнаружена у агрегатов $ГМТ_{ВМИ}$, сформированных в течение 1 часа (Рис. 20 В, Рис. 21 Б).

Можно сделать предположение, что при агрегации титина и С-белка межмолекулярные связи с последующим образованием кросс-β структуры могут возникнуть между отдельными молекулами этих белков уже внутри олигомера (Рис. 48, показано на примере титина, см. ниже). В поддержку того, что подобный механизм амилоидной агрегации исследованных нами мышечных белков имеет место быть, можно привести данные о частичном анфолдинге доменов титина, не требующем затрат энергии (Rivas-Pardo et al., 2016; Eckels et al., 2019). В поддержку сделанного предположения также можно привести наши данные, полученные методом СМУРР, для двух морфологически различающихся типов агрегатов $ГМТ_{НМИ}$ (Рис. 38). Наши данные, свидетельствующие об отсутствии различий в структуре частиц, входящих в состав агрегатов титина, сформированных в разных условиях, свидетельствуют о том, что в основе обоих типов агрегатов этого белка лежат структуры с одинаковой укладкой полипептидных цепей. На основании имеющихся данных можно сделать предположение, что в основе формирования обоих типов агрегатов титина лежат стабильные надмолекулярные структуры с определенной укладкой, но которые имеют четвертичную кросс-β-структуру. Подобные надмолекулярные структуры, по всей вероятности, лежат в основе агрегации и С-белка. Об этом свидетельствуют данные АСМ, на которых можно наблюдать, что более крупные структуры состоят из отдельных частиц, предположительно олигомеров (Рис. 29 А). Однако доказательства образования межмолекулярной «амилоидной» связи как в литературе, так и по нашим данным, получены именно для титина. Это связано в первую очередь с большими размерами

данного белка, что позволило нам визуально оценить взаимодействие молекул белка в процессе агрегации. Также, большие размеры белка практически исключают его полный или значительный анфолдинг, вследствие чего частичная агрегация белка становится единственно верным исходом, объясняющим наличие амилоидной структуры при отсутствии изменений во вторичной структуре. Полученные нами результаты по агрегации ГМТ позволяют предположить, что при снижении ионной силы на начальной стадии агрегации происходит образование межмолекулярной связи по типу амилоидной между частично открытыми доменами белка рядом расположенных молекул в олигомере, как это показано на рисунке 48 (Б).

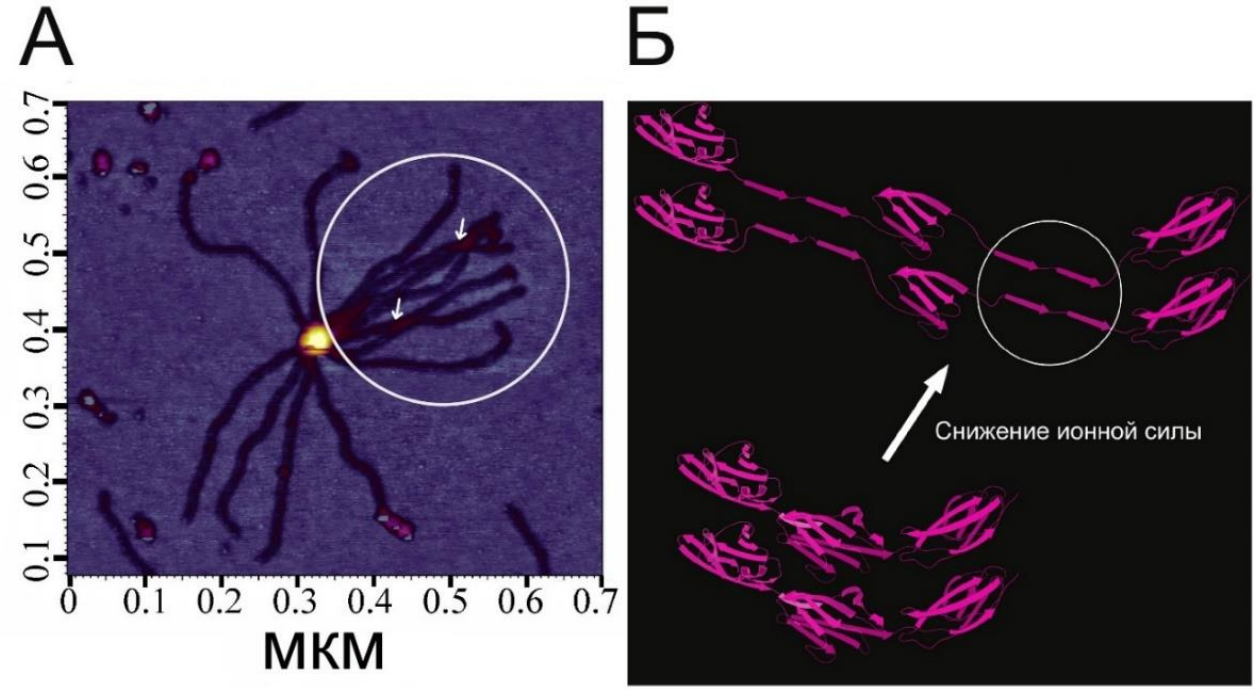


Рис. 48. А – АСМ олигомера $ГМТ_{ВМИ}$. Внутри белого круга показаны отдельно лежащие молекулы титина, которые расположены близко друг к другу. Белыми стрелками отмечены участки молекул белка, которые наиболее близко прилегают друг к другу. Важно отметить, олигомеры находятся в растворе с высокой ионной силой (0.6 М KCl). Б – Схематичное представление формирования межмолекулярных связей между частично развернутыми доменами двух расположенных рядом молекул белка. На схеме частичный анфолдинг представлен для среднего домена. Внутри белого круга схематично показана вероятная структура, напоминающая кросс-β, которая возможна для агрегатов ГМТ. Схема представлена на примере трех доменов титина (двух иммуноглобулин-подобных и одного фибронектин III-подобного), расположенных в А-диске саркомера. Источник: https://www.uniprot.org/uniprot/Q8WZ42. Воспроизведено из работы (Bobyleva et al., 2023(b)), выполненной при участии автора диссертации.

Высказанное нами предположение подтверждается литературными данными об образовании *in vitro* амилоидоподобных структур между двумя отдельными доменами титина (Borgia et al., 2015). Согласно полученным нами и имеющимся в литературе данным (Lu et al., 1998) на примере титина показан частичный анфолдинг доменов, с последующим формированием амилоидной структуры в агрегатах этого белка.

Подводя итог вышеизложенному, учитывая полученные нами данные и данные имеющиеся в литературе, можно сделать предположение, что формирование амилоидных структур вероятно происходит на этапе олигомеризации титина и С-белка. Учитывая близкое расположение молекул титина в I-зоне саркомера поперечно-полосатых мышц, а также взаимодействие титина с С-белком в А-зоне, нельзя исключить формирование амилоидо-подобных структур в мышце *in vivo*.

Стоит обсудить другую особенность амилоидной агрегации гладкомышечного титина и С-белка – это формирование этими белками аморфных, а не фибриллярных амилоидных агрегатов. Предложенный выше механизм «частичной амилоидной агрегации» титина и скелетномышечного С-белка, когда межмолекулярные связи возникают только между отдельными участками молекул этих белков, вполне объясняет невозможность формирования высокоупорядоченных амилоидных фибрилл. До сих пор многие исследователи считают, что амилоидными могут быть только высокоупорядоченные фибриллы, а не аморфные агрегаты, которые являются продуктом неправильного сворачивания белка «вне пути» (Adamcik, Mezzenga, 2018). Однако в литературе есть данные о том, что некоторые белки, так же как титин и С-белок, тоже формируют амилоидные аморфные агрегаты. И можно обнаружить морфологическое сходство между аморфными агрегатами гладкомышечного титина и С-белка и агрегатами других белков. В научной литературе известно о как минимум семи белках (куриный лизоцим, бычий инсулин, человеческий транстиретин, человеческий α-синуклеин, бычий сывороточный альбумин, миоглобин сердца лошади, а также β-лактоглобулин) (Donato et al., 2011; Khan et al., 2022; Pal et al., 2020), образующих сферические аморфные агрегаты с подтвержденной амилоидной природой (Surroca et al., 2002); агрегаты, подобные тем, что формируют исследованные нами мышечные белки. Т.о., полученные нами

результаты и литературные данные свидетельствуют о том, что образование морфологически сходных белковых аморфных агрегатов вполне возможно, и что эта сборка не зависит от аминокислотной последовательности белков (de Jongh et al., 2001; Krebs et al., 2005).

В работах, посвященных исследованию агрегации β-лактоглобулина, авторы приходят к выводу о существовании стабильных β-структур различной регулярности, лежащих в основе формирования агрегатов различной морфологии этого белка. В зависимости от условий агрегации меняется их морфология – от высокоупорядоченных амилоидных фибрилл с высоким суммарным зарядом до коротких амилоидных фибрилл и аморфных агрегатов (сферических частиц с низким общим зарядом) (Krebs et al., 2009(b)). Высокоупорядоченные амилоидные фибриллы β-лактоглобулина формируются при значениях pH отличных от изоэлектрической точки (Blake, Serpell, 1996; Nelson et al., 2005), тогда как при значениях pH близких к изоэлектрической точке этого белка, он образует сферические агрегаты (Langton, Hermansson, 1992; Bromley et al., 2006). Предполагается, что при формировании сферических агрегатов β-лактоглобулина происходит частичное разворачивание молекулы белка (Bauer et al., 2000; Ikeda, Nishinari, 2001; Alting et al., 2002; Roefs et al., 1994; Visschers, de Jongh, 2005). Аналогичное предположение высказываем и мы, проведя комплексное исследование процесса агрегации титина и С-белка.

Обсуждая морфологическое сходство и особенности агрегации исследуемых нами белков, а также других белков, необходимо обратить внимание на следующее. В наших исследованиях мы показали, что агрегаты $ГМТ_{НМИ}$, сформированные в течение 24 часов, по данным АСМ представляли собой разветвленные цепи, состоящие из сферических частиц диаметром ~300-500 нм и высотой до 35-40 нм, и расположенных по всему полю зрения (Рис. 14 Б). Из литературных данных известно, что подобные ветвящиеся структуры обнаружены у белка Pmel17, который формирует функциональные амилоиды (Dogra et al., 2017). Авторы, изучая полиморфизм домена (RPT) белка Pmel17, обнаружили, что для данного домена возможно два различных пути агрегации. В диапазоне pH 4.5-6.0 агрегация этого белка протекает по типичному механизму, зависящему от зародышеобразования, что приводит к образованию высокоупорядоченных богатых β-складчатостью

нитевидных фибрилл. Наоборот, при pH <4.5 агрегация происходит посредством быстрого процесса полимеризации, независимого от зародышеобразования, который дает дендритные (ветвящиеся) аморфные агрегаты. Наблюдается поразительное морфологическое сходство между этими агрегатами, сформированными из фрагмента функционального амилоидного белка Pmel17, и агрегатами, сформированными $ГМТ_{НМИ}$ (Рис. 14 Б). Эти данные позволяют говорить о схожих механизмах агрегации этих двух белков, из которых Pmel17 формирует функциональные амилоиды.

Итак, по нашим данным гладкомышечный титин и скелетномышечный С-белок формируют только аморфные амилоидные агрегаты. Следует отметить, что подобное свойство характерно и для отдельных доменов этих белков. Исследования, проведенные для Ig-подобного I27 домена титина, показали, что данный домен формирует *in vitro* амилоидные аморфные агрегаты (Borgia et al., 2013). Причем, как утверждают авторы работы, агрегаты данного домена титина остаются аморфными в течение длительного времени и не проявляют никаких признаков перестройки в зрелые фибриллы даже через четыре месяца инкубации (Borgia et al., 2013). Причина того, почему происходит образование аморфных агрегатов, а не линейных фибрилл в процессе агрегации исследованных белков частично обяснено наличием ядер вторичной нуклеации (Bobylev et al., 2016).

Для анализа размера ядер нуклеации амилоидных агрегатов, образованных гладкомышечным титином и С-белком, был использован теоретический подход, описанный в работе (Dovidchenko et al., 2014). Расчеты проводились с использованием данных агрегационной кинетики для 27-го Ig-подобного домена титина (I27) (Wright et al., 2005) и кинетических данных сборки актиновых филаментов (Sept, McCammon, 2001). Актин был выбран в качестве контроля, поскольку он формирует агрегаты в виде фибрилл, не имеющие амилоидной природы. Для I27 домена титина было показано наличие ядер вторичной нуклеации. Размер ядра первичной нуклеации для этого домена составил 2.4 ± 0.5 (Рис. 49) и он был больше, чем размер ядра вторичной нуклеации (1.5±0.4, Рис 49). Эти данные означают, что агрегация как отдельного домена, так и, возможно, всего белка титина может идти не по линейному механизму, как это происходит в случае сборки неамилоидных фибрилл актина (Sept, McCammon, 2001), а по другому механизму,

где имеется сценарий ветвления с образованием ядер вторичной нуклеации на поверхности фибрилл.

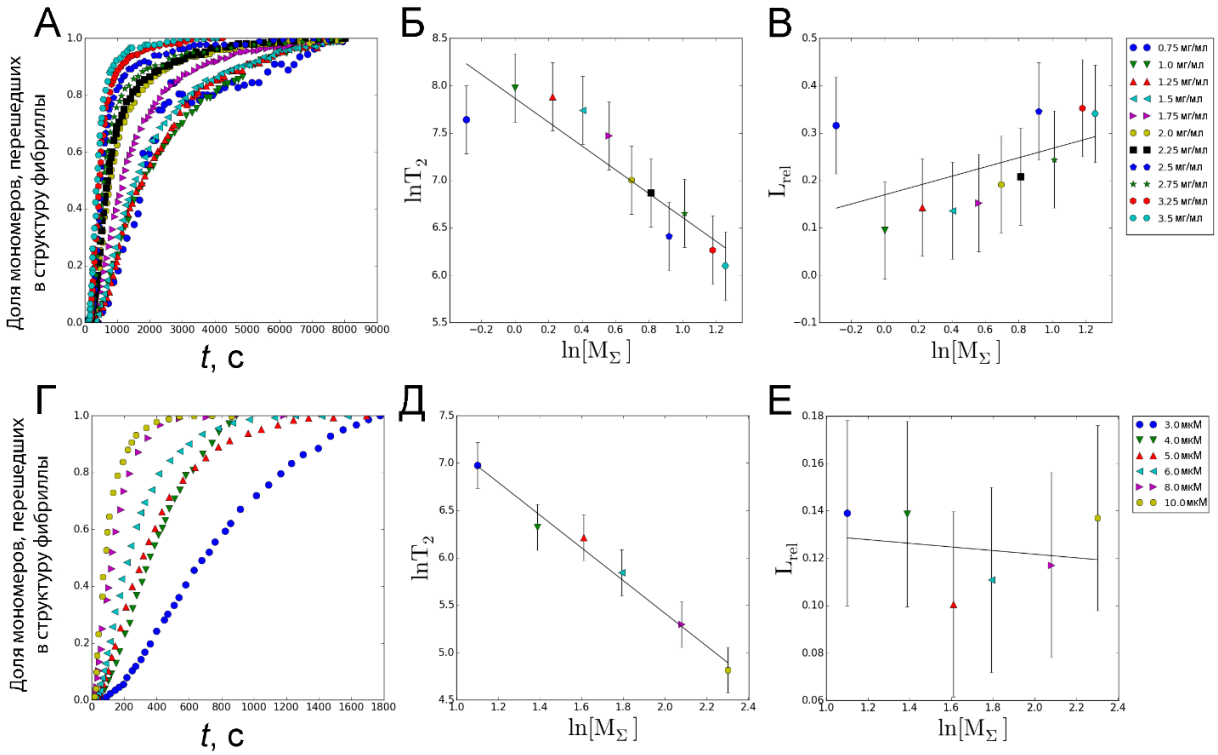


Рис. 49. Расчеты размеров ядер нуклеации агрегатов 27-го Ig-подобного домена титина (А, Б, В) и актиновых фибрилл (Г, Д, Е). А – Нормированная зависимость интенсивности флуоресценции ТТ от времени для 27-го Ig-подобного домена титина (Wright et al., 2005); Б – Зависимость log T_2 от log [M_Σ] для 27-го Ig-подобного домена титина, использованная для расчета размера ядра вторичной нуклеации. Коэффициент угла наклона аппроксимирующей линии ≈ –1.26, что, согласно формулам из работы (Dovidchenko et al., 2014), означает, что размер ядра вторичной нуклеации $n2$ = 1.5±0.4; В – Зависимость L_{rel} от log [M_Σ] для 27-го Ig-подобного домена титина. Коэффициент угла наклона аппроксимирующей линии –0.1, что означает наличие зависимости L_{rel} от log [M_Σ]. Часть значений L_{rel} больше 0.2, согласно (Dovidchenko et al., 2014), такое поведение зависимостей не может быть объяснено в рамках модели линейного роста. Размер ядра первичной нуклеации может быть вычислен через размер ядра вторичной нуклеации и коэффициент угла наклона прямой и равен 2.4±0.5; Г – Нормированная зависимость интенсивности флуоресценции ТТ от времени для актина (Sept, McCammon, 2001); Д –Зависимость log T_2 от log [M_Σ]; Е – Зависимость L_{rel} от log [M_Σ]. Коэффициент угла наклона аппроксимирующей линии – 0.01, то есть L_{rel} не зависит log [M_Σ]. Так же все значения L_{rel} меньше 0.2, что, согласно моделям образования фибриллярных агрегатов, означает, что образование актиновых фибрилл идет путем линейного роста, согласно (Dovidchenko et al., 2014). Размер

ядра первичной нуклеации может быть вычислен на основе величины коэффициента угла наклона аппроксимирующей линии и равен n =3.4±0.5. Воспроизведено из работы (Bobylev et al., 2016), выполненной при участии автора диссертации.

Таким образом, проведенные расчеты для I27 домена титина объясняют образование аморфных агрегатов на уровне кинетики образования агрегатов.

Отдельные моменты, учитывающие особенности структуры амилоидных агрегатов гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка, следует обсудить, обратившись к данным рентгеновской дифракции (Табл. 7). Как уже было описано ранее, амилоидная четвертичная кросс-β структура характеризуется на рентгенограммах двумя расстояниями (рефлексами): расстоянием ~4.7 Å, и 10-11 Å (Рис 50 А).

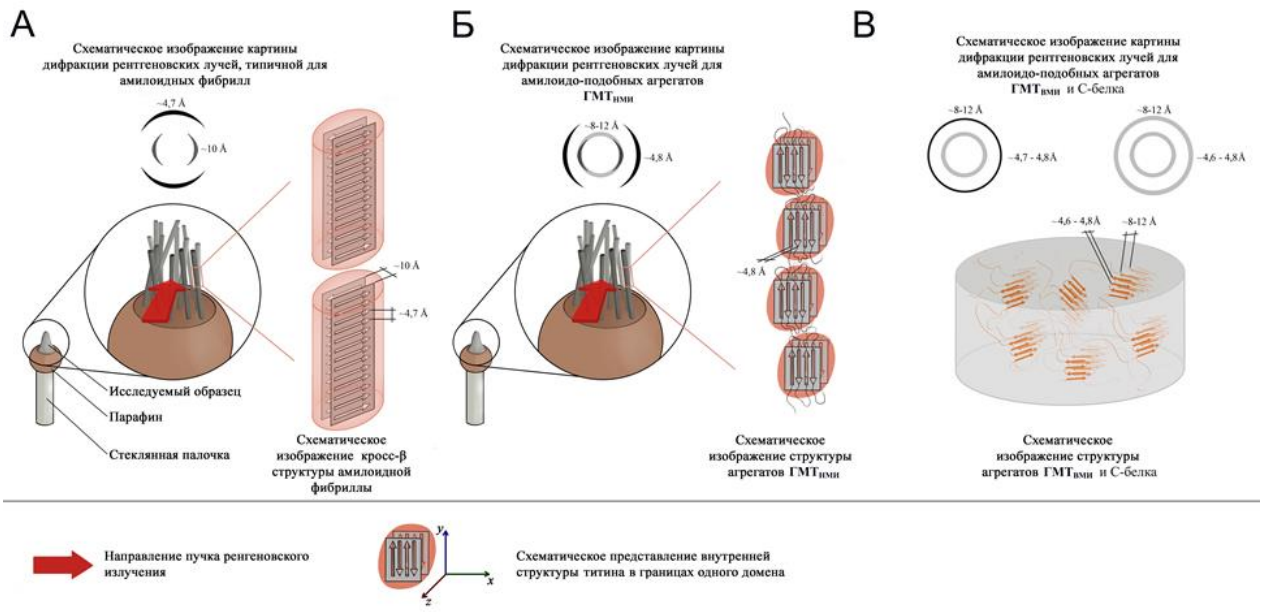


Рис. 50. Исследование амилоидной кросс-β структуры методом рассеяния рентгеновских лучей на частично ориентированных препаратах известных амилоидных белков (А) и амилоидных агрегатов ГМТНМИ (Б), а также ГМТВМИ и С-белка (В). Для амилоидных фибрилл известных белков рефлексы, расположенные по вертикали (меридиональное направление), соответствуют периоду 4.7-4.8 Å (А). Этот период указывает на то, что β-участки расположены перпендикулярно оси фибриллы, и расстояние между ними 4.7-4.8 Å (А). Рефлексы, расположенные по горизонтали дифракционной картины (экваториальное направление), соответствуют периоду 10-11 Å (А). Данные рефлексы указывают на расстояние между β-листами, которое равно 10-11 Å. Для амилоидных агрегатов ГМТНМИ характерна дифракционная картина с экваториальным расположением рефлекса 4.8 Å (Б),

вследствие чего мы делаем предположение о параллельной ориентации β-участков относительно оси фибриллы (в нашем случае к фибриллам мы относим отдельные молекулы титина). Рефлекс ~8-12 Å, характеризующий расстояние между β-листами, является диффузным и кольцевым (Б). Мы предполагаем, что Ig- и FnIII-подобные домены, состоящие из двух антипараллельных β-листов, находятся под разными углами к рентгеновскому пучку, что и отображается диффузным рефлексом на дифракционной картине. Для амилоидных агрегатов ГМТВМИ и С-белка характерна дифракционная картина с кольцевым рефлексом 4.8 Å (более размытым для С-белка 4.6 Å) (В). Здесь мы также предполагаем, что β-участки ориентированы под разными углами относительно оси фибриллы. Воспроизведено из работ (Bobylev et al., 2020; Bobylev et al., 2023), выполненных при участии автора диссертации.

На рентгенограммах препаратов частично выровненных амилоидных фибрилл дифракция рентгеновских лучей дает характерную дифракционную картину, представляющую собой расположенные на взаимно перпендикулярных осях два дифракционных рефлекса (соответственно 4.6-4.8 Å и 8-12 Å) (Рис 50 А). Что характерно, в образцах амилоидных сферических частиц β-лактоглобулина (Krebs et al., 2009(b)) и образцах амилоидных агрегатов исследуемых нами мышечных белков эти два рефлекса выглядят как изотропные кольца (Рис 50 В). Авторы, исследовавшие амилоидную природу β-лактоглобулина, заключили, что, учитывая сферическую природу частиц, невозможно добиться выравнивания образца и получить рефлексы ориентированные перпендикулярно друг другу (Krebs et al., 2009(b)). Мы пришли к такому же выводу, исследуя методом дифракции рентгеновских лучей агрегаты гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка. Полученные данные указывают на то, что амилоидные аморфные агрегаты β-лактоглобулина имеют схожую структуру с амилоидными агрегатами исследуемых нами мышечных белков.

Продолжая обсуждать особенности структуры амилоидных агрегатов исследованных нами мышечных белков, нельзя не отметить результаты рентгеновской дифракции, полученные для амилоидных агрегатов $ГМТ_{НМИ}$, сформированных в двух растворах (0.15 М глицин-KOH и 0.2 М KCl) (Рис. 35). Дифракционный рефлекс у обоих образцов (4.8 Å) располагался не по вертикали дифракционной картины (меридиональное направление), а по горизонтали

(экваториальное направление) (Рис. 50 Б). Исходя из этого, мы сделали предположение, что β-участки в агрегатах $ГМТ_{НМИ}$ располагаются не перпендикулярно оси фибриллы, как это описано для других амилоидных белков (Рис. 50 А), а – параллельно (Рис. 50 Б). Второй рефлекс (~8-12 Å), характеризующий расстояние между β-листами, был диффузным и кольцевым (Рис. 50 Б, В). Мы предполагаем, что расстояние между β-листами может варьировать, а сами β-листы не являются строго ориентированными по одной из осей (Рис. 50 Б, В). Следует отметить, что подобное явление, когда один из рефлексов, описанных для кросс-β структуры, является кольцевым, а второй не является таковым, в литературе не встречалось, что свидетельствует еще об одной особенности амилоидной агрегации исследуемых мультидоменных мышечных белков.

В порядке обсуждения этих результатов, следует отметить следующее. Известно, что Ig- и FnIII-подобные домены титина и С-белка представляют собой β-сэндвич-домены, характеризующиеся двумя противоположными антипараллельными β-листами (Erickson, 1994; Clarke et al. 1999). В случае полного или частичного раскрытия домена, как это проиллюстрировано на рисунке 48 Б, на уровне отдельных молекул белка или олигомеров (Рис. 48 А), может происходить образование межмолекулярных связей в белке и формирование амилоидо-подобной структуры (см. п. 4.1.). Далее олигомеры могут объединяться в более крупные структуры. Таким образом, можно предположить, что в препаратах исследуемых нами мышечных белков такие амилоидогенные участки находятся под разными углами к рентгеновскому пучку, что приводит к появлению диффузного рефлекса на дифракционной картине. Схематично представленные на рисунке 50 (В) структуры показывают лишь ориентацию листов и полипептидных цепей в них согласно полученной дифракционной картине. Реальная структура внутри агрегатов титина или С-белка может быть иной. Одна из возможных структур для титина при его агрегации описана в работе (Borgia et al., 2015). При исследовании *in vitro* неправильного сворачивания двух иммуноглобулин-подобных (Ig27 и Ig28) доменов титина методом молекулярной динамики вышеуказанными авторами были описаны группы конформаций, получившие название «внутримолекулярный амилоид». Исходя из полученных нами данных, можно сделать вывод, что агрегированные гладкомышечный титин и скелетномышечный С-белок имеют четвертичную кросс-

β структуру. А если учитывать данные кругового дихроизма об отсутствии изменений во вторичной структуре мышечных белков при их агрегации (Табл. 4, Рис. 22), можно предположить, что в их агрегатах присутствуют лишь участки кросс-β структуры. Авторы работы (Oboroceanu et al., 2010) при исследовании сферических частиц *β*-лактоглобулина также пришли к выводу о присутствии лишь участков с кросс-β структурой в молекуле белка По их мнению, взятые вместе данные показывают, что сферические частицы состоят, по крайней мере частично, из амилоидо-подобных *β*-слоев, которые достаточно короткие, плотно упакованные, что приводит к образованию наблюдаемых сферических частиц. Следовательно, *β*-лактоглобулин имеет высокую склонность к сборке именно в агрегаты с кросс *β*-подобной структурой. Предполагается, что эта структурная особенность позволяет белку формировать разные типы агрегатов, в том числе и такие, которые не имеют фибриллярной морфологии (Oboroceanu et al., 2010).

В продолжении дискуссии о возможной структуре амилоидных агрегатов гладкомышечного титина и С-белка можно отметить работу (Cui et al., 2019). Интересна она тем, что авторы, работая с уже известными белками, формирующими функциональные амилоиды (название белков см. ниже), получили нефибриллярные амилоидные агрегаты, у которых были обнаружены кольцевые рефлексы при исследовании методом рентгеновской дифракции. Целью работы авторов (Cui et al., 2019) было создание новых биоматериалов на основе структурных характеристик амилоидных агрегатов исследуемых ими белков. Конструкции, которые использовали авторы, представляли собой связанные друг с другом белки биопленки *E. coli* CsgA (в качестве амилоидогенных ядер), а также один или два фланкирующих домена, состоящих из хитинсвязывающих доменов (CBD) белка *Bacillus circulans* и белка ножек мидий *Mytilus galloprovincialis* (Mfp3 и Mfp5), которые представляют собой адгезивные белки. В работе (Cui et al., 2019) демонстрируется схожий механизм агрегации исследуемых этими авторами белков с механизмом агрегации исследованных нами мышечных белков. В частности, вышеуказанные авторы наблюдали формирование нефибриллярных структур разной морфологии (сферических агрегатов и коротких протофибрилл), а методом дифракции рентгеновских лучей были обнаружены кольцевые «амилоидные» рефлексы 9.51 Å и 4.69 Å при исследовании образцов вышеуказанных белков (Cui et al., 2019).

Описанные амилоидные структуры представляли собой амилоидное ядро с окружающими его элементами неупорядоченной структуры. Процесс фибриллизации (роста амилоидных агрегатов) был представлен как взаимодействие отдельных белков, уже имеющих элементы кросс-β структуры. Описанный механизм амилоидной агрегации подобен таковому, что обнаружили мы при исследовании агрегации мультидоменных мышечных белков. Примечательно было и то, что вторичная структура исследуемых Cui с соавторами (2019) белковых конструкций при формировании амилоидных агрегатов не изменялась, как и при агрегации исследуемых нами мышечных белков.

Таким образом, вышепроцитированные данные авторов, результаты исследования агрегации β-лактоглобулина (Oboroceanu et al., 2010), искусственно созданного амилоидного белка (Cui et al., 2019), а также наши результаты исследования амилоидной агрегации мышечных белков свидетельствуют о существовании амилоидных аморфных агрегатов с наличием участков, имеющих кросс-β структуру.

Обсуждая возможную функциональную или патологическую роль агрегации титина и С-белка в мышечных клетках, следует заметить, что в литературе очень мало данных о структуре и свойствах функциональных амилоидных агрегатов. Однако следует упомянуть одну очень важную работу, в которой указаны отличительные признаки патологических и функциональных амилоидных агрегатов на уровне их структуры (Ulamec, Radford, 2020). Авторы данной работы сравнили структуры амилоидных фибрилл Аβ-пептида и Orb2, полученные другими авторами (Hervas et al., 2020) методом крио-ЭМ. Фибриллы Аβ-пептида, как известно, участвуют в развитии патологии в мозге при БА, т.е., являются патологическими амилоидными агрегатами. Фибриллы Orb2, которые также локализуются в мозге, напротив, являются функциональными амилоидами, участвующими в формировании долговременной памяти у *Drosophila melanogaster.* Несмотря на обнаруженное морфологическое сходство фибрилл Аβ-пептида и Orb2, на структурном уровне Ulamec и Radford (2020) выявили значительные различия. Обе структуры фибрилл Аβ-пептида и Orb2 содержали ~30 остатков в структурированном ядре фибриллы. Для Аβ (1-40) только первые ~4-10 аминокислотных остатков оставались неструктурированными, тогда как их большая

часть участвовала в формировании амилоидного ядра, в то время как у Orb2B (самой длинной изоформы Orb2) количество аминокислотных остатков, остающихся неупорядоченными, составляло 650 (Ulamec, Radford, 2020). Т.е., только незначительная часть аминокислотных остатков этого белка участвовало в формировании амилоидного ядра.

Таким образом, на основании полученных данных авторы (Ulamec, Radford, 2020) выявили структурные различия между функциональными и патологическими амилоидами. Сравнивая результаты выше процитированных авторов с результатами, полученными нами, обращает на себя внимание тот факт, что как у функциональных амилоидных агрегатов Orb2, так и у амилоидных агрегатов титина и С-белка лишь незначительная часть аминокислотных остатков полипептидной цепи участвует в образовании амилоидных связей. Таким образом, учитывая выявленные нами структурные особенности амилоидных агрегатов титина и С-белка, можно говорить о функциональной, а не патологической амилоидной природе этих агрегатов.

Учитывая полученные данные об особенностях агрегации гладкомышечного титина и С-белка, можно описать путь агрегации, представленный в виде следующей схемы энергетического ландшафта (Рис. 51). Но прежде немного теории. Из литературных данных известно, что амилоидные фибриллы образуются зависимым от нуклеации способом, при котором мономерная форма белка переходит в фибриллярную форму через формирование временной структуры – ядра нуклеации (Rochet, Lansbury, 2000). Также известно, что в случае глобулярных белков, фибриллы обычно образуются в условиях, в которых нативное состояние дестабилизировано (например, добавлением денатуранта, низким pH, высокой температурой или заменами аминокислот) (Linke R.P., 2006). Все эти условия, необходимые для перехода в агрегированную форму, указаны на энергетическом ландшафте (Рис. 3) как барьер, для перехода которого нужна энергия. Здесь стоит отметить, что большинство исследований путей агрегации проводились в основном для белков с небольшой молекулярной массой. В случае с мультидоменными белками, способными формировать амилоидные или амилоидо-подобные агрегаты, исследований нет, кроме работ, где исследовалась агрегация отдельных доменов титина (Borgia et al., 2013; Borgia et al., 2015).

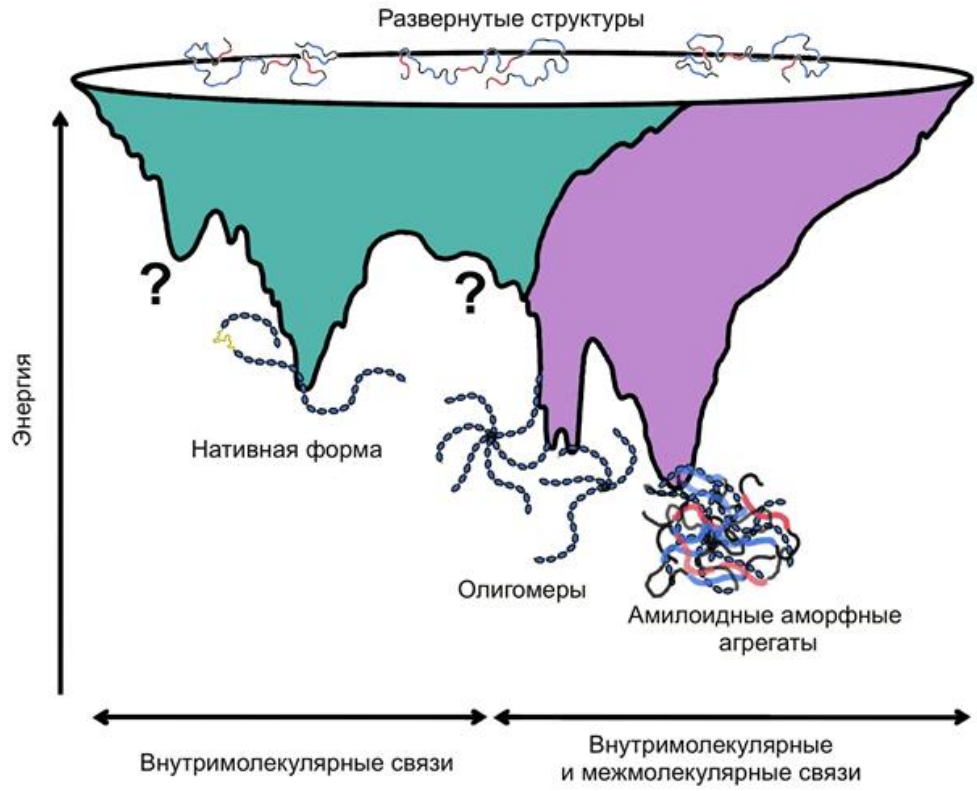


Рис. 51. Схематический энергетический ландшафт сворачивания и агрегации гладкомышечного титина. Поскольку мы не имеем достаточной информации о наличии частично свернутых и частично развернутых состояний белка, то на схеме данные состояния отмечены знаком вопроса. Также на схеме отсутствует предполагаемый для большинства белков высокий энергетический барьер, необходимый для перехода от мономеров белка к олигомерам и агрегатам. Отсутствуют также ядра нуклеации. Воспроизведено из работы (Bobyleva et al., 2023(a)), выполненной при участии автора диссертации.

На рисунке 51 представлены три основные формы титина – это нативный белок, его олигомеры и аморфные амилоидные агрегаты. Причем между этими формами практически отсутствуют энергетические барьеры и не имеется промежуточных форм. Это связано с тем, что олигомеры уже присутствуют в образцах вместе с отдельными молекулами белка и способствуют увеличению скорости агрегации. На рисунке энергетического ландшафта амилоидные аморфные агрегаты титина являются наиболее стабильным термодинамическим состоянием,

однако не настолько стабильными как, например, «классические» амилоидные фибриллы.

Предположение о минимальных различиях в стабильности указанных на энергетическом ландшафте структур титина было сделано на основе полученных нами температур плавления молекулярной формы белка (где присутствуют и олигомеры), а также его агрегатов. Мы показали, что стабильность неагрегированной формы $ГМТ_{ВМИ}$, у которой температура плавления (Tm) составила 317.7К, была незначительно ниже, чем стабильность агрегатов титина, у которых Tm составила 321.7К (Рис. 28). То есть, различие в максимальной температуре пика теплопоглощения между агрегированной и неагрегированной формами титина составляло всего 4К. Подобное различие относительно мало в сравнении с различиями температур плавнения неагрегированных и агрегированных форм у многих других амилоидных белков (75-100 С или 348.15 K-373.15K) (Rezaei et al., 2002; Baxa et al., 2004; Morel et al., 2006; Morel et al., 2010). В наших экспериментах также практически не наблюдалось различий между значениями калориметрической энтальпии перехода при агрегации титина (Рис. 28).

Поскольку не имеется информации о количественном содержании частично свернутых и частично развернутых состояний у титина, на схеме энергетического ландшафта данные состояния отмечены знаком вопроса. Одной из особенностей энергетического ландшафта агрегации титина, отмеченной на схеме, является то, что отсутствует предполагаемый для большинства белков высокий энергетический барьер, необходимый для перехода от мономеров белка к олигомерам и агрегатам. Это связано с тем, что для агрегации титина необходимо лишь незначительно понизить ионную силу, что, наряду с присутствием олигомеров, ускоряет олигомеризацию и дальнейшую агрегацию этого белка.

Другой особенностью энергетического ландшафта агрегации титина, которую мы постарались учесть и отобразить на схеме (Рис. 51), является наличие как внутримолекулярных, так и межмолекулярных связей при сворачивании «вне пути». На это указывают как данные электронной микроскопии, визуализирующие нити молекул титина между аморфными агрегатами этого белка (Рис. 15 В), так и отсутствие изменений во вторичной структуре титина в процессе агрегации (Рис. 22 и Рис. 23). Способность агрегатов титина дезагрегировать при повышении ионной

силы раствора (Рис. 34 и Рис. 11 В) также указывает на присутствие как внутримолекулярных, так и межмолекулярных связей в агрегатах этого белка. Таким образом, предложенный энергетический ландшафт агрегации гладкомышечного титина отображает уникальные особенности агрегации этого белка и расширяет наше представление о процессе амилоидной агрегации в целом.

Несмотря на то, что данных по термодинамической стабильности амилоидных агрегатов С-белка нам получить не удалось, мы склонны считать, что энергетический ландшафт этого белка будет подобен таковому для титина. На это указывает ряд таких схожих характеристик, как высокая скорость агрегации этих мультидоменных мышечных белков, наличие олигомеров на начальной стадии агрегации и формирование аморфных агрегатов.

Итак, подводя итог вышеописанным данным, можно заключить, что для гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка характерен особый путь агрегации, заключающийся в способности формировать только аморфные амилоидные агрегаты. При этом наблюдаются следующие особенности агрегации этих белков: (1) высокая скорость образования амилоидных агрегатов при отсутствии фазы нуклеации (зародышеобразования); (2) отсутствие изменений во вторичной структуре при агрегации; (3) обратимость процесса агрегации.

На основании данных, полученных структурными методами анализа, можно сделать предположение, что формирование амилоидной кросс-β структуры, обнаруженной в агрегатах титина и С-белка, может происходить на этапе их олигомеризации, т.е., на самой начальной стадии процесса агрегации, когда в растворе неагрегированных нативных молекул этих белков уже присутствуют их олигомеры. Из таких олигомеров, внутри которых, по всей вероятности, имеются участки с кросс-β структурой, в дальнейшем формируются более крупные агрегаты, на что указывают данные КД, ИК-Фурье спектроскопии и СМУРР. Наиболее близкий по агрегационным свойствам амилоидогенный белок, описанный в литературе, является *β*-лактоглобулин. Однако в отличие от β-лактоглобулина, способного формировать как высокоупорядоченные фибриллы, так и аморфные агрегаты, агрегация гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка проходит только по пути формирования аморфных агрегатов.

Необычная способность исследованных мультидоменных мышечных белков формировать олигомеры даже в условиях высокой ионной силы (более 0.6 для титина), по-видимому, является следствием отобранных в процессе эволюции особенностей аминокислотного состава и структуры, которые, в свою очередь, необходимы для выполнения тех или иных функций в мышечных клетках. Поэтому амилоидную агрегацию этих белков можно отнести скорее к функциональной, чем к патологической.

4.2. ВОЗМОЖНАЯ ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ АГРЕГАТОВ ТИТИНА И С-БЕЛКА В ОРГАНИЗМЕ И МЕХАНИЗМЫ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА ОТ ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ АГРЕГАЦИИ ЭТИХ БЕЛКОВ

4.2.1. Связь механической жесткости со структурными особенностями амилоидных агрегатов

Полученные нами данные о структурных изменениях при агрегации гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка *in vitro* указывают на уникальный механизм формирования этими белками амилоидных агрегатов. Учитывая обратимость амилоидной агрегации мультидоменных мышечных белков и относительно высокую скорость самого процесса агрегации *in vitro*, можно рассмотреть возможность подобной агрегации *in vivo*, а также возможную функциональную роль этого процесса в мышечных клетках. Например, в клетках поперечно-полосатых мышц. Для начала необходимо выяснить, возможно ли разворачивание Ig- и FnIII-подобных доменов титина и С-белка *in vivo* с последующим образованием межмолекулярных связей, способствующих формированию временных амилоидных участков? Известно, что для развертывания доменов титина *in vivo* (на изолированных миофибриллах поперечно-полосатых мышц) требуются незначительные силы (6-8 пН) (Rivas-Pardo et al., 2016; Eckels et al., 2019) и, следовательно, незначительные затраты энергии. Авторы сделали предположение о возможной функциональной роли такого раскрытия доменов титина в процессе развития актин-миозинового взаимодействия в саркомерах. В этой связи следует процитировать других авторов, обнаруживших в *in vitro*

экспериментах, что взаимодействие частично открытых доменов титина может приводить к образованию амилоидоподобных структур (Borgia et al., 2015). Эти авторы на основании данных молекулярной динамики двух доменов титина описали возможность образования ряда нестабильных короткоживущих конформаций, получивших название «внутримолекулярные амилоиды». Выше в п. 12.2. мы описали возможный механизм образования водородных связей между частично раскрытыми доменами близко расположенных молекул гладкомышечного титина внутри одного олигомера (Рис. 48 А, Б). Наши данные показывают возможность образования титином обратимых амилоидных структур без значительных изменений в структуре белка, в частности, без изменений вторичной структуры. Таким образом, внутримолекулярная структура амилоида, описанная (Borgia et al., 2015), нашла экспериментальные подтверждения в наших исследованиях и пригодна для описания процессов, происходящих в структуре титина и С-белка при образовании агрегатов.

Так возможна ли амилоидная или амилоидо-подобная агрегация титина, С-белка или других белков в мышечных клетках? И если да, то может ли это иметь функциональное значение? Рассмотрим на примере поперечно-полосатых мышц, клетки которых содержат миофибриллы, состоящие из высокоупорядоченных сократительных структур – саркомеров. В саркомерах поперечно-полосатых мышц молекулы титина простираются от М-линии до Z-дисков, перекрывая расстояние более 1 микрометра. Предполагается, что на каждую миозиновую нить в половине саркомера приходится по шесть молекул титина (Liversage et al., 2001). В А-зоне саркомера молекулы титина связаны по всей длине с миозиновыми нитями и, по всей вероятности, не взаимодействуют друг с другом в этой зоне, однако взаимодействуют с молекулами С-белка (Tonino et al., 2019). В I-зоне саркомера молекулы титина образуют эластичное соединение между концами толстых нитей и Z-диском, и в этой зоне молекулы титина расположены близко относительно друг друга. Именно в этой зоне молекулы титина претерпевают механические трансформации в процессе сокращения (сжатия) или растяжения саркомеров. В частности, при растяжении саркомера происходит не только выпрямление молекул титина, но и раскрытие (частичный анфолдинг) доменов этого белка. Подобные изменения, опираясь на вышеприведенные литературные данные и полученные

нами результаты, должны сопровождаться формированием структур амилоидного типа в I-диске саркомера. Если и делать предположение о какой-либо функциональной роли такой амилоидной агрегации молекул титина в I-зоне саркомера, то прежде всего нужно рассмотреть основное свойство амилоидных агрегатов – высокую жесткость, обусловленную наличием у них кросс β-структуры. Расположение титина во всех зонах саркомера, эластические свойства и взаимодействие со многими белками, включая и С-белок, создают основу для множества функций, которые присущи данному белку. Наиболее интересным на наш взгляд представляется регуляция вязко-упругих свойств его молекул. Известно, что в I-зоне эластично-растяжимая часть молекулы титина способна развивать пассивное напряжение при растяжении (Erickson, 1997) и возвратную силу при сокращении саркомера (Linke et al., 1994; Granzier, Irving, 1995; Linke et al., 1996; Helmes et al., 1996). Биофизические исследования модуля продольной упругости (модуля Юнга) показали, что эта часть молекулы титина ведет себя как «нелинейная энтропийная пружина», которая распрямляется при воздействии на нее силы от 20 пН до 30 пН и оказывает упругое сопротивление при сжатии с силой 2.5 пН (Kellermayer et al., 1997). Если предположить, что в саркомере между раскрытыми доменами формируется связь и структура по типу амилоидной, то жесткость на этом участке должна увеличиваться и будут изменяться вязко-упругие свойства.

В дополнении к вышесказанному стоит обсудить данные ДСК, свидетельствующие еще об одной особенности амилоидной агрегации титина. Из литературы известно, что амилоидные фибриллы или агрегаты некоторых белков плавятся и диссоциируют при температурах порядка 75–100°C (Azuaga et al., 2002; Rezaei et al., 2002; Baxa et al., 2004; Morel et al., 2006; Morel et al., 2010). Показано, что амилоидные фибриллы более устойчивы к температуре, чем нативный белок (их температуры перехода различаются примерно на 30-40 К) (Morel et al., 2010).

Наши эксперименты показали, что температура плавления агрегированной формы $ГМТ_{ВМИ}$ ненамного выше (всего на 4 К), чем у молекулярной формы титина. При этом энтальпии плавления агрегированной и неагрегированной форм $ГМТ_{ВМИ}$ практически не различались. Эти данные свидетельствуют о том, что общая энергия связей при образовании агрегатов $ГМТ_{ВМИ}$ практически не меняется. Т.о., значительные изменения вязко-упругих свойств молекул титина и мышцы в целом

будут меняться при незначительных энергетических затратах. Литературные данные и полученные нами результаты позволяют высказывать предположение о том, что молекулы титина могут быстро формировать амилоидоподобные более жесткие участки, например, в I-зоне саркомера, а также быстро их разбирать, что выработано в процессе эволюции и, по всей вероятности, является важным для поддержания необходимого уровня мышечного сокращения и его регуляции. Нельзя также исключить, что в А-зоне саркомера в процессе мышечного сокращения (приводящего к развитию механических деформаций А-диска) амилоидоподобные структуры формируются при взаимодействии открытых участков молекул титина и С-белка. Проверка этих предположений – одно из важных и интересных направлений будущих исследований в этой области науки.

Возможна ли функциональная амилоидная агрегация титина в гладких мышцах? Сложно ответить на этот вопрос, учитывая то, что строение гладкомышечной клетки и ее сократительного аппарата до сих пор не известна. Однако исходя из того, что изоформы титина в гладких и поперечно-полосатых мышцах животных состоят из одних и тех же доменов (титин – продукт одного гена), то можно допустить формирование амилоидоподобных структур и в гладких мышцах. Подтверждением чему могут служить обнаруженные нами олигомеры гладкомышечного титина (Рис. 16 и Рис. 30), которые могут представлять часть сократительного аппарата гладкомышечной клетки. Функциональная роль такого взаимодействия не ясна.

С целью ответа на вопрос о вероятности формирования подобных амилоидных структур в мышечных клетках, мы постарались выяснить склонность титина к агрегации на основании определения идентичности аминокислотной последовательности между отдельными парами N2B и N2BA-доменов в части молекулы титина, расположенной в I-зоне саркомера. С помощью программы BLAST было обнаружено, что Ig-домены вариабельного участка I-зоны, имеющегося только у длинной N2BA-изоформы титина, имеют более высокую идентичность аминокислотной последовательности (~32%, рассчитанной для 26 доменов) по сравнению с таковой (~23-25%, рассчитанной для 30 доменов) у других доменов I-зоны N2B и N2BA-изоформ титина. Известно, что склонность белка к агрегации увеличивается по мере увеличения идентичности в аминокислотной

последовательности (Wright et al., 2005). Можно предположить, что домены вариабельного участка N2BA-изоформы (имеющие более высокую идентичность аминокислотной последовательности) будут иметь более высокую склонность к агрегации, чем другие домены этого белка. В случае агрегации молекул титина в саркомере, подобные изменения приведут к увеличению жесткости агрегированного участка N2BA-изоформы титина, что может иметь значение в опосредованной регуляции актин-миозинового взаимодействия.

Предпосылки для вышеуказанного процесса амилоидной агрегации титина в саркомере имеются – это и частичное раскрытие домена в норме с высвобождением гидрофобных ядер, а также наши исследования, выявившие формирование обратимой амилоидной структуры без наблюдаемых изменений как минимум во вторичной структуре белка.

В контексте регулирования вязко-упругих свойств белков и их агрегатов необходимо коротко обсудить принципиальные различия между патологическими амилоидными агрегатами и функциональными амилоидами, к которым, по всей вероятности, относятся и амилоиды исследуемых нами мультидоменных мышечных белков. Избыточная жесткость является негативным признаком амилоидных агрегатов и присуща в основном патологическим амилоидным фибриллам. Известно, что амилоидные фибриллы из-за высокой жесткости способны механически разрывать клеточную мембрану, поэтому накопление амилоидных агрегатов, являющихся устойчивыми к протеолитической деградации, приводит к гибели клеток (Engel et al., 2008; Fitzpatricket et al., 2013(a); Fitzpatricket et al., 2013(b)) и развитию патологического процесса (Pepys, 2001). Избыточная жесткость скорее всего обусловлена наличием преобладающей кросс β-структуры. Как уже было описано выше, из-за небольшого содержания кросс β-структуры у функциональных амилоидных агрегатов, а также у агрегатов гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка, избыточной жесткости в их амилоидной структуре быть не может. Но временное увеличении жесткости на определенных участках белка за счет формирования амилоидных участков может являться модулятором вязко-упругих свойств. Это может иметь важное функциональное значение, поскольку эластичность молекул титина создает основу для растяжения мышцы без негативных последствий, тогда как вязко-упругие свойства

«пружинной» I-части его молекулы могут играть большую роль в регуляции процессов мышечного сокращения и внутриклеточной сигнализации (Kimura et al., 1984; Erickson, 1997; Kellermayer et al., 1997; Вихлянцев и др., 2011; Vikhliantsev et al., 2003). В А-зоне саркомера нельзя исключить формирование межмолекулярных амилоидных структур между молекулами титина и С-белка. Известно, что С-белок тесно связан с титином в А-зоне саркомера, участвуя в поддержании высокоупорядоченной структуры саркомера (Tonino et al., 2019). Не исключено, что молекула С-белка также, как и титина, может претерпевать механические деформации как при растяжении, так и сжатии мышечного саркомера. Следовательно, нельзя исключить возможное образование межмолекулярных амилоидных связей между этими белками, что может иметь значение для поддержания саркомерной структуры и развития необходимого уровня мышечного сокращения.

4.2.2. Агрегационные свойства титина *in vitro* и *in vivo*. Механизмы защиты клеток от агрегации титина

В продолжение обсуждения вопроса о возможности агрегации мультидоменных мышечных белков в клетках и возможной функциональной роли подобной агрегации *in vivo*, следует обсудить механизмы защиты клеток от нефункциональной белковой агрегации. В научной литературе обсуждается, что при растяжении саркомера поперечно-полосатых мышц домены титина могут разворачиваться, делая доступными скрытые гидрофобные участки, которые могут привести к агрегации белка и нарушению его функций (Rief et al., 1997; Minajeva et al., 2001). Следствием агрегирования развернутых Ig-доменов в I-зоне, по мнению выше процитированных авторов, может быть аномально высокая жесткость молекул титина и, следовательно, миоцитов. Для предотвращения агрегации Ig-доменов титина в этой части его молекулы с ним связываются малые шапероны (sHSPs). В частности, показано, что HSP27 и αβ-кристаллин не взаимодействуют с дистальными Ig-доменами, расположенными вблизи А-диска саркомера, но связываются с Ig-доменами растяжимой части молекулы титина, расположенной между Z-диском и PEVK-последовательностью в I-зоне саркомера (Kötter et al.,

2014). Следует заметить, что эти Ig-домены в отличие от PEVK- и N2B-последовательностей, более склонны к агрегации в условиях частичной денатурации (Kötter et al., 2014). Чем это объясняется? Известно, что белки, имеющие неупорядоченную структуру, устойчивы к агрегации благодаря различным механизмам: высокому суммарному заряду и низкой гидрофобности, низкому числу амилоидогенных участков и большому содержанию остатков пролина (Wrigh et al., 2005; Monsellier, Chiti, 2007). PEVK-участок титина богат пролином и имеет сравнительно высокий суммарный заряд (Tskhovrebova, Trinick, 1997). N2B-последовательность также содержит много остатков пролина и более высокий суммарный заряд, чем типичный Ig-домен титина (Kötter et al., 2014). Таким образом, наличие в составе молекулы титина PEVK- и N2B-последовательностей является защитным механизмом, снижающим вероятность агрегации этого белка *in vivo*. Однако в условиях перерастяжения мышцы, происходящем как при интенсивных физических нагрузках, так и при патологии (например, при ишемии, когда гибель отдельных миоцитов может привести к перерастяжению соседних клеток), вероятность разворачивания и, следовательно, агрегирования Ig-доменов титина сильно возрастает (Li et al., 2002). И хотя показано, что развернутые Ig-домены титина повторно сворачиваются *in vitro* даже при отсутствии шаперонов (Minajeva et al., 2001), в условиях *in vivo* при достаточно тесном расположении белков в саркомере этот процесс может быть затруднен, даже несмотря на защитные свойства шаперонов. В этом случае, агрегация приведет к значительному увеличению жесткости нитей титина, что может иметь негативные последствия для сократительной активности миоцитов и мышцы в целом. Защитой от подобных изменений может быть повышенный протеолиз титина (и его жестких агрегатов) в саркомере. Однако этот путь не исключает накопления фрагментов титина в клетке и формирования ими агрегатов в цитозоле. В этом случае может произойти аутофагия клетки – последняя стадия защиты организма от неконтролируемой агрегации саркомерных цитоскелетных белков (Galvez et al., 2007; Willis et al., 2009; Kötter et al., 2014).

Обсуждая вопрос о типе амилоидной агрегации (функциональной или патологической), стоит отметить, что случаев трансформации функциональных амилоидов в патологические не зафиксировано. Скорее всего, существуют

молекулярные механизмы защиты от такой трансформации, выработанные в процессе эволюции. Так, известно, что в мультидоменных белках с гомологичными тандемными повторами соседние домены имеют низкую идентичность в аминокислотной последовательности. Эта особенность, сформировавшаяся, по-видимому, в результате эволюционного давления, предотвращает неправильную укладку белков и последующую агрегацию (Wright et al., 2005; Borgia et al., 2015). Принято считать, что низкая склонность к агрегации характерна для тех белков, у которых идентичность между доменами составляет менее 40%. Известны данные об идентичности отдельных доменов титина в аминокислотной последовательности (Wright et al., 2005; Borgia et al., 2015). Мы рассчитали идентичность аминокислотных последовательностей титина курицы и 3 паралогов С-белка человека и кролика. Расчеты показали, что эти белки содержат только два домена с идентичностью более 50%. Средняя идентичность аминокислотной последовательности между парами соседних FnIII-подобных доменов или Ig-подобных доменов титина не превышает 40%, тогда как С-белка – 26%. Эти данные указывают на довольно низкую способность этих белков к агрегации, заложенную природой на уровне первичной структуры.

Результаты наших исследований указывают на то, что агрегаты титина и С-белка, формирующиеся *in vitro*, по своим свойствам можно классифицировать как функциональные. В связи с этим, возможную агрегацию этих белков в клетках *in vivo* мы не рассматриваем как патологическую, а – как полезную для функционирования мышечной клетки. Однако полностью исключить невозможность формирования в цитозоле клеток патологических агрегатов мультидоменных мышечных белков, проявляющих токсические свойства, нельзя, что подтверждают наши данные о негативном действии амилоидных агрегатов титина на адгезию клеток.

4.3. ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АМИЛОИДНЫХ АГРЕГАТОВ ГМТ

В рамках обсуждения вопроса о возможной агрегации титина и С-белка в клетках *in vivo* и способах защиты от формирования токсичных амилоидных

структур, не выясненным остался вопрос о возможном токсическом действии амилоидных агрегатов (в случае их образования) исследуемых нами белков на клетки. С одной стороны, амилоидные агрегаты исследуемых нами белков в организме обнаружены не были, с другой стороны, та легкость и скорость образования этими белками амилоидных агрегатов *in vitro*, дает основания говорить о возможном формировании и появлении агрегатов мультидоменных мышечных белков в клетках *in vivo*.

В этой связи следует обсудить результаты наших экспериментов о цитотоксическом влиянии амилоидных агрегатов титина. Проведенные нами исследования цитотоксического действия амилоидных агрегатов гладкомышечного титина на гладкомышечные клетки показали, что гибель клеток наблюдалась лишь через 72 часа эксперимента, и была связана с нарушением адгезии клеток (Рис. 44 и Рис. 46). Известны случаи негативного влияния амилоидных агрегатов Aβ-пептидов на гладкомышечные клетки (Miners et al., 2011). Показано, что болезнь Альцгеймера характеризуется накоплением амилоида в медии и адвентиции мелких и крупных артерий, орошающих центральную нервную систему, и/или накоплением отложений амилоидных Aβ-пептидов вокруг капилляров перфузии мозжечка, коры головного мозга и лептоменинкса (Bourassa et al., 2019). При этом показано, что накопление амилоидных агрегатов Aβ-пептидов в артериях индуцирует смерть гладкомышечных клеток сосудов и приводит к просачиванию крови через стенки сосудов. Это в свою очередь может приводить к развитию церебральной ишемии и микрогеморрагиям, как клиническим признакам церебральных амилоидных ангиопатий (Ruzali et al., 2013). Используя гладкомышечную культуру клеток, показано, что Aβ-индуцированное негативное действие на культуру гладкомышечных клеток сосудов связано с нарушениями адгезии этих клеток к внеклеточному матриксу из-за повышенного перицеллюлярного протеолиза компонентов внеклеточного матрикса (Blaise et al., 2012). Другие механизмы гибели гладкомышечных клеток в процитированной выше работе обнаружены не были. Примечательно, что эти авторы показали, что негативные эффекты и гибель гладкомышечных клеток, как и в наших экспериментах, наблюдались также через 72 часа инкубации клеток с Aβ 1-40 пептидом.

Известны литературные данные о влиянии олигомеров амилоидных β-пептидов на культуру клеток нейробластомы (Ferrera et al., 2017). Авторы данной работы выявили реорганизацию актинового цитоскелета, появление стресс-фибрилл и ламеллоподий у клеток под действием олигомеров Аβ-пептида. Причиной выявленных изменений является активация Аβ-пептидом Rho-ГТФ-азного сигнального пути.

Сравнивая вышеописанные данные с результатами наших исследований, полученными для гладкомышечного титина, следует отметить, что в описанных для Аβ-пептидов исследованиях речь идет о влиянии на культуру клеток или мономерного пептида, или его олигомеров. Однако в работах, касающихся исследования патологического процесса *in vivo*, речь идет об отложениях данного пептида в капиллярах. В этом случае, отложения Аβ-пептидов вряд ли могут представлять собой отдельные олигомеры или мономеры, а представляют собой, по всей видимости, скопления его агрегатов, оказывающих цитотоксическое действие.

В нашем эксперименте через 48 ч и 72 часа роста фибробластов на поверхности стекла, порытого амилоидными агрегатами гладкомышечного титина, мы наблюдали уменьшение количества клеток относительно контроля. Как и в случае с гладкомышечной культурой у фибробластов мы наблюдали дезорганизацию актинового цитоскелета и морфологические изменения в виде наличия стресс-фибрилл, ламеллоподий и филоподий. Подобных изменений у фибробластов, растущих на «контрольной» поверхности стекла (не содержащей амилоидных агрегатов), не наблюдалось. Т.о., мы подтвердили наше предположение о том, что свойства поверхности, представляющие собой агрегированный белок, могут оказывать влияние на адгезию клеток. Поверхность, покрытая амилоидными агрегатами гладкомышечного титина представляла собой антиадгезивную поверхность, а сами агрегаты белка обладали антиадгезивными свойствами.

Понимание процесса связывания клеток к любой поверхности, связано с пониманием последовательности физико-химических реакций, которые должны происходить между клетками и поверхностью. Из литературных данных известно, что основными предполагаемыми механизмами антиадгезивных свойств являются поверхностная энергия, электростатическое взаимодействие, стерическое отталкивание, гидратация и топография рельефа поверхности (Schakenraad et al.,

1987; Schakenraad, Busscher, 1989; Dalsin et al., 2003; Czeslik et al., 2004; Carre, Lacarriere, 2010; Zhang et al., 2012; Lourenço et al., 2012). Клетки не взаимодействуют непосредственно с поверхностью. Это взаимодействие происходит с помощью белков, которые они секретируют. Белки, в свою очередь, адсорбируются на поверхности, образуя свой собственный слой (Vladkova, 2010). При взаимодействии клеток с поверхностью *in vivo* или *in vitro* происходит сначала адсорбция белка на поверхности, что, в свою очередь, обеспечивает клеточную адгезию, а также способствует передаче сигналов клетке через рецепторы клеточной адгезии, главным образом, через белки интегрины (Parsons et al., 2010; Geiger, Yamada, 2011). Т.о., понимание факторов, влияющих на адгезионную способность клеток, является ключевым фактором при понимании процесса нарушения адгезии.

Известно, что топография поверхности полимера на микро- и наноуровне влияет на взаимодействия клеток или белков с поверхностью данного полимера. В частности, известны исследования, определяющие влияние топографии поверхности на морфологию, адгезию, миграцию и дифференцировку стволовых клеток (Kulangara, Leong, 2009; Pot et al., 2010). Было показано, что чем выше коэффициент шероховатости поверхности, тем ниже сродство клеток к этой поверхности и в большей степени нарушается клеточная адгезия в сравнении с нешероховатым субстратом (Dang et al., 2015).

В нашем исследовании методом АСМ было проведен анализ микротопографии неровностей поверхности, сформированных амилоидными агрегатами гладкомышечного титина. Полученные значения среднеквадратичной шероховатости (roughness) составили от 2.7 нм до 4.9 нм, что свидетельствует о высокой степени шероховатости поверхности. Полученные для агрегатов титина значения среднеквадратичной шероховатости поверхности превышают таковые, при которых наблюдалось значительное нарушение процесса клеточной адгезии (Dang et al., 2015). Учитывая эти данные и полученные нами результаты, мы можем заключить, что высокая степень шероховатости поверхности, сформированная вследствие нанесения амилоидных агрегатов гладкомышечного титина, сыграла роль в нарушении адгезии фибробластов. Схематически это процесс представлен на рисунке 52.

Точный механизм нарушения адгезии гладкомышечных клеток и фибробластов в результате нанесения на адгезивную поверхность амилоидных агрегатов гладкомышечного титина не ясен.

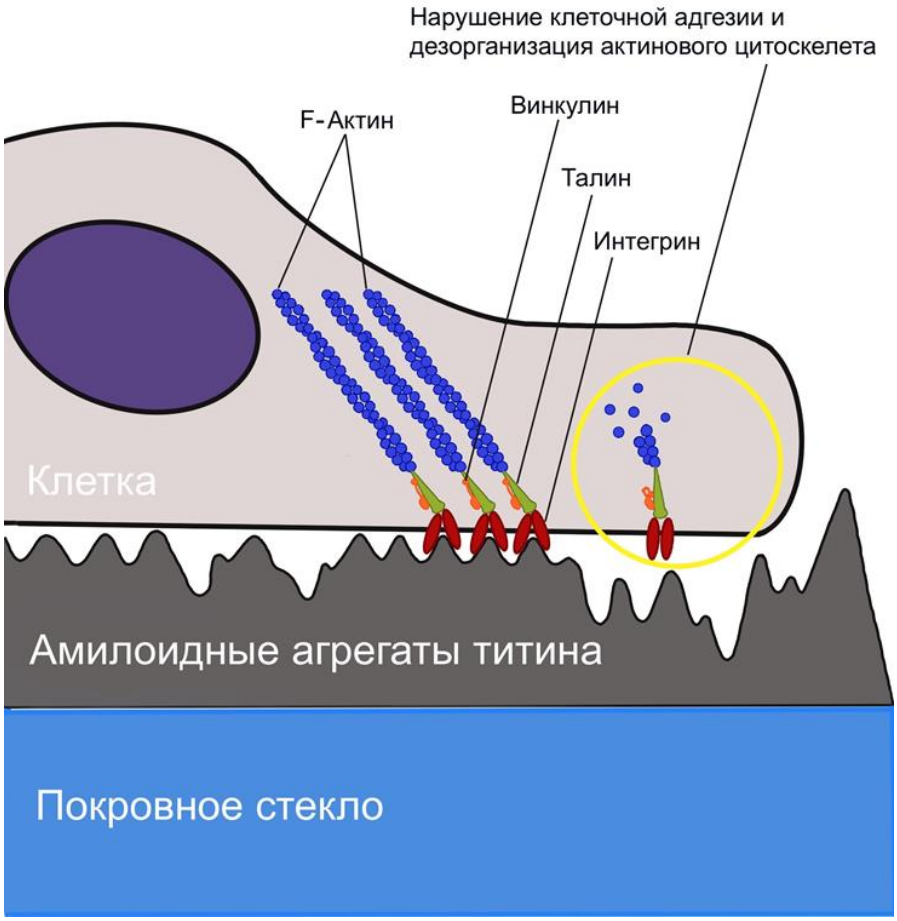


Рис. 52. Схематическое изображение клетки, находящейся на поверхности, покрытой амилоидными агрегатами гладкомышечного титина. Показан возможный механизм нарушения процесса адгезии клеток, связанный с топологией. Воспроизведено из работы (Bobylev et al., 2021), выполненной при участии автора диссертации.

Другие проведенные исследования по влиянию микротопологии на антиадгезивные свойства также не дают ответ на этот вопрос (Hallab et al., 1995; Ponsonnet et al., 2003; Dowling et al., 2011). Тем не менее, нами получен важный результат, указывающий на то, что изменения шероховатости биологической поверхности (например, отложения кристаллов соли на поверхности кости) могут приводить к изменению адгезии клеток, что, в свою очередь, может привести к неблагоприятным последствиям. Одной из причин изменения шероховатости биологической поверхности могут быть амилоидные агрегаты. Можно

предположить, что локальное образование амилоидных агрегатов любых белков *in vivo* может приводить к изменениям топографии подложки с последующим нарушением клеточной адгезии, что будет приводить к гибели клеток. Вполне вероятно, что подобный процесс происходит при накоплении отложений Aβ-пептидов в сосудах (Miners et al., 2011; Blaise et al., 2012). Показанный нами путь гибели клеток в присутствии амилоидных агрегатов титина, нарушающих клеточную адгезию, расширяет представления о влиянии амилоидных агрегатов на живой организм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные нами *in vitro* исследования показали, что гладкомышечный титин и скелетномышечный С-белок формируют амилоидные аморфные агрегаты. В формировании межмолекулярных амилоидных связей в аморфных агрегатах задействованы не целые молекулы, а только части (раскрытые участки) молекул этих белков. При формировании агрегатов титина и С-белка не происходит изменений в их вторичной структуре. Таким образом, амилоидная агрегация этих белков происходит при минимальных внутримолекулярных перестройках и сопровождается минимальными энергетическими затратами. Данные, полученные методами структурного анализа, показывают, что формирование амилоидной кросс-β структуры в агрегатах титина и С-белка может происходить на этапе их олигомеризации, т.е., на самой начальной стадии процесса агрегации, когда в растворе неагрегированных, нативных молекул этих белков уже присутствуют их олигомеры. Из таких олигомеров, внутри которых, по всей вероятности, имеются участки с кросс-β структурой, в дальнейшем формируются более крупные агрегаты.

Формирование амилоидных агрегатов исследованных мышечных белков происходит за относительно короткие временные интервалы (в течение 5-10 мин в случае С-белка и в течение 20-60 минут в случае титина). При этом наличие олигомеров на начальной стадии агрегации ускоряет этот процесс. Таким образом, агрегация исследуемых мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов

происходит без образования ядер нуклеации, что отличается от процесса образования амилоидных агрегатов большинством других амилоидных белков.

Выявлена способность амилоидных агрегатов мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов дезагрегировать при повышении ионной силы. Эти данные, указывающие на обратимость процесса агрегации исследуемых белков, позволяют делать предположение о возможности функциональной амилоидной агрегации титина и С-белка в мышечных клетках *in vivo*.

Выявлено негативное действие амилоидных агрегатов титина на культуру гладкомышечных клеток и фибробластов. В частности, обнаружено нарушение адгезии клеток на поверхности, покрытой амилоидными агрегатами гладкомышечного титина. При этом также было обнаружено, что нарушение адгезии клеток связано с топологическими особенностями поверхности, которую формируют амилоидные агрегаты белка и на которой находились клетки. Таким образом, впервые был представлен новый механизм влияния белковых амилоидных агрегатов на адгезию и выживаемость клеток.

Подводя итог, можно заключить, что для гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка характерен особый путь агрегации, заключающийся в способности формировать только аморфные амилоидные агрегаты. При этом наблюдаются следующие особенности агрегации этих белков: (1) высокая скорость образования амилоидных агрегатов при отсутствии фазы нуклеации (зародышеобразования); (2) отсутствие изменений во вторичной структуре при агрегации; (3) обратимость процесса агрегации. Полученные результаты расширяют представления о процессе амилоидной агрегации мышечных белков суперсемейства иммуноглобулинов и белков в целом.

ВЫВОДЫ

1. Гладкомышечный титин и скелетномышечный С-белок формируют аморфные агрегаты *in vitro*, что показано методами просвечивающей электронной микроскопии и атомно-силовой микроскопии.
2. Методами рентгеновской дифракции и спектрофлуориметрии с использованием красителя тиофлавина Т подтверждена амилоидная природа аморфных агрегатов исследуемых белков.
3. Формирование амилоидных агрегатов гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка происходит за относительно короткие временные интервалы (5-10 мин для С-белка, 20 мин для гладкомышечной изоформы титина с м.м. 1500 кДа и 60 мин для гладкомышечной изоформы титина с м.м. 500 кДа) при значениях pH 7.0. Присутствие олигомеров исследуемых белков может объяснять их высокую скорость агрегации.
4. При формировании амилоидных агрегатов гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка не происходит изменений во вторичной структуре белков. При этом методом ДСК обнаружены незначительные различия в термодинамической стабильности между неагрегированной и агрегированной формами гладкомышечного титина, что свидетельствует о низких энергетических затратах при формировании агрегатов данного белка.
5. Амилоидные агрегаты гладкомышечного титина и скелетномышечного С-белка не оказывали токсического действия на культуру гладкомышечных клеток аорты крысы и культуру фибробластов человека, однако амилоидные агрегаты гладкомышечного титина нарушали адгезию клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бобылёва, Л.Г. Изучение амилоидных свойств гладкомышечного белка смитина./ А.Г. Бобылёв, М.Д. Шпагина, И.М. Вихлянцев, Н.А. Фрейдина, З.А. Подлубная // Технологии живых систем. – 2010. – Т. 7, №8. – С. 64-68.

2. Вихлянцев, И.М. Фосфорилирование саркомерных цитоскелетных белков – адаптационный фактор ингибирования сократительной актив ности мышц при зимней спячке./ И.М. Вихлянцев, З.А. Подлубная // Биофизика. – 2003. – Т.48, – №3. – С. 499-504.

3. Вихлянцев, И.М. Изменения изоформного состава, структуры и функциональных свойств тайтина сердечной мышцы Монгольской песчанки (*Meriones unguiculatus*) после пребывания в условиях реальной невесомости./ И.М. Вихлянцев, А.Д. Уланова (Окунева), М.Д. Шпагина, Ю.В. Шумилина, Н.В. Молочков, Н.Н. Салмов, З.А. Подлубная // Биохимия. – 2011. – Т. 76, №12. – С. 1629-1639.

4. Вихлянцев, И.М. Новые изоформы тайтина (коннектина) и их функциональная роль в поперечно-полосатых мышцах млекопитающих. Факты и предположения./ И.М. Вихлянцев, З.А. Подлубная // Успехи биологической химии. – 2012. – Т. 52, – С. 239-280.

5. Марсагишвили, Л.Г. Саркомерные белки семейства тайтина образуют амилоиды./ Л.Г. Марсагишвили, М.Д. Шпагина, В.И. Емельяненко, З.А. Подлубная // Биофизика. – 2005. – Т. 50, №5. – С. 803-809.

6. Подлубная, З.А. Новые амилоидные белки семейства тайтина и их свойства: перспективы для диагностики амилоидозов./ З.А. Подлубная, Л.Г. Марсагишвили // Технологии живых систем. – 2008. – Т. 5, № 5-6. – С 11-21.

7. Abbas, S.A. Characterization of antibody-polyol interactions by static light scattering: implications for physical stability of protein formulations./ S.A. Abbas, V.K. Sharma, T.W. Patapoff, D.S. Kalonia // Int. J. Pharm. – 2013. – V. 448, – P. 382-389.

8. Abdolvahab, M.H. Immunogenicity of recombinant human interferon beta-1b in immune-tolerant transgenic mice corresponds with the biophysical characteristics of aggregates./ M.H. Abdolvahab, A. Fazeli, A. Halim, A.S. Sediq, M.R. Fazeli, H.

Schellekens // J. Interferon Cytokine Res. – 2016. – V. 36, №4. – P. 247-257. doi: 10.1089/jir.2015.0108.

9. Abe, H. Novel observation of a circular dichroism band originating from amyloid fibril./ H. Abe, H. Nakanishi // Anal. Sci. – 2003. – V. 19, – P. 171-173. doi: 10.2116/analsci.19.171.

10. Ackermann, M.A. Myosin binding protein-C slow: A multifaceted family of proteins with a complex expression profile in fast and slow twitch skeletal muscles./ M.A. Ackermann, A. Kontrogianni-Konstantopoulos // Front. Physiol. – 2013. – V. 4. – P. 391. doi: 10.3389/fphys.2013.00391.

11. Ackermann, M.A. Myosin binding protein-C slow: An intricate subfamily of proteins./ M.A. Ackermann, A. Kontrogianni-Konstantopoulos // J. Biomed. Biotechnol. – 2010. – V. 2010:652065. doi: 10.1155/2010/652065.

12. Adams, D. Expert consensus recommendations to improve diagnosis of ATTR amyloidosis with polyneuropathy./ D. Adams, Y. Ando, J.M. Beirão, T. Coelho, M.A. Gertz, J.D. Gillmore, P.N. Hawkins, I. Lousada, O.B. Suhr, G. Merlini // J. Neurol. – 2020. – V. 268, №6. – P. 2109-2122. doi: 10.1007/s00415-019-09688-0.

13. Adamcik, J. Amyloid Polymorphism in the Protein Folding and Aggregation Energy Landscape./ J. Adamcik, R. Mezzenga // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. – 2018. – V. 9, №57(28). – P. 8370-8382. doi: 10.1002/anie.201713416.

14. Adamcik, J. Measurement of intrinsic properties of amyloid fibrils by the peak force QNM method./ J. Adamcik, C. Lara, I. Usov, J.S. Jeong, F.S. Ruggeri, G. Dietler, H.A. Lashuel, I.W. Hamley, R. Mezzenga // Nanoscale. – 2012. – V. 7, №4(15). – P. 4426-4429. doi: 10.1039/c2nr30768e.

15. Adamcik, J. Study of amyloid fibrils via atomic force microscopy./ J. Adamcik, R. Mezzenga // Curr. Opin. Colloid Interface Sci. – 2012. – V. 17, – P. 369-376 doi: 10.1016/j.cocis.2012.08.001.

16. Adem, Y.T. Hexyl glucoside and hexyl maltoside inhibit light-induced oxidation of tryptophan./ Y.T. Adem, P. Molina, H. Liu, T.W. Patapoff, A. Sreedhara, O. Esue // J. Pharm. Sci. – 2014. – V. 103, №2. – P. 409-416. doi: 10.1002/jps.23809.

17. Adrover, M. Mechanistic insights in glycation-induced protein aggregation./ M. Adrover, L. Marino, P. Sanchis, K. Pauwels, Y. Kraan, P. Lebrun, B. Vilanova, F. Munoz, K. Broersen, J. Donoso // Biomacromolecules. – 2014. – V. 15, №9. – P 3449-3462. doi: 10.1021/bm501077j.

18. Agarkhed, M. Srivastava Effect of polysorbate 80 concentration on thermal and photostability of a monoclonal antibody./ M. Agarkhed, C. O'Dell, M.C. Hsieh, J. Zhang, J. Goldstein, A. Srivastava // AAPS PharmSciTech. – 2013. – V. 14, №.1. – P. 1-9. doi: 10.1208/s12249-012-9878-0.

19. Aimoto, S. Structural conversion of neurotoxic amyloid β(1-42) oligomers to fibrils./ S. Aimoto, J.I. Elliott, W.E. Van Nostrand S.O. Smith // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2010. – V. 17, – P. 561-567. doi: 10.1038/nsmb.1799.

20. Alberti, S. A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins./ S. Alberti; R. Halfmann, O. King, A. Kapila; S.A. Lindquist // Cell. – 2009. – V. 137, №.1. – P. 146-158. doi: 10.1016/j.cell.2009.02.044.

21. Alting, A.C. Physical and chemical interactions in cold gelation of food proteins./ A.C. Alting, H.H. de Jongh, R.W. Visschers, J.W. Simons // J. Agric. Food Chem. – 2002. – V. 50, №.16. – P. 4682-4689. doi: 10.1021/jf011657m

22. Andrews J.M., Lumry-Eyring nucleated polymerization model of protein aggregation kinetics: 1. Aggregation with pre-equilibrated unfolding./ J.M. Andrews, C.J. Roberts // J. Phys. Chem. B. – 2007(a). – V. 111, №27. – P. 7897-7913. doi: 10.1021/jp070212j.

23. Andrews, J.M. Non-native aggregation of alpha-chymotrypsinogen occurs through nucleation and growth with competing nucleus sizes and negative activation energies./ J.M. Andrews, C.J. Roberts // Biochemistry. – 2007(b). – V. 46, №27. – P. 7558-7571. doi: 10.1021/bi700296f.

24. Anfinsen, C.B. Principles that govern the folding of protein chains./ C.B. Anfinsen // Science. – 1973. – V. 181, №4096. – P. 223-230. doi: 10.1126/science.181.4096.223.

25. Angelani, C.R. Delfino Toward a common aggregation mechanism for a β-barrel protein family: insights derived from a stable dimeric species./ C.R. Angelani, L.M. Curto,

I.S. Cabanas, J.J. Caramelo, V.N. Uversky, J.M. Delfino // Biochim. Biophys. Acta. – 2014. – V. 1844, №9. – P. 1599-1607. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.06.002.

26. Annamalai, K. Polymorphism of Amyloid Fibrils *In Vivo*./ K. Annamalai, K.H. Gührs, R. Koehler, M. Schmidt, H. Michel, C. Loos, P.M. Gaffney, C.J. Sigurdson, U. Hegenbart, S. Schönland, M. Fändrich // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. – 2016. – V. 55, №15. – P. 4822-4825. doi: 10.1002/anie.201511524.

27. Annamalai, K. Common Fibril Structures Imply Systemically Conserved Protein Misfolding Pathways *In Vivo*./ K. Annamalai, F. Liberta, M.T. Vielberg, W. Close, H. Lilie, K.H. Gührs, A. Schierhorn, R. Koehler, A. Schmidt, C. Haupt, U. Hegenbart, S. Schönland, M. Schmidt, M. Groll, M. Fändrich // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. – 2017. – V. 56, №26. – P. 7510-7514. doi: 10.1002/anie.201701761

28. Antonets, K.S. Accumulation of storage proteins in plant seeds is mediated by amyloid formation./ K.S. Antonets, M.V. Belousov, A.I. Sulatskaya, M.E. Belousova, A.O. Kosolapova, M.I. Sulatsky, E.A. Andreeva, P.A. Zykin, Y.V. Malovichko, O.Y. Shtark, A.N. Lykholay, K.V. Volkov, I.M. Kuznetsova, K.K. Turoverov, E.Y. Kochetkova, A.G. Bobylev, K.S. Usachev, O.N. Demidov, I.A. Tikhonovich, A.A. Nizhnikov // PLoS Biol. – 2020. – V. 18, №7. e3000564. doi: 10.1371 /journal.pbio.3000564.

29. Antzutkin, O.N. Supramolecular structural constraints on Alzheimer's beta-amyloid fibrils from electron microscopy and solid-state nuclear magnetic resonance./ O.N. Antzutkin, R.D. Leapman, J.J. Balbach, R. Tycko // Biochemistry. – 2002. – V. 41, – P. 15436-15450. doi: 10.1021/bi0204185.

30. Arakawa, T. Protein aggregation under high concentration/density state during chromatographic and ultrafiltration processes./ T. Arakawa, D. Ejima, T. Akuta. // Int. J. Biol. Macromol. – 2017. – V. 95, – P. 1153-1158. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.11.005.

31. Arya, P. Selective interception of gelsolin amyloidogenic stretch results in conformationally distinct aggregates with reduced toxicity./ P. Arya, A. Srivastava, S.V. Vasaikar, G. Mukherjee, P. Mishra, B. Kundu // ACS Chem. Neurosci. – 2014. – V. 5, №10. – P. 982-992. doi: 10.1021/cn500002v.

32. Arora, J. Charge-mediated Fab-Fc interactions in an IgG1 antibody induce reversible self-association, cluster formation, and elevated viscosity./ J. Arora, Y. Hu, R. Esfandiary, H.A. Sathish, S.M. Bishop, S.B. Joshi, C.R. Middaugh, D.B. Volkin, D.D. Weis // MAbs. – 2016. – V. 8, №8. – P. 1561-1574. doi: 10.1080/19420862.2016.1222342.

33. Arora, J. Correlating the effects of antimicrobial preservatives on conformational stability, aggregation propensity, and backbone flexibility of an IgG1 mAb./ J. Arora, S.B. Joshi, C.R. Middaugh, D.D. Weis, D.B. Volkin // J. Pharm. Sci. – 2017.– V. 106, №6. – P. 1508-1518. doi: 10.1016/j.xphs.2017.02.007.

34. Arosio, P. On the role of salt type and concentration on the stability behavior of a monoclonal antibody solution./ P. Arosio, B. Jaquet, H. Wu, M. Morbidelli // Biophys. Chem. – 2012. – V. 168–169, – P. 19-27. doi: 10.1016/j.bpc.2012.05.004.

35. Arosio P. Aggregation mechanism of an IgG2 and two IgGI monoclonal antibodies at low pH: from oligomers to larger aggregates./ P. Arosio, S. Rima, M. Morbidelli // Pharm. Res. – 2013. – V. 30, №3. – P. 641-654. doi: 10.1007/s11095-012-0885-3.

36. Arranz, R. Structural characterization of microcin E492 amyloid formation: Identification of the precursors./ R. Arranz, G. Mercado, J. Martín-Benito, R. Giraldo, O. Monasterio, R. Lagos, J.M. Valpuesta // J. Struct. Biol. – 2012. – V. 178, №1. – P. 54-60. doi: 10.1016/j.jsb.2012.02.015.

37. Arzeni, C. Functionality of egg white proteins as affected by high intensity ultrasound./ C. Arzeni, O.E. Perez, A.M.R. Pilosof // Food Hydrocolloids. – 2012. – V. 29, №2. – P. 308-316. doi: 10.1016/j.foodhyd.2012.03.009.

38. Arzensek, D. Hofmeister effects in monoclonal antibody solution interactions./ D. Arzensek, D. Kuzman, R. Podgornik // J. Phys. Chem. B. – 2015. – V. 119, №33. – P. 10375-10389. doi: 10.1021/acs.jpcb.5b02459.

39. Aslund, A. Novel pentameric thiophene derivatives for *in vitro* and *in vivo* optical imaging of a plethora of protein aggregates in cerebral amyloidosis./ A. Aslund, C.J. Sigurdson, T. Klingstedt, S. Grathwohl, T. Bolmont, D.L. Dickstein, E. Glimsdal, S. Prokop, M. Lindgren, P. Konradsson, D,M. Holtzman, P.R. Hof, F.L. Heppner, S. Gandy, M. Jucker, A. Aguzzi, P. Hammarström, K.P. Nilsson // ACS Chem. Biol. – 2009. – V. 4, №8. – P. 673-684. doi: 10.1021/cb900112v.

40. Astbury, W.T. The X-ray diffraction interpretation of denaturation and the structure of seed globulins./ W.T. Astbury, S. Dickinson, K. Bailey // Biochem. J. – 1935. – V. 29, №10. – P. 2351-2360. doi: 10.1042/bj0292351.

41. Atwood, C.S. Amyloid-beta: Redox-metal Chelator and Antioxidant./ C.S. Atwood, S.R. Robinson, M.A. Smith // J. Alzheimers Dis. – 2002. – V. 4, №3. – P. 203-214. doi: 10.3233/jad-2002-4310.

42. Austerberry, J.I. The effect of charge mutations on the stability and aggregation of a human single chain Fv fragment./ J.I. Austerberry, R. Dajani, S. Panova, D. Roberts, A.P. Golovanov, A. Pluen, C.F. van der Walle, S. Uddin, J. Warwicker, J.P. Derrick, R. Curtis // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2017. – V. 115, – P. 18-30. doi: 10.1016/j.ejpb.2017.01.019.

43. Ayoob, J.C. Targeting of cardiac muscle titin fragments to the Z-bands and dense bodies of living muscle and non-muscle cells./ J.C. Ayoob, K.K. Turnacioglu, B. Mittal, J.M. Sanger, J.W. Sanger // Cell. Motil. Cytoskeleton. – 2000. – V. 45, №4. – P. 67-82. doi: 10.1002/(SICI)1097-0169(200001)45:1<67::AID-CM7>3.0.CO;2-T.

44. Azuaga, A.I. Unfolding and aggregation during the thermal denaturation of streptokinase./ A.I. Azuaga, C.M. Dobson, P.L. Mateo, F. Conejero-Lara // Eur. J. Biochem. – 2002. – V. 269, – P. 4121-4133. doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.03107.x.

45. Bai, G. Computational fluid dynamics (CFD) insights into agitation stress methods in biopharmaceutical development./ G. Bai, J.S. Bee, J.G. Biddlecombe, Q.M. Chen, W.T. Leach // Int. J. Pharm. – 2012. – V. 423, №2. – P. 264-280. doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.11.044.

46. Balbach, J.J. Supramolecular structure in full-length Alzheimer's beta-amyloid fibrils: evidence for a parallel beta-sheet organization from solid-state nuclear magnetic resonance./ J.J. Balbach, A.T. Petkova, N.A. Oyler, O.N. Antzutkin, D.J. Gordon, S.C. Meredith, R. Tycko // Biophys. J. – 2002. –V. 83, №2. – P. 1205-1216 doi: 10.1016/S0006-3495(02)75244-2.

47. Balch, W.E. Adapting proteostasis for disease intervention./ W.E. Balch, R.I. Morimoto, A. Dillin, J.W. Kelly // Science. – 2008. – V. 319, №5865. – P. 916-919. doi: 10.1126/science.1141448.

48. Balchin, D. *In vivo* aspects of protein folding and quality control./ D. Balchin, M. Hayer-Hartl, F.U. Hartl // Science. – 2016. – V. 353, №6294. aac4354. doi: 10.1126/science.aac4354.

49. Baldwin, A.J. Metastability of native proteins and the phenomenon of amyloid formation./ A.J. Baldwin, T.P. Knowles, G.G. Tartaglia, A.W. Fitzpatrick, G.L. Devlin, S.L. Shammas, C.A. Waudby, M.F. Mossuto, S. Meehan, S.L. Gras, J. Christodoulou, S.J. Anthony-Cahill, P.D. Barker, M. Vendruscolo, C.M. Dobson // J. Am. Chem. Soc. – 2011. – V. 133, №36. – P. 14160-14163. doi: 10.1021/ja2017703.

50. Bang, M.L. 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./ M.L. Bang, T. Centner, F. Fornoff, A. J. Geach, M. Gotthardt, M. McNabb, C.C. Witt, D. Labeit, C.C. Gregorio, H. Granzier, S. Labeit // Circulation Res. – 2001. –V. 89 №11. 1065-1072. doi:10.1161/hh2301.100981.

51. Balguerie, A. Domain organization and structure-function relationship of the HET-s prion protein of Podospora anserina./ A. Balguerie, S. Dos Reis, C. Ritter, S. Chaignepain, B. Coulary-Salin, V. Forge, K. Bathany, I. Lascu, J.M. Schmitter, R. Riek, S.J. Saupe // EMBO J. – 2003. – V. 22, №9. – P. 2071-2081. doi: 10.1093/emboj/cdg213.

52. Banks, D.D. The effect of sucrose hydrolysis on the stability of protein therapeutics during accelerated formulation studies./ D.D. Banks, D.M. Hambly, J.L. Scavezze, C.C. Siska, N.L. Stackhouse, H.S. Gadgil // J. Pharm. Sci. –2009.– V. 98, №12. – P. 4501-4510. doi: 10.1002/jps.21749.

53. Barnard, J.G. Carpenter Subvisible particle counting provides a sensitive method of detecting and quantifying aggregation of monoclonal antibody caused by freeze-thawing: insights into the roles of particles in the protein aggregation pathway./ J.G. Barnard, S. Singh, T.W. Randolph, J.F. // J. Pharm. Sci. – 2011. – V. 100, №2. – P. 492-503. doi: 10.1002/jps.22305.

54. Barnett, G.V. Aggregate structure, morphology and the effect of aggregation mechanisms on viscosity at elevated protein concentrations./ G.V. Barnett, W. Qi, S. Amin, E. Neil Lewis, C.J. Roberts // Biophys. Chem. – 2015. – V. 207, – P. 21-29. doi: 10.1016/j.bpc.2015.07.002.

55. Barnett, G.V. Acetate- and citrate-specific ion effects on unfolding and temperature-dependent aggregation rates of anti-streptavidin IgG1./ G.V. Barnett, V.I. Razinkov, B.A. Kerwin, A. Hillsley, C.J. Roberts // J. Pharm. Sci. – 2016. – V. 105, №3. – P. 1066-1073. doi: 10.1016/j.xphs.2015.12.017.

56. Barnhart, M.M. Curli biogenesis and function./ M.M. Barnhart, M.R. Chapman // Annu. Rev. Microbiol. – 2006. – V. 60, – P. 131-147. doi: 10.1146/annurev.micro.60.080805.142106.

57. Barz, B. Minimal model of self-assembly: emergence of diversity and complexity./ B. Barz, B. Urbanc // J. Phys. Chem. B. – 2014. – V. 118, №14. – P. 3761-3770. doi: 10.1021/jp412819j.

58. Bauer, R. Characterisation and isolation of intermediates in β-lactoglobulin heat aggregation at high pH./ R. Bauer, R. Carotta, C. Rischel, L. Øgendal // Biophys. J. – 2000. – V. 79, №2. – P.1030-1038. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76357-0.

59. Baumgartner, K. Prediction of salt effects on protein phase behavior by HIC retention and thermal stability./ K. Baumgartner, S. Grobhans, J. Schütz, S. Suhm, J. Hubbuch // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2016. – V. 128, –P. 216-225. doi: 10.1016/j.jpba.2016.04.040.

60. Baxa, U. The N-terminal prion domain of Ure2p converts from an unfolded to a thermally resistant conformation upon filament formation./ U. Baxa, P.D. Ross, R.B. Wickner, A.C. Steven // J. Mol. Biol. – 2004. – V. 339, – P. 259-264. doi: 10.1016/j.jmb.2004.03.033.

61. Baxa, U. Filaments of the Ure2p prion protein have a cross-beta core structure./ U. Baxa, N. Cheng, D.C. Winkler, T.K. Chiu, D.R. Davies, D. Sharma, H. Inouye, D.A. Kirschner, R.B. Wickner, A.C. Steven, // J. Struct. Biol. – 2005. – V. 150, №2. – P.170-179. doi: 10.1016/j.jsb.2005.02.007.

62. Bednarek, E. Structure and pharmaceutical formulation development of a new long-acting recombinant human insulin analog studied by NMR and MS./ E. Bednarek, J. Sitkowski, W. Bocian, P. Borowicz, G. Plucienniczak, D. Stadnik, W. Surmacz-Chwedoruk, B. Jaworska, L. Kozerski // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2017. – V. 135, – P. 126-132. doi: 10.1016/j.jpba.2017.11.034.

63. Bee, J.S. Monoclonal antibody interactions with micro- and nanoparticles: adsorption, aggregation, and accelerated stress studies./ J.S. Bee, D. Chiu, S. Sawicki, J.L. Stevenson, K. Chatterjee, E. Freund, J.F. Carpenter, T.W. Randolph // J. Pharm. Sci. – 2009. – V. 98, №9. – P. 3218-3238. doi: 10.1002/jps.21768.

64. Bee, J.S. Aggregation of a monoclonal antibody induced by adsorption to stainless steel./ J.S. Bee, M. Davis, E. Freund, J.F. Carpenter, T.W. Randolph // Biotechnol. Bioeng. – 2010. – V. 105, №1. – P. 121-129. doi: 10.1002/bit.22525.

65. Bennett, P. The structure of C-protein and X-protein molecules and a polymer of X-protein./ P. Bennett, R. Starr, A. Elliott, G. Offer // J Mol Biol. – 1985. V. 184, № 2. – P. 297-309. doi: 10.1016/0022-2836(85)90381-x.

66. Bhak, G. Mechanism of amyloidogenesis: Nucleation-dependent fibrillation versus double-concerted fibrillation./ G. Bhak, Y.J. Choe, S.R. Paik // BMB Rep. – 2009. – V. 42, №9. – P. 541-551. doi: 10.5483/bmbrep.2009.42.9.541.

67. Bemporad, F. Characterizing intermolecular interactions that initiate native-like protein aggregation./ F. Bemporad, A. de Simone, F. Chiti, C.M. Dobson // Biophys. J. – 2012. – V. 102, №11. – P. 2595-2604. doi: 10.1016/j.bpj.2012.03.057.

68. Benson, M.D. Amyloid nomenclature 2018: recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee./ M.D. Benson, J.N. Buxbaum, D.S. Eisenberg, G. Merlini, M.J. Saraiva, Y. Sekijima, J.D. Sipe, P. Westermark // Amyloid. – 2018. – V. 25, №4. – P.215-219. doi: 10.1080/13506129.2018.1549825.

69. Berne, B.J. Dynamic light scattering: With applications to chemistry, biology, and physics./ B.J. Berne, R.Pecora // in: J. Chem. Educ. – 1977. – V. 54, № 10. – P. 1-430. doi :10.1021/ed054pA430.1.

70. Berryman, J.T. Systematic examination of polymorphism in amyloid fibrils by molecular-dynamics simulation./ J.T. Berryman, S.E. Radford, S.A. Harris // Biophys. J. – 2011. – V. 100, №9. – P. 2234-2242. doi: 10.1016/j.bpj.2011.02.060.

71. Bessa, J. The immunogenicity of antibody aggregates in a novel transgenic mouse model./ J. Bessa, S. Boeckle, H. Beck, T. Buckel, S. Schlicht, M. Ebeling, A. Kiialainen, A. Koulov, B. Boll, T. Weiser, T. Singer, A.G. Rolink, A. // Pharm. Res. – 2015. – V. 32, №7. – P. 2344-2359. doi: 10.1007/s11095-015-1627-0.

72. Bhattacharya, M. Insights into the mechanism of aggregation and fibril formation from bovine serum albumin./ M. Bhattacharya, N. Jain, S. Mukhopadhyay // J. Phys. Chem. B. – 2011. – V. 115, №14. P. 4195-4205. doi: 10.1021/jp111528c.

73. Bickel, F. Reversible NaCl-induced aggregation of a monoclonal antibody at low pH: characterization of aggregates and factors affecting aggregation./ F. Bickel, E.M. Herold, A. Signes, S. Romeijn, W. Jiskoot, H. Kiefer // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2016. – V. 107, – P. 310-320. doi: 10.1016/j.ejpb.2016.07.020.

74. Bieler, S. Amyloid formation modulates the biological activity of a bacterial protein./ S. Bieler, L. Estrada, R. Lagos, M. Baeza, J. Castilla, C. Soto // J. Biol. Chem. – 2005. – V. 280, №29. – P. 26880-26885. doi: 10.1074/jbc.M502031200.

75. Bis, R.L. Antimicrobial preservatives induce aggregation of interferon alpha-2a: the order in which preservatives induce protein aggregation is independent of the protein./ R.L. Bis, K.M. Mallela // Int. J. Pharm. – 2014. – V. 472, №1-2. – P. 356-361. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.06.044.

76. Bis, R.L. Role of benzyl alcohol in the unfolding and aggregation of interferon α-2a./ R.L. Bis, S.M. Singh, J. Cabello-Villegas, K.M. Mallela // J. Pharm. Sci. – 2015. – V. 104, №2. – P. 407-415. doi: 10.1002/jps.24105.

77. Blaise R. Wild-type amyloid beta 1-40 peptide induces vascular smooth muscle cell death independently from matrix metalloprotease activity./ R. Blaise, V. Mateo, C. Rouxel, F. Zaccarini, M. Glorian, G. Béréziat, V.S. Golubkov, I. Limon. // Aging Cell. – 2012. – V. 11, №3. – P. 384-393. doi: 10.1111/j.1474-9726.2012.00797.x

78. Blake, C. Synchrotron x-ray studies suggest that the core of the transthyretin amyloid fibril is a continuous β-sheet helix./ C. Blake, L. Serpell // Structure. – 1996. – V. 4, №8. – P. 989-998. doi: 10.1016/s0969-2126(96)00104-9.

79. Blancas-Mejia, L.M. Thermodynamic and fibril formation studies of full length immunoglobulin light chain AL-09 and its germline protein using scan rate dependent thermal unfolding./ L.M. Blancas-Mejia, T.J. Horn, M. Marin-Argany, M. Auton, A. Tischer, M. Ramirez-Alvarado // Biophys. Chem. – 2015. – V. 207, – P. 13-20. doi: 10.1016/j.bpc.2015.07.005.

80. Bobylev, A.G. Smooth muscle titin forms *in vitro* amyloid aggregates./ A.G. Bobylev, O.V. Galzitskaya, R.S. Fadeev, L.G. Bobyleva, D.A. Yurshenas, N.V. Molochkov, N.V. Dovidchenko, O.M. Selivanova, N.V. Penkov, Z.A. Podlubnaya, I.M.Vikhlyantsev // Biosci. Rep. – 2016. – V. 36, №3. e00334. doi: 10.1042/BSR20160066.

81. Bobylev A.G. Changes in titin structure during its aggregation./ A.G. Bobylev, E.I. Yakupova, L.G. Bobyleva, O.V. Galzitskaya, A.D. Nikulin, S.A. Shumeyko, D.A. Yurshenas, I.M. Vikhlyantsev // Mol Biol. (Mosk). 2020, V. 54, №4. – P. 643-652. doi: 10.31857/S0026898420040047.

82. Bobylev, A.G. Amyloid Aggregates of Smooth-Muscle Titin Impair Cell Adhesion./ A.G. Bobylev, R.S. Fadeev, L.G. Bobyleva, M.I. Kobyakova, Y.M. Shlyapnikov, D.V. Popov, I.M. Vikhlyantsev. // Int J Mol Sci. – 2021. – V. 22, №9. – P. 4579. doi: 10.3390/ijms22094579.

83. Bobylev, A.G. Nonspecific Amyloid Aggregation of Chicken Smooth-Muscle Titin: In Vitro Investigations./ A.G. Bobylev, E.I. Yakupova, L.G. Bobyleva, N.V. Molochkov, A.A. Timchenko, M.A. Timchenko, H. Kihara, A.D. Nikulin, A.G. Gabdulkhakov, T.N. Melnik, N.V. Penkov, M.Y. Lobanov, A.S. Kazakov, M. Kellermayer, Z. Mártonfalvi, O.V. Galzitskaya, I.M. Vikhlyantsev // Int. J. Mol. Sci. – 2023. – V. 24, №2. – P. 1056. doi: 10.3390/ijms24021056.

84. Bobyleva, L.G. Myosin Binding Protein-C Forms Amyloid-Like Aggregates *In Vitro*./ L.G. Bobyleva, S.A. Shumeyko, E.I. Yakupova, A.K. Surin, O.V. Galzitskaya, H. Kihara, A.A. Timchenko, M.A. Timchenko, N.V. Penkov, A.D. Nikulin, M.Y. Suvorina, N.V. Molochkov, M.Y. Lobanov, R.S. Fadeev, I.M. Vikhlyantsev, A.G. Bobylev // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – V. 22, №2. – P. 731. doi: 10.3390/ijms22020731.

85. Bobyleva, L.G. The Pathway of Amyloid Aggregation of Titin./ L.G. Bobyleva, T.A. Uryupina, M.A. Timchenko, S.N. Udaltsov, I.M. Vikhlyantsev, A.G. Bobylev // Biophysics. – 2023a. – V. 68, №6. – P. 1085-1091. doi: 10.1134/S0006350923060039.

86. Bobyleva, L.G. The Peculiarities of Oligomerization of Smooth Muscle Titin and Skeletal Muscle Myosin-Binding Protein C./ L.G. Bobyleva, M.A. Timchenko, E.I.

Yakupova, I.M. Vikhlyantsev, A.G. Bobylev // Biophysics. – 2023b. – V. 68, №3. – P. 365-368. doi: 10.1134/S0006350923030041.

87. Boll, B. Extensive chemical modifications in the primary protein structure of IgG1 subvisible particles are necessary for breaking immune tolerance./ B. Boll, J. Bessa, E. Folzer, A.R. Quiroz, R. Schmidt, P. Bulau, C. Finkler, H.C. Mahler, J. Huwyler, A. Iglesias, A.V. Koulov // Mol. Pharm. – 2017. – V. 14, №4. – P. 1292-1299. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00816.

88. Borgia, M.B. A mechanistic model for amorphous protein aggregation of immunoglobulin-like domains./ M.B. Borgia, A.A. Nickson, J. Clarke, M.J. Hounslow // J. Am. Chem. Soc. – 2013. – V. 135, №17. – P. 6456-6464. doi: 10.1021/ja308852b.

89. Borgia, A. Transient misfolding dominates multidomain protein folding./ A. Borgia, K.R. Kemplen, M.B. Borgia, A. Soranno, S. Shammas, B. Wunderlich, D. Nettels, R.B. Best, J. Clarke, B. Schuler // Nat. Commun. – 2015. – V. 6, – P. 8861. doi: 10.1038/ncomms9861.

90. Borwankar, A.U. Tunable equilibrium nanocluster dispersions at high protein concentrations./ A.U. Borwankar, A.K. Dinin, J.R. Laber, A. Twu, B.K. Wilson, J.A. Maynard, T.M. Truskett, K.P. Johnston // Soft Matter. – 2013. – V. 9, – P. 1766-1771. doi: 10.1039/C2SM27480A

91. Borzova, V.A. Kinetic regime of dithiothreitol-induced aggregation of bovine serum albumin./ V.A. Borzova, K.A. Markossian, D.A. Kara, B. Kurganov V.A. Borzova, K.A. Markossian, D.A. Kara, B. Kurganov // Int. J. Biol. Macromol. – 2015. – V. 80, – P. 130-138. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.06.040.

92. Bouchard, M. Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy./ M. Bouchard, J. Zurdo, E.J. Nettleton, C.M. Dobson C.V. Robinson // Protein Sci. – 2000. – V. 9, – P. 1960-1967. doi: 10.1110/ps.9.10.1960.

93. Bourassa, P. Beta-amyloid pathology in human brain microvessel extracts from the parietal cortex: relation with cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease./ P. Bourassa, C. Tremblay, J.A. Schneider, D.A. Bennett, F. Calon // Acta Neuropathol. – 2019. – V. 137, №5. – P. 801-823. doi: 10.1007/s00401-019-01967-4.

94. Breydo, L. Effects of polymer hydrophobicity on protein structure and aggregation kinetics in crowded milieu./ L. Breydo, A.E. Sales, T. Frege, M.C. Howell, B.Y. Zaslavsky, V.N. Uversky // Biochemistry. – 2015. – V. 54, №19. – P. 2957-2966. doi: 10.1021/acs.biochem.5b00116.

95. Bromley, E.H. Mechanisms of structure formation in particulate gels of β-lactoglobulin formed near the isoelectric point./ E.H. Bromley, M.R. Krebs, A.M. Donald, // Eur. Phys. J. E Soft Matter. – 2006. – V. 21, №2, – P. 145-152. doi: 10.1140/epje/i2006-10055-7.

96. Brubaker, W.D. Separating instability from aggregation propensity in gamma S-crystallin variants./ W.D. Brubaker, J.A. Freites, K.J. Golchert, R.A. Shapiro, V. Morikis, D.J. Tobias, R.W. Martin // Biophys. J. – 2011. – V. 100, №2. – P. 498-506. doi: 10.1016/j.bpj.2010.12.3691.

97. Brummitt, R.K. Nonnative aggregation of an IgG1 antibody in acidic conditions: Part 1. Unfolding, colloidal interactions, and formation of high-molecular-weight aggregates./ R.K. Brummitt, D.P. Nesta, L. Chang, S.F. Chase, T.M. Laue, C.J. Roberts // J. Pharm. Sci. – 2011a. – V. 100, №6. – P. 2087-2103. doi: 10.1002/jps.22448.

98. Brummitt, R.K. Nonnative aggregation of an IgG1 antibody in acidic conditions, part 2: Nucleation and growth kinetics with competing growth mechanisms./ R.K. Brummitt, D.P. Nesta, L. Chang, A.M. Kroetsch, C.J. Roberts // J. Pharm. Sci. – 2011b. – V. 100, №6. – P. 2104-2119. doi: 10.1002/jps.22447.

99. Brunsteiner, M. Structure based descriptors for the estimation of colloidal interactions and protein aggregation propensities./ M. Brunsteiner, M. Flock, B. Nidetzky // PLoS One. – 2013. – V.8, №4. e59797. doi: 10.1371/journal.pone.0059797.

100. Brych, S.R. Characterization of antibody aggregation: role of buried, unpaired cysteines in particle formation./ S.R. Brych, Y.R. Gokarn, H. Hultgen, R.J. Stevenson, R. Rajan, M. Matsumura S.R. Brych, Y.R. Gokarn, H. Hultgen, R.J. Stevenson, R. Rajan, M. Matsumura // J. Pharm. Sci. – 2010. – V. 99, №2. – P. 764-781. doi: 10.1002/jps.21868.

101. Buchanan, L.E. Mechanism of IAPP amyloid fibril formation involves an intermediate with a transient beta-sheet./ L.E. Buchanan, E.B. Dunkelberger, H.Q. Tran,

P.N. Cheng, C.C. Chiu, P. Cao, D.P. Raleigh, J.J. de Pablo, J.S. Nowick, M.T. Zanni // Proc. Natl. Acad. .Sci. U.S.A. – 2013. – V. 110, №48. – P. 19285-19290. doi: 10.1073/pnas.1314481110.

102. Buck, P.M. On the role of aggregation prone regions in protein evolution, stability, and enzymatic catalysis: insights from diverse analyses./ P.M. Buck, S. Kumar, S.K. Singh // PLoS Comput. Biol. – 2013a. – V. 9, №10. e1003291. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003291.

103. Buck, P.M. Consequences of glycan truncation on Fc structural integrity./ P.M. Buck, S. Kumar, S.K. Singh // Mabs. – 2013b. – V. 5, №6. –P. 904-916. doi: 10.4161/mabs.26453.

104. Buell, A.K. Electrostatic effects in filamentous protein aggregation./ A.K. Buell, P. Hung, X. Salvatella, M.E. Welland, C.M. Dobson, T.P. Knowles // Biophys. J. – 2013. – V. 104, №5. – P. 1116-1126. doi: 10.1016/j.bpj.2013.01.031.

105. Buell, A.K. Detailed analysis of the energy barriers for amyloid fibril growth./ A.K. Buell, A. Dhulesia, D.A. White, T.P. Knowles, C.M. Dobson, M.E. Welland // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. – 2012. – V. 51. №21 P. 5247-5251. doi: 10.1002/anie.201108040.

106. Buell, A.K. Solution conditions determine the relative importance of nucleation and growth processes in alpha-synuclein aggregation./ A.K. Buell, C. Galvagnion, R. Gaspar, E. Sparr, M. Vendruscolo, T.P. Knowles, S. Linse, C.M. Dobson // Proc. Natl. Acad .Sci. U.S.A. – 2014. –V. 111, №21. – P. 7671-7676. doi: 10.1073/pnas.1315346111.

107. Burkoth T.S. Structure of the β-Amyloid(10-35) Fibril./ T.S. Burkoth, T.L.S. Benzinger, V. Urban, D.M. Morgan, D.M. Gregory, P. Thiyagarajan, R.E. Botto, S.C. Meredith, D.G. Lynn // J. Am. Chem. Soc. – 2000. – V. 122, №33. – P. 7883-7889. doi: 10.1021/ja000645z.

108. Butko, P. Spectroscopic evidence for amyloid-like interfacial self-assembly of hydrophobin Sc3./ P. Butko, J.P. Buford, J.S. Goodwin, P.A. Stroud, C.L. McCormick, G.C. Cannon // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2001. – V. 280, №1. – P. 212–215. doi: 10.1006/bbrc.2000.4098.

109. Buxbaum, J.N. A molecular history of the amyloidosis./ J.N. Buxbaum, R.P. Linke, // J. Mol. Biol. – 2000. – V. 421, №2-3. – P. 142-159. doi: 10.1016/j.jmb.2012.01.024.

110. Buxbaum, J.N. Amyloid nomenclature 2022: update, novel proteins, and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) Nomenclature Committee./ J.N. Buxbaum, A. Dispenzieri, D.S. Eisenberg, M. Fändrich, G. Merlini, M.J. Saraiva, Y. Sekijima, P. Westermark // Amyloid. – 2022. – V. 29, №4. – P. 213-219. doi: 10.1080/13506129.2022.2147636.

111. Buyandelger, B. Genetics of mechanosensation in the heart./ B. Buyandelger, K.E. Ng, S. Miocic, S. Gunkel, I. Piotrowska, C.H. Ku, R. Knöll // J. Cardiovasc. Transl. Res. – 2011. – V. 4. №3. – P. 238-244. doi: 10.1007/s12265-011-9262-6.

112. Cabra, V. The effect of sulfhydryl groups and disulphide linkage in the thermal aggregation of Z19 alpha-zein./ V. Cabra, E. Vazquez-Contreras, A. Moreno, R. Arreguin-Espinosa // Biochim. Biophys. Acta. – 2008. – V. 1784, №7-8. –P. 1028-1036. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.04.002.

113. Calero, M. Fourier transform infrared and circular dichroism spectroscopies for amyloid studies./ M. Calero M. Gasset // Methods Mol. Biol. – 2005. – V. 299, – P. 129-151. doi: 10.1385/1-59259-874-9:129.

114. Calero-Rubio, C. Predicting protein-protein interactions of concentrated antibody solutions using dilute solution data and coarse-grained molecular models./ C. Calero-Rubio, R. Ghosh, A. Saluja, C.J. Roberts // J. Pharm. Sci. – 2018. – V. 107, №5. – P. 1269-1281. doi: 10.1016/j.xphs.2017.12.015.

115. Campioni, S. Salt anions promote the conversion of HypF-N into amyloid-like oligomers and modulate the structure of the oligomers and the monomeric precursor state./ S. Campioni, B. Mannini, J.P. Lopez-Alonso, I.N. Shalova, A. Penco, E. Mulvihill, D.V. Laurents, A. Relini, F. Chiti // J. Mol. Biol. – 2012. – V. 424, №3-4. – P. 132-149. doi: 10.1016/j.jmb.2012.09.023

116. Cao, X. Free fatty acid particles in protein formulations, Part 1: microspectroscopic identification./ X. Cao, R.M. Fesinmeyer, C.J. Pierini, C.C. Siska, J.R.

Litowski, S. Brych, Z.Q. Wen, G.R. Kleemann // J. Pharm. Sci. – 2015. – V. 104, №2. – P. 433-446. doi: 10.1002/jps.24126.

117. Cardinaux, F. Cluster-driven dynamical arrest in concentrated lysozyme solutions./ F. Cardinaux, E. Zaccarelli, A. Stradner, S. Bucciarelli, B. Farago, S.U. Egelhaaf, F. Sciortino, P. // J. Phys. Chem. B. – 2011. – V. 115, №22. – P. 7227-7237. doi: 10.1021/jp112180p.

118. Carre, A. How substrate properties control cell adhesion. A physical–chemical approach./ A. Carre, V. Lacarriere // J. Adhes. Sci. Technol. – 2010. – V. 24, №5. – P. 815-830. doi: 10.1163/016942409X12598231567862.

119. Casaz, P. Resolving self-association of a therapeutic antibody by formulation optimization and molecular approaches./ P. Casaz, E. Boucher, R. Wollacott, B.G. Pierce, R. Rivera, M. Sedic, S. Ozturk, W. Thomas, Y. Wang // MAbs. – 2014. – V. 6, №6. P. 1533-1539. doi: 10.4161/19420862.2014.975658.

120. Cereghetti, G. Reversible, functional amyloids: towards an understanding of their regulation in yeast and humans./ G. Cereghetti, S. Saad, R. Dechant, M. Peter // Cell Cycle. – 2018. – V. 17, №13. – P. 1545-1558. doi: 10.1080/15384101.2018.1480220.

121. Cervantes, S. Identification and Structural Characterization of the N-terminal Amyloid Core of Orb2 isoform A./ Cervantes, S. Bajakian, T. Soria, M. Falk, A.S. Service, R.J. Langen, R. Siemer, A.B. // Sci. Rep. – 2016. – V. 6, – P. 38265. doi: 10.1038/srep38265.

122. Chandrasekhar, S. Thiol-disulfide exchange in peptides derived from human growth hormone./ S. Chandrasekhar, D.E. Epling, A.M. Sophocleous, E.M. Topp // J. Pharm. Sci. – 2014. – V. 103, №4. – P. 1032-1042. doi: 10.1002/jps.23906.

123. Chapman, M.R. Role of Escherichia coli curli operons in directing amyloid fiber formation. / M.R. Chapman, L.S. Robinson, J.S. Pinkner, R. Roth, J. Heuser, M. Hammar, S. Normark, S.J. Hultgren, // Science. – 2002. – V. 295, №5556. – P. 851-855. doi: 10.1126/science.1067484.

124. Chatani, E. Early aggregation preceding the nucleation of insulin amyloid fibrils as monitored by small angle X-ray scattering./ E. Chatani, R. Inoue, H. Imamura,

M. Sugiyama, M. Kato, M. Yamamoto K. Nishida, T. Kanaya // Sci. Rep. – 2015. – V. 5, – P. 15485 doi: 10.1038/srep15485.

125. Chavez, B.K. Improved Stability of a Model IgG3 by DoE-Based Evaluation of Buffer Formulations./ B.K. Chavez, C.D. Agarabi, E.K. Read, M.T. Boyne, M.A. Khan, K.A. Brorson // Biomed Res. Int. – 2016. – V. 2016, – P. 2074149. doi: 10.1155/2016/2074149.

126. Chaudhri, A. The role of amino acid sequence in the self-association of therapeutic monoclonal antibodies: insights from coarse-grained modeling./ A. Chaudhri, I.E. Zarraga, S. Yadav, T.W. Patapoff, S.J. Shire, G.A. Voth // J. Phys. Chem. B. – 2013. – V. 117, №5. – P. 1269-1279. doi: 10.1021/jp3108396.

127. Chen, Z. Slow skeletal muscle myosin-binding protein-C (MyBPC1) mediates recruitment of muscle-type creatine kinase (CK) to myosin./ Z. Chen, T.J. Zhao, J. Li, Y.S. Gao, F.G. Meng, Y.B. Yan, H.M. Zhou // Biochem. J. – 2011. – V. 436, №2. – P. 437-445. doi: 10.1042/BJ20102007.

128. Chen, C.H. Influence of trehalose on human islet amyloid polypeptide fibrillation and aggregation./ C.H. Chen, T. Yao, Q. Zhang, Y.M. He, L.H. Xu, M. Zheng, G.R. Zhou, Y. Zhang, H.J. Yang, P. Zhou // RSC Adv. – 2016. – V. 6, – P. 15240-15246. doi: 10.1039/C5RA27689F.

129. Cheng, W. Hydrogen peroxide induced protein oxidation during storage and lyophilization process./ W. Cheng, X. Zheng, M. Yang // J. Pharm. Sci. – 2016. – V. 105, №6. – P. 1837-1842. doi: 10.1016/j.xphs.2016.03.034.

130. Chennamsetty, N. Design of therapeutic proteins with enhanced stability./ N. Chennamsetty, V. Voynov, V. Kayser, B. Helk, B.L. Trout // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2009b. – V. 106, №29. – P. 11937-11942. doi: 10.1073/pnas.0904191106.

131. Chennamsetty, N. Aggregation-prone motifs in human immunoglobulin G./ N. Chennamsetty, B. Helk, V. Voynov, V. Kayser, B.L. Trout // J. Mol. Biol. – 2009a. – V. 391, №2. – P. 404-413. doi: 10.1016/j.jmb.2009.06.028.

132. Cherny, I. The formation of Escherichia coli curli amyloid fibrils is mediated by prion-like peptide repeats./ I. Cherny, L. Rockah, O. Levy-Nissenbaum, U. Gophna,

E.Z. Ron, E. Gazit // J. Mol. Biol. – 2005. – V. 352, №2. – P. 245-252. doi: 10.1016/j.jmb.2005.07.028.

133. Chi, R.J. Smooth muscle titin Zq domain interaction with the smooth muscle alpha-actinin central rod./ R.J. Chi, A.R. Simon, E.A. Bienkiewicz, A. Felix, T.C. Keller 3rd. // J. Biol. Chem. – 2008. – V. 283, №30. – P. 20959-20967. doi: 10.1074/jbc.M709621200.

134. Chi, R.J. Smooth muscle alpha-actinin interaction with smitin./ R.J. Chi, S.G. Olenych, K. Kim, T.C. Keller 3rd. // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2005. – V. 37, №7. – P. 1470-1482. doi: 10.1016/j.biocel.2005.02.014.

135. Chiti, F. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease./ F. Chiti, C.M. Dobson // Annu. Rev. Biochem. – 2006. – V. 75, – P. 333-366. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901.

136. Chiti, F. Amyloid formation by globular proteins under native conditions./ F. Chiti, C.M. Dobson // Nat. Chem. Biol. – 2009. – V. 5, №1. – P. 15-22. doi: 10.1038/nchembio.131.

137. Chiti, F. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade./ F. Chiti, C.M. Dobson // Annu. Rev. Biochem. – 2017. – V. 86, – P. 27-68. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-045115

138. Claessen, D. A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in Streptomyces coelicolor by forming amyloid-like fibrils./ D. Claessen, R. Rink, W. de Jong, J. Siebring, P. de Vreughd, F.G. Boersma, L. Dijkhuizen, H.A. Wçsten // Genes Dev. – 2003. – V. 17, – №14. P. 1714-1726. doi: 10.1101/gad.264303.

139. Clarke, J. Folding studies of immunoglobulin-like beta-sandwich proteins suggest that they share a common folding pathway./ J. Clarke, E. Cota, S.B. Fowler, S.J. Hamill // Structure. – 1999. – V. 7, №9. – P. 1145-1153 doi: 10.1016/s0969-2126(99)80181-6.

140. Crespo, R. What can the kinetics of amyloid fibril formation tell about off-pathway aggregation?/ R. Crespo, E. Villar-Alvarez, P. Taboada, F.A. Rocha, A.M.

Damas, P.M. Martins // J. Biol. Chem. – 2016. – V. 291, – P. 2018-2032. doi: 10.1074/jbc.M115.699348.

141. Cohen, S.I. Proliferation of amyloid-β42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism./ S.I. Cohen, S. Linse, L.M. Luheshi, E. Hellstrand, D.A. White, L. Rajah, D.E. Otzen, M. Vendruscolo, C.M. Dobson, T.P. Knowles // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2013. – V. 110, №24. – P. 9758-9763. doi: 10.1073/pnas.1218402110.

142. Cola, E.D. Persistence Length of Titin from Rabbit Skeletal Muscles Measured with Scattering and Microrheology Techniques./ E.D. Cola, T.A. Waigh, J. Trinick, L. Tskhovrebova, A. Houmeida, W. Pyckhout-Hintzen, C. Dewhurst // Biophys. J. – 2005. – V. 88. – №6. – P. 4095-4106. doi: 10.1529/biophysj.104.054908.

143. Colletier, J.P. Molecular basis for amyloid-beta polymorphism./ J.P. Colletier, A. Laganowsky, M. Landau, M. Zhao, A.B. Soriaga, L. Goldschmidt, D. Flot, D. Cascio, M.R. Sawaya, D. Eisenberg // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2011. – V. 108, №41. – P. 16938-16943. doi: 10.1073/pnas.1112600108.

144. Connolly, B.D. Protein Aggregation in Frozen Trehalose Formulations: Effects of Composition, Cooling Rate, and Storage Temperature./ B.D. Connolly, L. Le, T.W. Patapoff, M.E.M. Cromwell, J.M.R. Moore, P. Lam // J. Pharm. Sci. – 2015. – V. 104, №12, – P. 4170-4184. doi: 10.1002/jps.24646.

145. Cordes, A.A. Accelerated stability studies of abatacept formulations: comparison of freeze-thawing- and agitation-induced stresses./ A.A. Cordes, J.F. Carpenter, T.W. Randolph // J. Pharm. Sci. – 2012. – V. 101, №7. – P. 2307-2315. doi: 10.1002/jps.23150.

146. Cui, M. Modular genetic design of multi-domain functional amyloids: insights into self-assembly and functional properties./ M. Cui, Q. Qi, T. Gurry, T. Zhao, B. An, J. Pu, X. Gui, A.A. Cheng, S. Zhang, D. Xun, M. Becce, F. Briatico-Vangosa, C. Liu, T.K. Lu, C. Zhong // Chem. Sci. – 2019. – V. 10, №14. – P. 4004-4014. doi: 10.1039/c9sc00208a.

147. Czeslik, C. Salt-induced protein resistance of polyelectrolyte brushes studied using fluorescence correlation spectroscopy and neutron reflectometry./ C. Czeslik, G.

Jackler, T. Hazlett, E. Gratton, R. Steitz, A. Wittemann, M. Ballauff // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2004. – V. 6, – P. 5557-5563. doi: 10.1039/B410805A.

148. Daggett, V. Is there a unifying mechanism for protein folding?/ V. Daggett, A.R. Fersht // Trends Biochem. Sci. – 2003. – V. 28, №1. – P. 18-25. doi: 10.1016/s0968-0004(02)00012-9.

149. Dahal, E. Structural evaluation of an amyloid fibril model using small-angle x-ray scattering./ Dahal E., Choi M., Alam N., Bhirde A.A., Beaucage S.L. Badano A. // Phys. Biol. – 2017. – V. 14, №4. 046001 doi: 10.1088/1478-3975/aa776a.

150. Dalsin, J.L. Mussel adhesive protein mimetic polymers for the preparation of nonfouling surfaces./ J.L. Dalsin, B.H. Hu, B.P. Lee, P.B. Messersmith // J. Am. Chem. Soc. – 2003. – V. 125, №14. – P. 4253-4258. doi: 10.1021/ja0284963

151. Dang, Y. Biocompatible and antifouling coating of cell membrane phosphorylcholine and mussel catechol modified multi-arm PEGs./ Y. Dang, M. Quan, C.M. Xing, Y.B. Wang, Y.K. Gong // J. Mater. Chem. B. – 2015. – V. 3, №11. – P. 2350-2361. doi: 10.1039/c4tb02140a.

152. Daniels, A.L. Flow microscopy imaging is sensitive to characteristics of subvisible particles in peginesatide formulations associated with severe adverse reactions./ A.L. Daniels, T.W. Randolph // J. Pharm. Sci. – 2018. – V. 107, №5. –P. 1313-1321. doi: 10.1016/j.xphs.2018.01.015.

153. de Genst E. Antibodies and protein misfolding: from structural research tools to therapeutic strategies./ E. de Genst, A. Messer C.M. Dobson // Biochim. Biophys. Acta. –2014 – V. 1844, №11. – P. 1907-1919. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.08.016.

154. de Genst E. Nanobodies as structural probes of protein misfolding and fibril formation./ E. de Genst, C.M. Dobson // Methods Mol. Biol. – 2012. – V. 911, – P. 533-558. doi: 10.1007/978-1-61779-968-6_34.

155. de Jongh, H.H. Mild isolation procedure discloses new protein structural properties of β-lactoglobulin./ H.H. de Jongh, T. Gröneveld, J. de Groot // J. Dairy Sci. – 2001. – V. 84, №3. – P. 562-571. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74508-0.

156. de Vocht, M.L. Structural and functional role of the disulfide bridges in the hydrophobin SC3./ M.L. de Vocht, I. Reviakine, H.A. Wösten, A. Brisson, J.G. Wessels, G.T. Robillard // J. Biol. Chem. – 2000. – V. 275, №37. – P. 28428-28432. doi: 10.1074/jbc.M000691200.

157. Dekel, Y. Formation of multimeric antibodies for self-delivery of active monomers./ Y. Dekel, Y. Machluf, T. Gefen, G. Eidelshtein, A. Kotlyar, Y. Bram, E. Shahar, F. Reslane, E. Aizenshtein, J. Pitcovski // Drug Deliv. – 2017. – V. 24, №1. – P. 199-208. doi: 10.1080/10717544.2016.1242179.

158. Delahaije, R. Comparison of heat-induced aggregation of globular proteins./ R. Delahaije, P.A. Wierenga, M.L.F. Giuseppin, H. Gruppen // J. Agric. Food. Chem. – 2015. – V. 63, №21. – P. 5257-5265. doi: 10.1021/acs.jafc.5b00927.

159. Dengl, S. Aggregation and chemical modification of monoclonal antibodies under upstream processing conditions./ S. Dengl, M. Wehmer, F. Hesse, F. Lipsmeier, O. Popp, K. Lang // Pharm. Res. – 2013. – V. 30, №5. – P. 1380-1399. doi: 10.1007/s11095-013-0977-8.

160. Desai, K.G. Impact of manufacturing-scale freeze-thaw conditions on a mAb solution./ K.G. Desai, W.A. Pruett, P.J. Martin, J.D. Colandene, D.P. Nesta // BioPharm International. – 2017. – V. 30, №2. – P. 30-36.

161. Dicko, C. Structural Conformation of Spidroin in Solution: A Synchrotron Radiation Circular Dichroism Study./ C. Dicko, D. Knight, J.M. Kenney, F. Vollrath // Biomacromolecules. – 2004. – V. 5, №3. – P. 758-767. doi: 10.1021/bm034373e.

162. Dill, K.A. Dominant forces in protein folding./ K.A. Dill // Biochemistry. – 1990. –V. 29, №31. – P. 7133-7155. doi: 10.1021/bi00483a001.

163. Dill, K.A. From Levinthal to pathways to funnels./ K.A. Dill, H.S. Chan // Nat. Struct. Biol. – 1997. – V. 4, №1. – P. 10-19. doi: 10.1038/nsb0197-10.

164. Dobson, C.M. Protein folding and misfolding./ C.M. Dobson // Nature. – 2003. – V. 426, №6968. – P. 884-890. doi: 10.1038/nature02261.

165. Dobson, C.M. Experimental investigation of protein folding and misfolding./ C.M. Dobson // Methods. – 2004a. – V. 34, №1. – P. 4-14. doi: 10.1016/j.ymeth.2004.03.002.

166. Dobson, C.M. Principles of protein folding, misfolding and aggregation./ C.M. Dobson // Semin. Cell Dev. Biol. – 2004b. – V. 15, №1. – P. 3-16. doi: 10.1016/j.semcdb.2003.12.008.

167. Dogra, P. pH-Responsive mechanistic switch regulates the formation of dendritic and fibrillar nanostructures of a functional amyloid./ P. Dogra, M. Bhattacharya, S. Mukhopadhyay // J. Phys. Chem. B. – 2017. – V. 121, №2. – P. 412-419. doi: 10.1021/acs.jpcb.6b11281.

168. Donato, L. Mixtures of whey protein microgels and soluble aggregates as building blocks to control rheology and structure of acid induced cold-set gels./ L. Donato, E. Kolodziejcyk, M. Rouvet // Food Hydrocolloids. – 2011. – V. 25, №4. – P. 734-742. doi: 10.1016/j.foodhyd.2010.08.020

169. Dovidchenko, N.V. How to determine the size of folding nuclei of protofibrils from the concentration dependence of the rate and lag-time of aggregation. I. Modeling the amyloid protofibril formation./ N.V. Dovidchenko, A.V. Finkelstein, O.V. Galzitskaya // J. Phys. Chem. B. – 2014. – V. 118, №5. – P. 1189-1197. doi: 10.1021/jp4083294.

170. Dos Reis, S. The HET-s prion protein of the filamentous fungus Podospora anserina aggregates *in vitro* into amyloid-like fibrils./ S. Dos Reis, B. Coulary-Salin, V. Forge, I. Lascu, J. Bégueret, S.J. Saupe // J. Biol. Chem. – 2002. – V. 277, №8. – P. 5703-5706. doi: 10.1074/jbc.M110183200.

171. Dowling, D.P. Effect of surface wettability and topography on the adhesion of osteosarcoma cells on plasma-modified polystyrene./ D.P. Dowling, I.S. Miller, M. Ardhaoui, W.M. Gallagher // J. Biomater. Appl. – 2011. – V. 26, – P. 327-347. doi: 10.1177/0885328210372148.

172. Doyle, S.M. Protein rescue from aggregates by powerful molecular chaperone machines./ S.M. Doyle, O. Genest, S. Wickner // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2013. – V. 14, №10. – P. 617-629. doi: 10.1038/nrm3660.

173. Du, Z. Newly identified prion linked to the chromatin-remodeling factor Swi1 in Saccharomyces cerevisiae./ Z. Du, K.W. Park, H. Yu, Q. Fan, L. Li // Nat. Genet. – 2008. – V. 40, №4. – P. 460-465. doi: 10.1038/ng.112.

174. Du, C. Protection of therapeutic antibodies from visible light induced degradation: use safe light in manufacturing and storage./ C. Du, G. Barnett, A. Borwankar, A. Lewandowski, N. Singh, S. Ghose, M. Borys, Z.J. Li // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2018. – V. 127, – P. 37-43. doi: 10.1016/j.ejpb.2018.02.007.

175. Dumoulin, M. Probing the origins, diagnosis and treatment of amyloid diseases using antibodies./ M. Dumoulin, C.M. Dobson // Biochimie. – 2004. – V. 86, – P. 589-600 doi: 10.1016/j.biochi.2004.09.012.

176. Eanes, E.D. X-ray diffraction studies on amyloid filaments./ E.D. Eanes, G.G. Glenner // J. Histochem. Cytochem. – 1968. – V. 16, №11. – P. 673-677. doi: 10.1177/16.11.673.

177. Eckels, E.C. The mechanical power of titin folding./ E.C. Eckels, S. Haldar, R. Tapia-Rojo, J.A. Rivas-Pardo, J.M. Fernández // Cell Rep. – 2019. – V. 27, №6. – P. 1836-1847.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2019.04.046.

178. Eichner, T. A diversity of assembly mechanisms of a generic amyloid fold./ T. Eichner, S.E. Radford // Mol. Cell. – 2011. – V. 43, №1. – P. 8-18. doi: 10.1016/j.molcel.2011.05.012.

179. Eisenberg, D. The amyloid state of proteins in human diseases./ D. Eisenberg, M. Jucker // Cell. – 2012. – V. 148. №6. – P. 1188-1203. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.022

180. Eisenberg, D.S. Structural studies of amyloid proteins at the molecular level./ D.S. Eisenberg, M.R. Sawaya // Annu. Rev. Biochem. – 2017. – V. 86, – P. 69-95. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-045104.

181. Elghetany, M.T. Methods for staining amyloid in tissues: a review./ M.T. Elghetany, A. Saleem // Stain Technol. – 1988. – V. 63, – P. 201-212. doi: 10.3109/10520298809107185.

182. Engel, M.F. Membrane damage by human islet amyloid polypeptide through fibril growth at the membrane./ M.F. Engel, L. Khemtémourian, C.C. Kleijer, H.J. Meeldijk, J. Jacobs, A.J. Verkleij, B. de Kruijff, J.A. Killian, J.W. Höppener // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2008. – V. 105, №16. – P. 6033-6038. doi: 10.1073/pnas.0708354105.

183. Erickson, H.P. Reversible unfolding of fibronectin type III and immunoglobulin domains provides the structural basis for stretch and elasticity of titin and fibronectin./ H.P. Erickson // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1994. – V. 91, №21. – P. 10114-10118. doi: 10.1073/pnas.91.21.10114.

184. Erickson, H.P. Stretching single protein molecules: titin is a weird spring./ H.P. Erickson // Science. – 1997. – V. 276, №5315. – P. 1090-1092. doi: 10.1126/science.276.5315.1090.

185. Erlich, P. Complement protein C1q forms a complex with cytotoxic prion protein oligomers./ P. Erlich, C. Dumestre-Pérard, W.L. Ling, C. Lemaire-Vieille, G. Schoehn, G.J. Arlaud, N.M. Thielens, J. Gagnon, J.Y. Cesbron. // J. Biol. Chem. – 2010. – V. 285, №25. – P. 19267-19276 doi: 10.1074/jbc.M109.071860.

186. Esfandiary, R. A systematic multitechnique approach for detection and characterization of reversible self-association during formulation development of therapeutic antibodies./ R. Esfandiary, D.B. Hayes, A. Parupudi, J. Casas-Finet, S. Bai, H.S. Samra, A.U. Shah, H.A. Satish // J. Pharm. Sci. – 2013. – V. 102, №1. – P. 62-72. doi: 10.1002/jps.23369.

187. Esfandiary, R. Mechanism of reversible self-association of a monoclonal antibody: role of electrostatic and hydrophobic interactions./ R. Esfandiary, A. Parupudi, J. Casas-Finet, D. Gadre, H. // J. Pharm. Sci. – 2015. – V. 104, №2. – P. 577-586. doi: 10.1002/jps.24237.

188. Esparza, T.J. Soluble amyloid-beta aggregates from human Alzheimer's disease brains./ T.J. Esparza, N.C. Wildburger, H. Jiang, M. Gangolli, N.J. Cairns, R.J. Bateman D.L. Brody // Sci. Rep. – 2016. – V. 6, – P. 38187. doi:10.1038/srep38187.

189. Faghihi, H. The use of amino acids to prepare physically and conformationally stable spray-dried IgG with enhanced aerosol performance./ H. Faghihi,

A. Vatanara, A.R. Najafabadi, V. Ramezani, K. Gilani // Int. J. Pharm. – 2014. – V. 466, №1-2. – P. 163-171. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.03.020.

190. Fang, X.T. High detection sensitivity with antibody-based PET radioligand for amyloid beta in brain./ X.T. Fang, G. Hultqvist, S.R. Meier, G. Antoni, D. Sehlin, S. Syvänen // Neuroimage. – 2018. – V. 184, – P.881-888. doi: 10.1016/j.neuroimage.2018.10.011.

191. Fändrich, M. Recent progress in understanding Alzheimer's β-amyloid structures./ M. Fändrich, M. Schmidt, N. Grigorieff // Trends Biochem. Sci. – 2011. – V. 36, №6. – P. 338-345. doi: 10.1016/j.tibs.2011.02.002.

192. Fazeli, A. Effect of arginine on pre-nucleus stage of interferon beta-1b aggregation./ A. Fazeli, M. Haji-Abdolvahab, S.A. Shojaosadati, H. Schellekens, K. Khalifeh, A.A. Moosavi-Movahedi, M.R. Fazeli // AAPS PharmSciTech. – 2014. –V. 15, №6. – P. 1619-1629. doi: 10.1208/s12249-014-0192-x.

193. Feigin, L.A. Structure Analysis by Small-angle X-ray and Neutron Scattering./ L.A. Feigin, D.A. Svergun // in: G.W. Taylor (ed) Publisher Springer: New York, NY. – 1987. – P. 1-335. doi: 10.1007/978-1-4757-6624-0.

194. Ferreira, E. Searching for the Best Transthyretin Aggregation Protocol to Study Amyloid Fibril Disruption./ E. Ferreira, Z.L. Almeida, P.F. Cruz, E. Silva M. Sousa, P. Veríssimo, R.M.M. Brito // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – V. 23, №1. – P. 391. doi: 10.3390/ijms23010391.

195. Ferrera P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs attenuate amyloid-b protein-induced actin cytoskeletal reorganization through Rho signaling modulation./ P. Ferrera, A. Zepeda, C. Arias // Cell Mol. Neurobiol. – 2017. – V. 37, №7. P. 1311-1318. doi: 10.1007/s10571-017-0467-3.

196. Filipe, V. Immunogenicity of different stressed IgG monoclonal antibody formulations in immune tolerant transgenic mice./ V. Filipe, W. Jiskoot, A.H. Basmeleh, A. Halim, H. Schellekens, V. Brinks // MAbs, – 2012a. – V. 4, №6. – P. 740-752. doi: 10.4161/mabs.22066.

197. Filipe, V. Transient molten globules and metastable aggregates induced by brief exposure of a monoclonal IgG to low pH./ V. Filipe, B. Kükrer, A. Hawe, W. Jiskoot // J. Pharm. Sci. – 2012b. – V. 101, №7. – P. 2327-2339. doi: 10.1002/jps.23157.

198. Filipe, V. Detection and characterization of subvisible aggregates of monoclonal IgG in serum./ V. Filipe, R. Poole, O. Oladunjoye, K. Braeckmans, W. Jiskoot // Pharm. Res. – 2012c. – V. 29, №8. – P. 2202-2212. doi: 10.1007/s11095-012-0749-x.

199. Filipe, V. *In vivo* fluorescence imaging of IgG1 aggregates after subcutaneous and intravenous injection in mice./ V. Filipe, I. Que, J.F. Carpenter, C. Lowik, W. Jiskoot // Pharm. Res. – 2014. – V. 31, №1. – P. 216-227. doi: 10.1007/s11095-013-1154-9.

200. Fitzpatrick, A.W. Inversion of the balance between hydrophobic and hydrogen bonding interactions in protein folding and aggregation./ A.W. Fitzpatrick, T.P. Knowles, C.A. Waudby, M. Vendruscolo, C.M. Dobson // PLoS Comput. Biol. – 2011. – V. 7, №10. e1002169. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002169.

201. Fitzpatrick, A.W. Exceptional rigidity and biomechanics of amyloid revealed by 4D electron microscopy./ A.W. Fitzpatrick, S.T. Park, A.H. Zewail, // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2013a. – V. 110, №27. – P. 10976-10981. doi: 10.1073/pnas.1309690110.

202. Fitzpatrick, A.W. Atomic structure and hierarchical assembly of a cross-β amyloid fibril./ A.W. Fitzpatrick, G.T. Debelouchina, M.J. Bayro, D.K. Clare, M.A. Caporini, V.S. Bajaj, C.P. Jaroniec, L. Wang, V. Ladizhansky, S.A. Müller, C.E. MacPhee, C.A. Waudby, H.R. Mott, A. De Simone, T.P. Knowles, H.R. Saibil, M. Vendruscolo, E.V. Orlova, R.G. Griffin, C.M. Dobson // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2013b. – V. 110, №14. – P. 5468-5473. doi: 10.1073/pnas.121947611.

203. Fitzpatrick, A.W. Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease./ A.W. Fitzpatrick, B. Falcon, S. He, A.G. Murzin, G. Murshudov, H.J. Garringer, R.A. Crowther, B. Ghetti, M. Goedert, S.H. Scheres // Nature. – 2017. –V. 547, №7662. – P. 185-190. doi: 10.1038/nature23002

204. Flashman, E. Cardiac myosin binding protein C: its role in physiology and disease./ E. Flashman, C.Redwood, J. Moolman-Smook, H. Watkins // Circ. Res. – 2004. – V. 94, 1279-1289. doi: 10.1161/01.RES.0000127175.21818.C2.

205. Flodrova, P. Cardiac amyloidosis: from clinical suspicion to morphological diagnosis./ P. Flodrova, P. Flodr, T. Pika, J. Vymetal, D. Holub, P. Dzubak M. Hajduch, V. Scudla // Pathology. – 2018. – V. 50, №3. – P. 261-268. doi: 10.1016/j.pathol.2017.10.012.

206. Flores-Fernández, G.M. Moisture-induced solid state instabilities in alpha-chymotrypsin and their reduction through chemical glycosylation./ G.M. Flores-Fernández, M. Pagán, M. Almenas, R.J. Solá, K. Griebenow // BMC Biotech. – 2010. – V. 10, №57. doi: 10.1186/1472-6750-10-57.

207. Fomin, A. Truncated titin proteins and titin haploinsufficiency are targets for functional recovery in human cardiomyopathy due to *TTN* mutations./ A. Fomin, A. Gärtner, L. Cyganek, M. Tiburcy, I. Tuleta, L. Wellers, L. Folsche, A.J. Hobbach, M. von Frieling-Salewsky, A. Unger, A. Hucke, F. Koser, A. Kassner, K. Sielemann, K. Streckfuß-Bömeke, G. Hasenfuss, A. Goedel, K.L. Laugwitz, A. Moretti, J.F. Gummert, C.G. Dos Remedios, H. Reinecke, R. Knöll, S. van Heesch, N. Hubner, W.H. Zimmermann, H. Milting, W.A. Linke // Sci. Transl. Med. – 2021. – V. 13, №618. eabd3079. doi: 10.1126/scitranslmed.abd3079.

208. Fowler, D.M. Functional amyloid formation within mammalian tissue./ D.M. Fowler, A.V. Koulov, C. Alory-Jost, M.S. Marks, W.E. Balch, J.W. Kelly // PLoS Biol. – 2006. – V. 4, №1. e6. doi: 10.1371/journal.pbio.0040006.

209. Franchi N. Functional amyloidogenesis in immunocytes from the colonial ascidian Botryllus schlosseri: Evolutionary perspective./ N. Franchi, L. Ballarin, A. Peronato, F. Cima, A. Grimaldi, R. Girardello, M. de Eguileor // Dev. Comp. Immunol. – 2019. – V. 90, – P. 108-120. doi: 108-120. 10.1016/j.dci.2018.09.010.

210. Franke, D. DAMMIF, a program for rapid *ab-initio* shape determination in small-angle scattering./ D. Franke, D.I. Svergun // J. Appl. Crystallogr. – 2009. – V. 42, Pt. 2. – P. 342-346. doi: 10.1107/S0021889809000338.

211. Freiburg, A. A molecular map of the interactions between titin and myosin-binding protein C. Implications for sarcomeric assembly in familial hypertrophic cardiomyopathy./ A. Freiburg, M. Gautel // Eur. J. Biochem. – 1996. – V. 235, №1-2. – P. 317-323. doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.00317.x.

212. Freiburg, A. Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity./ A. Freiburg, K. Trombitas, W. Hell, O. Cazorla, F. Fougerousse, T. Centner, B. Kolmerer, C. Witt, J.S. Beckmann, C.C. Gregorio, H. Granzier, S. Labeit // Circ. Res. – 2000. – V. 86. №11. – P. 1114-1121. doi: 10.1161/01.res.86.11.1114.

213. Freitag, A.J. Investigation of the immunogenicity of different types of aggregates of a murine monoclonal antibody in mice./ A.J. Freitag, M. Shomali, S. Michalakis, M. Biel, M. Siedler, Z. Kaymakcalan, J.F. Carpenter, T.W. Randolph, G. Winter, J. Engert // Pharm. Res. – 2015. – V. 32, №2. – P. 430-444. doi: 10.1007/s11095-014-1472-6.

214. Frid, P. Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases./ P. Frid, S.V. Anisimov, N. Popovic // Brain Res. Rev. – 2007. – V. 53, – P. 135-160. doi: 10.1016/j.brainresrev.2006.08.001.

215. Fritz, J.D. Factors affecting polyacrylamide gel electrophoresis and electroblotting of high-molecular-weight myofibrillar proteins./ J.D. Fritz, D.R. Swartz, M.L. Greaser // Anal. Biochem. – 1989. – V. 180, P. 205-210. doi: 10.1016/0003-2697(89)90116-4.

216. Fukuda, M. Thermodynamic and fluorescence analyses to determine mechanisms of igg1 stabilization and destabilization by arginine./ M. Fukuda, D. Kameoka, T. Torizawa, S. Saitoh, M. Yasutake, Y. Imaeda, A. Koga, A. Mizutani // Pharm. Res. – 2014. – V. 31, №4. – P. 992-1001. doi: 10.1007/s11095-013-1221-2.

217. Fukuda, M. Small-scale screening method for low-viscosity antibody solutions using small-angle X-ray scattering./ M. Fukuda, A. Watanabe, A. Hayasaka, M. Muraoka, Y. Hori, T. Yamazaki, Y. Imaeda, A. Koga // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2017. – V. 112, – P. 132-137. doi: 10.1016/j.ejpb.2016.11.027.

218. Furst, D.O. Mammalian skeletal muscle C-protein: purification from bovine muscle, binding to titin and the characterization of a full-length human cDNA./ D.O. Furst, U. Vinkemeier, K. Weber // Journal of Cell Science. – 1992. – V. 102, Pt. 4. – P. 769-778. doi: 10.1242/jcs.102.4.769.

219. Gallardo, R. De novo design of a biologically active amyloid./ R. Gallardo, M. Ramakers, F. De Smet, F. Claes, L. Khodaparast, L. Khodaparast, J.R. Couceiro, T. Langenberg, M. Siemons, S. Nyström, L.J. Young, R.F. Laine, L. Young, E. Radaelli, I. Benilova, M. Kumar, A. Staes, M. Desager, M. Beerens, P. Vandervoort, A. Luttun, K. Gevaert, G. Bormans, M. Dewerchin, J. Van Eldere, P. Carmeliet, G. Vande Velde, C. Verfaillie, C.F. Kaminski, B. De Strooper, P. Hammarström, K.P. Nilsson, L. Serpell, J. Schymkowitz, F. Rousseau // Science. – 2016. – V. 354, №6313. aah4949. doi: 10.1126/science.aah4949.

220. Gallardo, R. Amyloid structures: much more than just a cross-β fold./ R. Gallardo, N.A. Ranson, S.E. Radford // Curr. Opin. Struct. Biol. – 2020. – V. 60, – P. 7-16. doi: 10.1016/j.sbi.2019.09.001.

221. Galm, L. Predictive approach for protein aggregation: Correlation of protein surface characteristics and conformational flexibility to protein aggregation propensity./ L. Galm, S. Amrhein, J. Hubbuch // Biotechnol. Bioengergy. – 2017. – V. 114, №6. – P. 1170-1183. doi: 10.1002/bit.25949.

222. Galvez, A.S. Cardiomyocyte degeneration with calpain deficiency reveals a critical role in protein homeostasis./ A.S. Galvez, A. Diwan, A.M. Odley, H.S. Hahn, H. Osinska, J.G. Melendez, J. Robbins, R.A. Lynch, Y. Marreez, G.W. 2nd. Dorn // Circ. Res. – 2007. – V. 100, №7. – P. 1071-1078. doi: 10.1161/01.RES.0000261938.28365.11.

223. Galvin J.E. Detection of aggregates and protein inclusions by staining of tissues./ J.E. Galvin // Methods Mol. Biol. – 2003. – V. 232, – P. 149-164. doi: 10.1385/1-59259-394-1:149.

224. Gandhi, A.V. Some lessons learned from a comparison between sedimentation velocity analytical ultracentrifugation and size exclusion chromatography to characterize and quantify protein aggregates./ A.V. Gandhi, M.R. Pothecary, D.L. Bain, J.F. Carpenter // J. Pharm. Sci. – 2017. – V. 106, №8. – P. 2178-2186. doi: 10.1016/j.xphs.2017.04.048.

225. Gautel, M. Cytoskeletal Protein Kinases: Titin and its Relations in Mechanosensing. Pflugers Arch./ M. Gautel // Eur. J. Physiol. – 2011a. – V. 462, №1. – P. 119-134. doi:10.1007/s00424-011-0946-1.

226. Gautel, M. The sarcomeric cytoskeleton: who picks up the strain?/ M. Gautel // Curr. Opin. Cell Biol. – 2011b. – V. 23, №1. – P. 39-46. doi: 10.1016/j.ceb.2010.12.001.

227. Gazit E. The "Correctly Folded" state of proteins: is it a metastable state?/ E. Gazit // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. – 2002. – V. 41, №2. – P. 257-259. doi: 10.1002/1521-3773(20020118)41:2<257::aid-anie257>3.0.co;2-m.

228. Geiger, B. Molecular architecture and function of matrix adhesions./ B. Geiger, K.M. Yamada // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2011. – V. 3, №5. a005033. doi: 10.1101/cshperspect.a005033.

229. Georgalis, Y. Huntingtin aggregation monitored by dynamic light scattering./ Y. Georgalis, E.B. Starikov, B. Hollenbach, R. Lurz, E. Scherzinger, W. Saenger H. Lehrach, E.E. Wanker // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1998. – V. 95, №11. – P. 6118-6121. doi: 10.1073/pnas.95.11.6118.

230. Gershenson, A. Energy landscapes of functional proteins are inherently risky./ A. Gershenson, L.M. Gierasch, A. Pastore, S.E. Radford // Nat. Chem. Biol. – 2014. – V. 10, – P. 884-891. doi: 10.1038/nchembio.1670.

231. Gertz, M.A. Immunoglobulin light chain amyloidosis: 2018 Update on diagnosis, prognosis, and treatment./ M.A. Gertz // Am. J. Hematol. – 2018. – V. 93, №9. – P. 1169-1180. doi: 10.1002/ajh.25149.

232. Gertz, M.A. Advances in the treatment of hereditary transthyretin amyloidosis: A review./ M.A. Gertz, M.L. Mauermann, M. Grogan, T. Coelho // Brain Behav. – 2019. – V. 9. №9. e01371. doi: 10.1002/brb3.1371.

233. Ghadami, S.A. Amyloid fibril formation by native and modified bovine beta-lactoglobulins proceeds through unfolded form of proteins: a comparative study./ S.A. Ghadami, R. Khodarahmi, S. Ghobadi, M. Ghasemi, S. Pirmoradi // Biophys. Chem. – 2011. – V. 159, №2-3. – P. 311-320. doi: 10.1016/j.bpc.2011.08.004.

234. Ghazvini, S. Evaluating the role of the air-solution interface on the mechanism of subvisible particle formation caused by mechanical agitation for an IgG1 mAb./ S. Ghazvini, C. Kalonia, D.B. Volkin, P. Dhar // J. Pharm. Sci. – 2016. – V. 105, №5. – P. 1643-1656. doi: 10.1016/j.xphs.2016.02.027.

235. Giannos, S.A. Formulation stabilization and disaggregation of bevacizumab, ranibizumab and aflibercept in dilute solutions./ S.A. Giannos, E.R. Kraft, Z.-Y. Zhao, K.H. Merkley, J. Cai // Pharm. Res. – 2018. – V. 35, №4. – P. 78. doi: 10.1007/s11095-018-2368-7.

236. Giganti, D. Disulfide isomerization re- actions in titin immunoglobulin domains enable a mode of protein elasticity./ D. Giganti, K. Yan, C.L. Badilla, J.M. Fernandez, J. Alegre-Cebollada // Nat. Commun. 2018. – V. 9, №1. – P. 185. 10.1038/s41467-017-02528-7.

237. Gilbert, R. The carboxyl terminus of myosin binding protein C (MyBP-C, C-protein) specifies incorporation into the A-band of striated muscle./ R. Gilbert, M.G. Kelly, T. Mikawa, D.A. Fischman // J. Cell Sci. 1996. – V. 109, Pt. 1. – P. 101-111. doi: 10.1242/jcs.109.1.101. PMID: 8834795.

238. Godfrin, P.D. Intermediate range order and structure in colloidal dispersions with competing interactions./ P.D. Godfrin, R. Castañeda-Priego, Y. Liu, N.J. Wagner // J. Chem. Phys. – 2013. – V. 139, №15. – P. 154904. doi: 10.1063/1.4824487.

239. Gokarn, Y.R. Effective charge measurements reveal selective and preferential accumulation of anions, but not cations, at the protein surface in dilute salt solutions./ Y.R. Gokarn, R.M. Fesinmeyer, A. Saluja, V. Razinkov, S.F. Chase, T.M. Laue, D.N. Brems // Protein Sci. – 2011. – V. 20, №3. – P. 580-587. doi: 10.1002/pro.591.

240. Gomes, D. Parallel chromatography and in situ scattering to interrogate competing protein aggregation pathways./ D. Gomes, R.K. Kalman, R.K. Pagels, M.A. Rodrigues, C.J. Roberts // Protein Sci. – 2018. – V. 27, №7. – P. 1325-1333. doi: 10.1002/pro.3435.

241. Goormaghtigh, E. Protein secondary structure content in solution, films and tissues: redundancy and complementarity of the information content in circular dichroism, transmission and ATR FTIR spectra./ E. Goormaghtigh, R. Gasper, A. Benard, A. Goldsztein, V. Raussens, // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – V. 1794, №9. – P. 1332-1343. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.06.007.

242. Gosal W.S. Amyloid under the atomic force microscope./ W.S. Gosal, S.L. Myers, S.E. Radford, N.H. Thomson // Prot. Pept. Lett. – 2006. – V. 13, – P. 261-270 doi: 10.2174/092986606775338498.

243. Granzier, H.L. Passive Tension in Cardiac Muscle: Contribution of Collagen, Titin, Microtubules, and Intermediate Filaments./ H.L. Granzier, T.C. Irving // Biophysical J. – 1995. – V. 68, №3. – P. 1027-1044. doi:10.1016/s0006-3495(95)80278-x.

244. Granzier, H.L. The Giant Protein Titin: a Major Player in Myocardial Mechanics, Signaling, and Disease./ H.L. Granzier, S. Labeit // Circulation Res. – 2004. – V. 94, №3. – P. 284-295. doi:10.1161/01.RES.0000117769.88862.F8.

245. Granzier H.L. The giant muscle protein titin is an adjustable molecular spring./ H.L. Granzier, S. Labeit // Exerc. Sport Sci. Rev. – 2006. – V. 34. №2. – P. 50-53. doi: 10.1249/00003677-200604000-00002.

246. Gregorio, C.C. The NH2 terminus of titin spans the Z-disc: its interaction with a novel 19-kD ligand (T-cap) is required for sarcomeric integrity./ C.C. Gregorio, K. Trombitás, T. Centner, B. Kolmerer, G. Stier, K. Kunke, K. Suzuki, F. Obermayr, B. Herrmann, H. Granzier, H. Sorimachi, S. Labeit // J. Cell Biol. – 1998. – V. 143, №4. – P. 1013-1027. doi: 10.1083/jcb.143.4.1013.

247. Gregorio, C.C. Muscle assembly: a titanic achievement?/ C.C. Gregorio, H. Granzier, H. Sorimachi, S. Labeit // Curr. Opin. Cell Biol. – 1999. – V. 11, №1. – P. 18-25. doi: 10.1016/s0955-0674(99)80003-9.

248. Gremer, L. Fibril structure of amyloid-β(1-42) by cryo-electron microscopy./ L. Gremer, D. Schölzel, C. Schenk, E. Reinartz, J. Labahn, R.B.G. Ravelli, M. Tusche, C. Lopez-Iglesias, W. Hoyer, H. Heise, D. Willbold, G.F. Schröder // Science. – 2017. – V. 358, №6359. – P. 116-119. doi: 10.1126/science.aao2825.

249. Groenning, M. Binding mode of Thioflavin T in insulin amyloid fibrils./ M. Groenning, M. Norrman, J.M. Flink, M. van de Weert, J.T. Bukrinsky, G. Schluckebier, S. Frokjaer // J. Struct. Biol. – 2007. – V. 159, №3. – P. 483-497. doi: 10.1016/j.jsb.2007.06.004.

250. Grudzielanek, S. Solvation-assisted pressure tuning of insulin fibrillation: from novel aggregation pathways to biotechnological applications./ S. Grudzielanek, V.

Smirnovas R. Winter // J. Mol. Biol. – 2006. – V. 356, – P. 497-509. doi: 10.1016/j.jmb.2005.11.075.

251. Gruen, M. Mutations in beta-myosin S2 that cause familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC) abolish the interaction with the regulatory domain of myosin-binding protein-C./ M. Gruen, M. Gautel // J. Mol. Biol. – 1999. – V. 286, №3. – P. 933-949. doi: 10.1006/jmbi.1998.2522.

252. Gruen, M. cAPK-phosphorylation controls the interaction of the regulatory domain of cardiac myosin binding protein C with myosin-S2 in an on-off fashion./ M. Gruen, H. Prinz, M. Gautel // FEBS Lett. – 1999. – V. 453, №3. – P. 254-259. doi: 10.1016/s0014-5793(99)00727-9.

253. Gsponer, J. Theoretical approaches to protein aggregation./ J. Gsponer, M. Vendruscolo // Protein Pept. Lett. – 2006. – V. 13, №3. – P. 287-293. doi: 10.2174/092986606775338407.

254. Guan, S. Non-compensating roles between Nckalpha and Nckbeta in PDGF-BB signaling to promote human dermal fibroblast migration./ S. Guan, J. Fan, A. Han, M. Chen, D.T. Woodley, W. Li // J. Invest. Dermatol. – 2009. – V. 129, №8. – P. 1909-1920. doi: 10.1038/jid.2008.45.

255. Guerreiro, S.G. Implanted neonatal human dermal fibroblasts influence the recruitment of endothelial cells in mice./ S.G. Guerreiro, C. Brochhausen, R. Negrão, M.A. Barbosa, R.E. Unger, C.J. Kirkpatrick, R. Soares, P.L. Granja // Biomatter. –2012. – V. 2, №1. – P.43-52. doi: 10.4161/biom.20063.

256. Guo, W. Titin diversity--alternative splicing gone wild./ W. Guo, S.J. Bharmal, K. Esbona, M.L. Greaser // J. Biomed. Biotechnol. – 2010. – V. 2010, – P. 753675. doi: 10.1155/2010/753675.

257. Hada, S. Evaluation of antioxidants in protein formulation against oxidative stress using various biophysical methods./ S. Hada, N.A. Kim, D.G. Lim, J.Y. Lim, K.H. Kim, P. Adhikary, S.H. Jeong // Int. J. Biol. Macromol. – 2016. – V. 82, – P. 192-200. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.10.048.

258. Hackman, P. Titinopathies International database of titin mutations and phenotypes./ P. Hackman, B. Udd, C.G. Bönnemann, A. Ferreiro // Workshop report/Neuromuscular Disorders. – 2017. – V. 27, – P. 396-407.

259. Hallab, N.J. Cell adhesion to biomaterials: correlations between surface charge, surface roughness, adsorbed protein, and cell morphology./ N.J. Hallab, K.J. Bundy, K. O'Connor, R. Clark, R.L. Moses // J. Long Term Eff. Med. Implants. – 1995. – V. 5, №3. – P. 209-231.

260. Hamodrakas, S.J. Secondary structure predictions for silkmoth chorion proteins./ Hamodrakas, S.J. Jones, C.W. Kafatos, F.C. // Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol. – 1982. – V. 700, №1. – P. 42-51. doi: 10.1016/0167-4838(82)90289-8.

261. Hartl, F.U. Converging concepts of protein folding *in vitro* and *in vivo*./ F.U. Hartl, M. Hayer-Hartl // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2009. – V. 16, №6 – P. 574-581. doi: 10.1038/nsmb.1591.

262. Hartl, F.U. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis./ F.U. Hartl, A. Bracher, M. Hayer-Hartl // Nature. – 2011. – V. 475, №7356 – P. 324-332. doi: 10.1038/nature10317.

263. Hauptmann, A. Impact of buffer, protein concentration and sucrose addition on the aggregation and particle formation during freezing and thawing./ A. Hauptmann, K. Podgorsek, D. Kuzman, S. Srcic, G. Hoelzl, T. Loerting // Pharm. Res. – 2018. – V. 35, №5. – P. 101. doi: 10.1007/s11095-018-2378-5. Erratum in: Pharm. Res. – 2019. – V. 36, №9. – P. 132. doi: 10.1007/s11095-019-2664-x.

264. Heise, H. Molecular-level secondary structure, polymorphism, and dynamics of full-length alpha-synuclein fibrils studied by solid-state NMR./ H. Heise, W. Hoyer, S. Becker, O.C. Andronesi, D. Riedel, M. Baldus // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2005. – V. 102, №44. – P. 15871-15876. doi: 10.1073/pnas.0506109102.

265. Helmes, M. Titin develops restoring force in rat cardiac myocytes./ M. Helmes, K. Trombitás, H. Granzier // Circ. Res. – 1996. – V. 79, №3. – P. 619-626. doi: 10.1161/01.res.79.3.619.

266. Herman, D.S. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy./ D.S. Herman, L. Lam, M.R. Taylor, L. Wang, P. Teekakirikul, D. Christodoulou, L. Conner, S.R. DePalma, B. McDonough, E. Sparks, D.L. Teodorescu, A.L. Cirino, N.R. Banner, D.J. Pennell, S. Graw, M. Merlo, A. Di Lenarda, G. Sinagra, J.M. Bos, M.J. Ackerman, R.N. Mitchell, C.E. Murry, N.K. Lakdawala, C.Y. Ho, P.J. Barton, S.A. Cook, L. Mestroni, J.G. Seidman, C.E. Seidman // N. Engl. J. Med. – 2012. – V. 366, №7, – P. 619-628. doi: 10.1056/NEJMoa1110186.

267. Herrera, G.A. Ultrastructural immunolabeling in the diagnosis of light-chain-related renal disease./ G.A. Herrera, R. Paul, E.A. Turbat-Herrera, J. Work, G. Viale, P. dell'Orto R.L. Lott, R. Colombi, C.W. Old, R.H. Lyerly, G. Cogg. // Pathol. Immunopathol. Res. – 1986. – V. 5, – №2. P. 170-187. doi: 10.1159/000157010.

268. Hervás, R. Molecular basis of Orb2 amyloidogenesis and blockade of memory consolidation./ R. Hervás, L. Li, A. Majumdar, C. Fernández-Ramírez Mdel, J.R. Unruh, B.D. Slaughter, A. Galera-Prat, E. Santana, M. Suzuki, Y. Nagai, M. Bruix, S. Casas-Tintó, M. Menéndez, D.V. Laurents, K. Si, M. Carrión-Vázquez // PLoS Biol. – 2016. – V. 14, №1. e1002361. doi: 10.1371/journal.pbio.1002361.

269. Higaki, J.N. Novel conformation-specific monoclonal antibodies against amyloidogenic forms of transthyretin./ J.N. Higaki, A. Chakrabartty, N.J. Galant, K.C. Hadley, B. Hammerson, T. Nijjar R. Torres, J.R. Tapia, J. Salmans, R. Barbour, S..J Tam, K. Flanagan, W. Zago, G.G. Kinney // Amyloid – 2016. – V. 23, №2. – P. 86-97. doi: 10.3109/13506129.2016.1148025.

270. Higuchi, H. Changes in contractile properties with selective digestion of connectin (titin) in skinned fibers of frog skeletal muscle./ H. Higuchi // J. Biochem. – 1992. – V. 111, №3. – P. 291-295. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123752.

271. Hill, S.E. Amyloid protofibrils of lysozyme nucleate and grow via oligomer fusion./ S.E. Hill, J. Robinson, G. Matthews, M. Muschol // Biophys. J. – 2009. – V. 96, – P. 3781-3790. doi: 10.1016/j.bpj.2009.01.044.

272. Horowits, R. A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle./ R. Horowits, E.S. Kempner, M.E. Bisher, R.J. Podolsky // Nature. – 1986. – V. 323. №6084. – P. 160-164. doi: 10.1038/323160a0.

273. Hotulainen, P. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells./ P. Hotulainen, P. Lappalainen // J Cell Biol. 2006. – V. 173, №34. – P. 383-394. doi:10.1083/jcb.200511093.

274. Huh, J.H. The identification of free cysteine residues within antibodies and a potential role for free cysteine residues in covalent aggregation because of agitation stress./ J.H. Huh, A.J. White, S.R. Brych, H. Franey, M. Matsumura // J. Pharm. Sci. – 2013. – V. 102, №6. – P. 1701-1711. doi: 10.1002/jps.23505.

275. Howie A.J. Discrepancies between descriptions and illustrations of colours in Congo red-stained amyloid, and explanation of discrepant colours./ A.J. Howie M.P. Owen-Casey // Amyloid. – 2010. – V. 17, – P. 109-117. doi: 10.3109/13506129.2010.527448.

276. Iconomidou, V.A. Amyloids protect the silkmoth oocyte and embryo./ V.A. Iconomidou, G. Vriend, S.J. Hamodrakas // FEBS Lett. – 2000. – V. 479, №3. – P. 141-145. doi: 10.1016/s0014-5793(00)01888-3.

277. Iconomidou, V.A. Amyloid-like fibrils from an 18-residue peptide analogue of a part of the central domain of the B-family of silkmoth chorion proteins./ V.A. Iconomidou, G.D. Chryssikos, V. Gionis, G. Vriend, A. Hoenger, S.J. Hamodrakas // FEBS Lett. – 2001. – V. 499, №3. – P. 268-273. doi: 10.1016/s0014-5793(01)02510-8.

278. Iconomidou, V.A. Amyloid fibril formation propensity is inherent into the hexapeptide tandemly repeating sequence of the central domain of silkmoth chorion proteins of the A-family./ V.A. Iconomidou, G.D. Chryssikos, V. Gionis, A.S. Galanis, P. Cordopatis, A. Hoenger, S.J. Hamodrakas // J. Struct. Biol. – 2006. – V. 156, №3. – P. 480-488. doi: 10.1016/j.jsb.2006.08.011.

279. Ikeda, S. Structural changes during heat-induced gelation of globular protein dispersions./ S. Ikeda, K. Nishinari // Biopolymers. – 2001. – V. 59, №2. – P. 87-102. doi: 10.1002/1097-0282(200108)59:2<87::AID-BIP1008>3.0.CO;2-H.

280. Inouye, H. Structure of beta-crystallite assemblies formed by Alzheimer beta-amyloid protein analogues: analysis by X-Ray diffraction./ H. Inouye, P.E. Fraser, D.A. Kirschner // Biophys. J. – 1993. – V. 64, – P. 502-519 doi: 10.1016/S0006-3495(93)81393-6.

281. Ishii, Y. Comparison of antibody molecules produced from two cell lines with contrasting productivities and aggregate contents./ Y. Ishii, Y. Imamoto, R. Yamamoto, M. Tsukahara, K. Wakamatsu // Biol. Pharm. Bull. – 2015. – V. 38, №2. – P. 306-316. doi: 10.1248/bpb.b14-00729.

282. Ivanova, M.I. An amyloid-forming segment of β2-microglobulin suggests a molecular model for the fibril./ M.I. Ivanova, M.R. Sawaya, M. Gingery, A. Attinger, D. Eisenberg // Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. – 2004. – V. 101, №29. – P. 10584-10589. doi: 10.1073/pnas.0403756101.

283. Jackson, M.P. Why are Functional Amyloids Non-Toxic in Humans?/ M.P. Jackson, E.W. Hewitt, // Biomolecules. – 2017. – V. 7, №4. – P. 71. doi: 10.3390/biom7040071.

284. Jacques, D.A. Small-angle scattering for structural biology expanding the frontier while avoiding the pitfalls./ D.A. Jacques, J. Trewhella // Protein Sci. – 2010. – V. 19, – P. 657 doi: 10.1002/pro.351.

285. Jahn, T.R. The Yin and Yang of protein folding./ T.R. Jahn, S.E. Radford // FEBS J. – 2005. – V. 272, №23. – P 5962-5970. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.05021.x.

286. Jahn, T.R. Folding versus aggregation: polypeptide conformations on competing pathways./ T.R. Jahn, S.E. Radford // Arch. Biochem. Biophys. – 2008. – V. 469, №1. – P. 100-117. doi: 10.1016/j.abb.2007.05.015.

287. Jahn, T.R. The common architecture of cross-beta amyloid./ T.R. Jahn, O.S. Makin, K.L. Morris, K.E. Marshall, P. Tian, P. Sikorski, L.C. Serpell // J. Mol. Biol. – 2010. – V. 395, №4. – P. 717-727. doi: 10.1016/j.jmb.2009.09.039.

288. Jana, A.K. Glycation induces conformational changes in the amyloid-beta peptide and enhances its aggregation propensity: molecular insights./ A.K. Jana, K.B. Batkulwar, M.J. Kulkarni, N. Sengupta // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2016. – V. 18, №46. – P. 31446-31458. doi: 10.1039/c6cp05041g.

289. Jaroniec, C. High-resolution molecular structure of a peptide in an amyloid fibril determined by magic angle spinning NMR spectroscopy./ C. Jaroniec, C.E. MacPhee, V.S. Bajaj, M.T. McMahon, C.M. Dobson, R.G. Griffin // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2004. – V. 101, – P. 711-716. doi: 10.1073/pnas.0304849101.

290. Jiménez J.L. Structural diversity of ex vivo amyloid fibrils studied by cryo-electron microscopy./ J.L. Jiménez, G. Tennent, M. Pepys, H.R. Saibil // J. Mol. Biol. – 2001. – V. 311, – P. 241–247. doi: 10.1006/jmbi.2001.4863

291. Jiménez, J.L. The protofilament structure of insulin amyloid fibrils./ J.L. Jiménez, E.J. Nettleton, M. Bouchard, C.V. Robinson, C.M. Dobson, H.R. Saibil // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2002. – V. 99, №14. – P. 9196-9201. doi: 10.1073/pnas.142459399.

292. Johnston, K.P. Concentrated dispersions of equilibrium protein nanoclusters that reversibly dissociate into active monomers./ K.P. Johnston, J.A. Maynard, T.M. Truskett, A.U. Borwankar, M.A. Miller, B.K. Wilson, A.K. Dinin, T.A. Khan, K.J. Kaczorowski // ACS Nano. – 2012. – V. 6, №2. – P. 1357-1369. doi: 10.1021/nn204166z.

293. Joshi, V. Avoiding antibody aggregation during processing: establishing hold times./ V. Joshi, T. Shivach, V. Kumar, N. Yadav, A. Rathore // Biotechnol. J. – 2014. – V. 9, №9. – P. 1195-1205. doi: 10.1002/biot.201400052.

294. Joubert, M.K. Use of *In vitro* assays to assess immunogenicity risk of antibody-based biotherapeutics./ M.K. Joubert, M. Deshpande, J. Yang, H. Reynolds, C. Bryson, M. Fogg, M.P. Baker, J. Herskovitz, T.J. Goletz, L. Zhou, M. Moxness, G.C. Flynn, L.O. Narhi, V. Jawa // PLoS One, – 2016. – V. 11, №8. e0159328. doi: 10.1371/journal.pone.0159328.

295. Kalita, S. Copper chelating cyclic peptidomimetic inhibits Aβ fibrillogenesis./ S. Kalita, S. Kalita, A.H. Kawa, S. Shill, A. Gupta, S. Kumar, B. Mandal // RSC Med. Chem. – 2022. – V. 13, №6. – P. 761-774. doi: 10.1039/d2md00019a.

296. Kalonia, C. Effects of protein conformation, apparent solubility, and protein-protein interactions on the rates and mechanisms of aggregation for an igg1monoclonal antibody./ C. Kalonia, V. Toprani, R. Toth, N. Wahome, I. Gabel, C.R. Middaugh, D.B. Volkin // J. Phys. Chem. B. – 2016. – V. 120, №29. –P. 7062-7075. doi: 10.1021/acs.jpcb.6b03878.

297. Karamanos, T.K. Mechanisms of amyloid formation revealed by solution NMR./ T.K. Karamanos, A.P. Kalverda, G.S. Thompson, S.E. Radford // Prog. Nucl.

Magn. Reson. Spectrosc. – 2015. – V. 88-89, – P. 86-104 doi: 10.1016/j.pnmrs.2015.05.002.

298. Kashchiev, D. Confounding the paradigm: peculiarities of amyloid fibril nucleation./ D. Kashchiev, R. Cabriolu, S. Auer // J. Am. Chem. Soc. – 2013. – V. 135, №4. – P. 1531-1539. doi: 10.1021/ja311228d.

299. Kayed R. Conformation-dependent anti-amyloid oligomer antibodies./ R. Kayed, C.G. Glabe // Methods Enzymol. – 2006. – V. 413, – P. 326-344 doi: 10.1016/S0076-6879(06)13017-7

300. Kayed, R. Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers./ R. Kayed, E. Head, F. Sarsoza, T. Saing, C.W. Cotman, M. Necula L. Margol, J. Wu, L. Breydo, J.L. Thompson, S. Rasool, T. Gurlo, P. Butler, C.G. Glabe // Mol. Neurodegener. – 2007. – V. 2, – P. 18 doi: 10.1186/1750-1326-2-18

301. Kayser, V. Evaluation of a non-arrhenius model for therapeutic monoclonal antibody aggregation./ V. Kayser, N. Chennamsetty, V. Voynov, B. Helk, K. Forrer, B.L. Trout // J. Pharm. Sci. – 2011. – V. 100, №7. – P. 2526-2542. doi: 10.1002/jps.22493.

302. Kelényi, G. On the histochemistry of azo group-free thiazole dyes./ G. Kelényi // J. Histochem. Cytochem. – 1967. – V. 15, – P. 172-180 doi: 10.1177/15.3.172.

303. Kellermayer, M.S. Folding-unfolding transitions in single titin molecules characterized with laser tweezers./ M.S. Kellermayer, S.B. Smith, H.L. Granzier, C. Bustamante // Science. – 1997. – V. 276, №5315, – P. 1112-1116. doi: 10.1126/science.276.5315.1112. Erratum in: Science. – 1997. – V. 277, №5329. – P. 1117.

304. Kellermayer, M.S. Mechanics and structure of titin oligomers explored with atomic force microscopy./ M.S. Kellermayer, C. Bustamante, H.L. Granzier // Biochim. Biophys. Acta. – 2003. – V. 1604, №2. V. 105-114. doi: 10.1016/s0005-2728(03)00029-x.

305. Kellermayer, D. Truncated titin is structurally integrated into the human dilated cardiomyopathic sarcomere./ D. Kellermayer, H. Tordai, B. Kiss, G. Török, D.M. Péter, A.A. Sayour, M. Pólos, I. Hartyánszky, B. Szilveszter, S. Labeit, A. Gángó, G.

Bedics, C. Bödör, T. Radovits, B. Merkely, M.S. Kellermayer // J. Clin. Invest. – 2024. – V. 134, №2. e169753. doi: 10.1172/JCI169753.

306. Kensler, R.W. Binding of the N-terminal fragment C0–C2 of cardiac MyBP-C to cardiac F-actin./ R.W. Kensler, J.F. Shaffer, S.P. Harris // J. Struct. Biol. – 2011. – V. 174, №1. – P. 44-51. doi: 10.1016/j.jsb.2010.12.003.

307. Keten, S. Geometric confinement governs the rupture strength of H-bond assemblies at a critical length scale./ S. Keten, M.J. Buehler // Nano Lett. – 2008. – V. 8, №2. – P. 743-748. doi: 10.1021/nl0731670.

308. Khan, J.M. Sunset Yellow Dye Induces Amorphous Aggregation in β-Lactoglobulin at Acidic pH: A Multi-Techniques Approach./ J.M. Khan, A. Malik, F.M. Husain, M.J. Hakeem, A.S.Alhomida // Polymers. – 2022. – V. 14, №3. – P 395. doi: 10.3390/polym14030395.

309. Kiese, S. Equilibrium studies of protein aggregates and homogeneous nucleation in protein formulation./ S. Kiese, A. Pappenberger, W. Friess, H.C. Mahler // J. Pharm. Sci. – 2010. – V. 99, №2. – P. 632-644. doi: 10.1002/jps.21858.

310. Kim, K. Smitin, a novel smooth muscle titin-like protein, interacts with myosin filaments *in vivo* and *in vitro*./ K. Kim, T.C. Keller 3rd // J Cell Biol. – 2002. – V. 156, №1. – P. 101–111. doi: 10.1083/jcb.200107037.

311. Kim, N. Aggregation of anti-streptavidin immunoglobulin gamma-1 involves Fab unfolding and competing growth pathways mediated by pH and salt concentration./ N. Kim, R.L. Remmele Jr., D. Liu, V.I. Razinkov, E.J. Fernandez, C.J. Roberts // Biophys. Chem. – 2013a. – V. 172, – P. 26-36. doi: 10.1016/j.bpc.2012.12.004.

312. Kim, Y.E. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis./ Y.E. Kim, M.S. Hipp, A. Bracher, M. Hayer-Hartl, F.U. Hartl // Annu. Rev. Biochem. – 2013b. – V. 82, – P. 323-355. doi: 10.1146/annurev-biochem-060208-092442.

313. Kim, N.A. Effects of pH and buffer concentration on the thermal stability of etanercept using DSC and DLS./ N.A. Kim, I.B. An, D.G. Lim, J.Y. Lim, S.Y. Lee, W.S. Shim, N.-G. Kang, S.H. Jeong // Biol. Pharm. Bull. – 2014a. – V. 37, №5. – P. 808-816. doi: 10.1248/bpb.b13-00926.

314. Kim, N.A. Comprehensive evaluation of etanercept stability in various concentrations with biophysical assessment./ N.A. Kim, D.G. Lim, J.Y. Lim, K.H. Kim, S.H. Jeong // Int. J. Pharm. – 2014b. – V. 460, №1-2. – P. 108-118. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.11.019.

315. Kimura, S. Interactions of muscle beta-connectin with myosin, actin, and actomyosin at low ionic strengths./ S. Kimura, K. Maruyama, Y.P. Huang // Biochem. J. – 1984. – V. 96. №2. – P. 499-506. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134862.

316. King, C.Y. Prion-inducing domain 2-114 of yeast Sup35 protein transforms *in vitro* into amyloid-like filaments./ C.Y. King, P. Tittmann, H. Gross, R. Gebert, M. Aebi, K. Wüthrich // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1997. – V. 94, №13. – P. 6618-6622. doi: 10.1073/pnas.94.13.6618.

317. Kishore, R.S. The degradation of polysorbates 20 and 80 and its potential impact on the stability of biotherapeutics./ R.S. Kishore, S. Kiese, S. Fischer, A. Pappenberger, U. Grauschopf, H.C. Mahler // Pharm. Res. – 2011a – V. 28, №5. – P. 1194-1210. doi: 10.1007/s11095-011-0385-x.

318. Kishore, R.S. Degradation of polysorbates 20 and 80: studies on thermal autoxidation and hydrolysis./ R.S. Kishore, A. Pappenberger, I.B. Dauphin, A. Ross, B. Buergi, A. Staempfli, H.C. Mahler // J. Pharm. Sci. – 2011b. – V. 100, №2. – P. 721-731. doi: 10.1002/jps.22290.

319. Knöll, R. The The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy./ R. Knöll, M. Hoshijima, H.M. Hoffman, V. Person, I. Lorenzen-Schmidt, M.L. Bang, T. Hayashi, N. Shiga, H. Yasukawa, W. Schaper, W. McKenna, M. Yokoyama, N.J. Schork, J.H. Omens, A.D. McCulloch, A. Kimura, C.C. Gregorio, W. Poller, J. Schaper, H.P. Schultheiss, K.R.Chien // Cell. – 2002. – V. 111, №7. – P. 943-955. doi: 10.1016/s0092-8674(02)01226-6.

320. Knowles, T.P. Role of intermolecular forces in defining material properties of protein nanofibrils./ T.P. Knowles, A.W. Fitzpatrick, S. Meehan, H.R. Mott, M. Vendruscolo, C.M. Dobson, M.E.Welland // Science. – 2007. – V. 318, №5858. – P. 1900-1903. doi: 10.1126/science.1150057.

321. Knowles, T.P. Nanomechanics of functional and pathological amyloid materials./ T.P. Knowles, M.J. Buehler // Nat. Nanotechnol. – 2011. – V. 6, №8 – P. 469-479. doi: 10.1038/nnano.2011.102. PMID: 21804553.

322. Knowles, T.P. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases./ T.P. Knowles, M. Vendruscolo, C.M. Dobson // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2014. – V. 15, №6, – P. 384-396. doi: 10.1038/nrm3810.

323. Kontrogianni-Konstantopoulos, A. Obscurin: a multitasking muscle giant./ A. Kontrogianni-Konstantopoulos, R.J. Bloch // J. Muscle Res. Cell. Motil. – 2005. – V. 26, №6-8. – P. 419-426. doi: 10.1007/s10974-005-9024-7.

324. Kontrogianni-Konstantopoulos, A. Muscle giants: Molecular scaffolds in sarcomerogenesis./ A. Kontrogianni-Konstantopoulos, M.A. Ackermann, A.L. Bowman, S.V. Yap, R. Bloch // Physiol. Rev. – 2009. – V. 89, №4. – P. 1217-1267. doi: 10.1152/physrev.00017.2009.

325. Koretz, J.F. Filamentous aggregates of native titin and binding of C-protein and AMP-deaminase./ J.F. Koretz, T.C. Irving, K. Wang // Arch. Biochem. Biophys. – 1993. – V. 304, №2. – P. 305-309. doi: 10.1006/abbi.1993.

326. Koser, F. Posttranslational modifications of titin from cardiac muscle: how, where, and what for?/ F. Koser, C. Loescher, W.A. Linke // Febs J. – 2019. – V. 286, №12. – P 2240-2260. doi: 10.1111/febs.14854

327. Kosolapova, A.O. Two Novel Amyloid Proteins, RopA and RopB, from the Root Nodule Bacterium *Rhizobium leguminosarum*./ A.O. Kosolapova, M.V. Belousov, A.I. Sulatskaya, M.E. Belousova, M.I. Sulatsky, K.S. Antonets, K.V. Volkov, A.N. Lykholay, O.Y. Shtark, E.N. Vasileva, V.A. Zhukov, A.N. Ivanova, P.A. Zykin, I.M. Kuznetsova, K.K. Turoverov, I.A. Tikhonovich, A.A. Nizhnikov // Biomolecules. – 2019. – V. 9, №11. – P. 694. doi: 10.3390/biom9110694.

328. Kosolapova, A.O. RopB protein of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* adopts amyloid state during symbiotic interactions with pea (*Pisum sativum* L.)./ A.O. Kosolapova, M.V. Belousov, M.I. Sulatsky, A.V. Tsyganova, A.I. Sulatskaya, A.G. Bobylev, O.Y. Shtark, V.E. Tsyganov, K.V. Volkov, V.A. Zhukov, I.A. Tikhonovich, A.A.

Nizhnikov // Front. Plant Sci. – 2022. – V. 13, – P. 1014699. doi: 10.3389/fpls.2022.1014699.

329. Kötter, S. Human myocytes are protected from titin aggregation-induced stiffening by small heat shock proteins./ S. Kötter, A. Unger, N. Hamdani, P. Lang, M. Vorgerd, L. Nagel-Steger, W.A. Linke // J. Cell Biol. – 2014. – V. 204, №2. – P. 187-202. doi: 10.1083/jcb.201306077.

330. Koudelka, T. Methionine oxidation enhances kappa-casein amyloid fibril formation./ T. Koudelka, F.C. Dehle, I.F. Musgrave, P. Hoffmann, J.A. Carver // J. Agric. Food. Chem. – 2012. – V. 60, №16. – P. 4144-4155. doi: 10.1021/jf205168t.

331. Krause, M.E. Mapping site-specific changes that affect stability of the N-terminal domain of calmodulin./ M.E. Krause, T.T. Martin, J.S. Laurence // Mol. Pharm. – 2012. – V. 9, №4. – P. 734-743. doi: 10.1021/mp2004109.

332. Krebs, M.R. The mechanism of formation of spherulites by bovine insulin amyloid fibrils./ M.R. Krebs, E.H. Bromley, S.S. Rogers, A.M. Donald // Biophys. J. – 2005. – V. 88, №3. – P. 2013-2021. doi: 10.1529/biophysj.104.051896.

333. Krebs, M.R. Protein particulates: another generic form of protein aggregation?/ M.R. Krebs, G.L. Devlin, A.M. Donald // Biophys. J. – 2007. – V. 92, №4. – P. 1336-1342. doi: 10.1529/biophysj.106.094342.

334. Krebs, M.R. Protein aggregation: more than just fibrils./ M.R. Krebs, K.R. Domike, A.M. Donald // Biochem. Soc. Trans. – 2009a. – V. 37, Pt 4. – P. 682-686. doi: 10.1042/BST0370682.

335. Krebs, M.R. Amyloid fibril-like structure underlies the aggregate structure across the pH range for beta-lactoglobulin./ M.R. Krebs, G.L. Devlin, A.M. Donald // Biophys. J. – 2009b. – V. 96, №12. – P. 5013-5019. doi: 10.1016/j.bpj.2009.03.028.

336. Krishnamoorthy, A. Effect of curcumin on amyloid-like aggregates generated from methionine-oxidized apolipoprotein A-I./ A. Krishnamoorthy, N. Tavoosi, G.K. Chan, J. Liu, G. Ren, G. Cavigiolio, R.O. Ryan // FEBS Open Bio. – 2018. – V. 8, №2. – P. 302-310. doi: 10.1002/2211-5463.12372.

337. Krüger, M. The Giant Protein Titin: a Regulatory Node that Integrates Myocyte Signaling Pathways./ M. Krüger, W.A. Linke // J. Biol. Chem. – 2011. – V. 286, №12. – P. 9905-9912. doi: 10.1074/jbc.R110.173260.

338. Kryndushkin, D. Comparative effects of metal-catalyzed oxidizing systems on carbonylation and integrity of therapeutic proteins./ D. Kryndushkin, V.A. Rao // Pharm. Res. – 2016. – V. 33, №2. – P. 526-539. doi: 10.1007/s11095-015-1807-y.

339. Kulangara, K. Substrate topography shapes cell function./ K. Kulangara, K.W. Leong // Soft Matter. – 2009. – V. 5, №21. – P. 4072-4076. doi: 10.1039/B910132M.

340. Kulke, M. Interaction between PEVK-titin and actin filaments: origin of a viscous force component in cardiac myofibrils./ M. Kulke, S. Fujita-Becker, E. Rostkova, C. Neagoe, D. Labeit, D.J. Manstein, M. Gautel, W.A. Linke // Circ. Res. – 2001. – V. 89. №10. – P. 874-881. doi: 10.1161/hh2201.099453.

341. Kumar, V. In situ precipitation and vacuum drying of interferon alpha-2a: development of a single-step process for obtaining dry, stable protein formulation./ V. Kumar, V.K. Sharma, D.S. Kalonia // Int. J. Pharm. – 2009. – V. 366, №1-2. – P. 88-98. doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.09.001.

342. Kumar, V. Impact of short range hydrophobic interactions and long range electrostatic forces on the aggregation kinetics of a monoclonal antibody and a dual-variable domain immunoglobulin at low and high concentrations./ V. Kumar, N. Dixit, L.Q. Zhou, W. Fraunhofer // Int. J. Pharm. – 2011. – V. 421, №1. – P. 82-93. doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.09.017.

343. Kumar, S. Phosphorylation of amyloid beta (Aβ) peptides – a trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease./ S. Kumar, J. Walter // Aging. – 2011. – V. 3, №8. – P. 803-812. doi: 10.18632/aging.100362.

344. Kumar, S. Singh Relationship between potential aggregation-prone regions and HLA-DR-binding T-cell immune epitopes: implications for rational design of novel and follow-on therapeutic antibodies./ S. Kumar, M.A. Mitchell, B. Rup, S.K. Singh // J. Pharm. Sci. – 2012. – V. 101, №8. – P. 2686-2701. doi: 10.1002/jps.23169.

345. Kumar, D.K. Amyloid-β peptide protects against microbial infection in mouse and worm models of Alzheimer's disease./ D.K. Kumar, S.H. Choi, K.J.

Washicosky, W.A. Eimer, S. Tucker, J. Ghofrani, A. Lefkowitz, G. McColl, L.E. Goldstein, R.E. Tanzi, R.D. Moir // Sci. Transl. Med. – 2016. – V. 8, №340. – P. 340ra72. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf1059.

346. Kutsch, M. Dissecting ion-specific from electrostatic salt effects on amyloid fibrillation: a case study of insulin./ M. Kutsch, P. Hortmann, C. Herrmann, S. Weibels, H. Weingärtner // Biointerphases. – 2016. – V. 11, №1. – P. 019008. doi: 10.1116/1.4941008.

347. Kwan, A.H. Structural basis for rodlet assembly in fungal hydrophobins./ A.H. Kwan, R.D. Winefield, M. Sunde, J.M. Matthews, R.G. Haverkamp, M.D. Templeton, J.P. Mackay // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2006. – V. 103, №10. – P. 3621-3626. doi: 10.1073/pnas.0505704103.

348. Labbadia J. The biology of proteostasis in aging and disease./ J. Labbadia, R.I. Morimoto // Annu. Rev. Biochem. – 2015. – V. 84, – P. 435-464. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-033955

349. Labeit, S. The giant protein titin. Emerging roles in physiology and pathophysiology./ S. Labeit, B. Kolmerer, W.A. Linke // Circ. Res. – 1997. – V. 80, №2. – P. 290-294. doi: 10.1161/01.res.80.2.290.

350. Labeit, S. Expression of distinct classes of titin isoforms in striated and smooth muscles by alternative splicing, and their conserved interaction with filamins./ S. Labeit, S. Lahmers, C. Burkart, C. Fong, M. McNabb, S. Witt, C. Witt, D. Labeit, H. Granzier // J. Mol. Biol. – 2006. – V. 362, №4. – P. 664-681. doi: 10.1016/j.jmb.2006.07.077.

351. Lacroix, E. Evolutionary conservation of systemic and reversible amyloid aggregation./ E. Lacroix, L. Pereira, B. Yoo, K.M. Coyle, S. Chandhok, R. Zapf, D. Marijan, R.D. Morin, S. Vlachos, N. Harden, T.E. Audas // J. Cell Sci. – 2021. – V. 134, №22. – P. jcs258907. doi: 10.1242/jcs.258907.

352. Lange, S. The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover./ S. Lange, F. Xiang, A. Yakovenko, A.Vihola, P. Hackman, E. Rostkova, J. Kristensen, B. Brandmeier, G. Franzen, B. Hedberg, L.G. Gunnarsson, S.M. Hughes, S. Marchand, T. Sejersen, I. Richard, L. Edström, E. Ehler, B. Udd, M. Gautel // Science. – 2005. – V. 308. №5728. – P. 1599-1603. doi: 10.1126/science.1110463.

353. Lange, S. From A to Z and Back? Multicompartment Proteins in the Sarcomere./ S. Lange, E. Ehler, M. Gautel // Trends Cell Biol. – 2006. – V. 16, №1. – P. 11-18. doi:10.1016/j.tcb.2005.11.007.

354. Langton, M. Fine-stranded and particulate gels of β-lactoglobulin and whey protein at varying pH./ M. Langton, A.M. Hermansson // Food Hydrocoll. – 1992. – V. 5, №6. – P. 523-539. doi: 10.1016/S0268-005X(09)80122-7.

355. Lansbury Jr, P.T. Structural model for the beta-amyloid fibril based on interstrand alignment of an antiparallel-sheet comprising a C-terminal peptide./ P.T. Jr Lansbury, P.R. Costa, J.M. Griffiths, E.J. Simon, M. Auger, K.J. Halverson, D.A. Kocisko, Z.S. Hendsch, T.T. Ashburn, R.G.S. Spencer, B. Tidor, R.G. Griffin // Nat. Struct. Biol. 1995. – V. 2, №11. – P. 990-998. doi:10.1038/nsb1195-990.

356. Latypov, R.F. Elucidation of acid-induced unfolding and aggregation of human immunoglobulin IgG1 and IgG2 Fc./ R.F. Latypov, S. Hogan, H. Lau, H. Gadgil, D. Liu // J. Biol. Chem. – 2012. – V. 287, №2. – P. 1381-1396. doi: 10.1074/jbc.M111.297697.

357. Latza, V. Multi-scale thermal stability of a hard thermoplastic protein-based material./ V. Latza, P. Guerette, D. Ding, S. Amini, A. Kumar, I. Schmidt, S. Keating, N. Oxman, J.C. Weaver, P. Fratzl, A. Miserez, A. Masic // Nat. Commun. – 2015. – V. 6, – P. 8313. doi: 10.1038/ncomms9313.

358. Lassner, P. Formation of insoluble particulates in a spray-dried F(ab')2 fragment./ P. Lassner, M. Adler, G. Lee // J. Pharm. Sci. – 2014. – V. 103, №4. – P. 1021-1031. doi: 10.1002/jps.23891.

359. Lavoie, T.L. Disrupting actin-myosin-actin connectivity in airway smooth muscle as a treatment for asthma?/ T.L. Lavoie, M.L. Dowell, O.J. Lakser, W.T. Gerthoffer, J.J. Fredberg, C.Y. Seow, R.W. Mitchell, J. Solway // Proc. Am. Thorac. Soc. – 2009. – V. 6, №3. – P. 295-300. doi: 10.1513/pats.200808-078RM.

360. Leblanc, Y. Glycation of polyclonal IgGs: effect of sugar excipients during stability studies./ Y. Leblanc, N. Bihoreau, M. Jube, M.-H. Andre, Z. Tellier, G. Chevreux // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2016. – V. 102, – P. 185-190. doi: 10.1016/j.ejpb.2016.03.016.

361. Lee, E.J. Calcium sensitivity and the FrankStarling mechanism of the heart are increased in titin N2B regiondeficient mice./ E.J. Lee, J. Peng, M. Radke, M. Gotthardt, H.L. Granzier // J. Mol. Cell Cardiol. – 2010. – V. 49, №3. – P. 449-458. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.05.006.

362. Lee, H. Monoclonal antibody aggregation intermediates visualized by atomic force microscopy./ H. Lee, M. Kirchmeier, H. Mach // J. Pharm. Sci. – 2011. – V. 100, №2. – P. 416-423. doi: 10.1002/jps.22279.

363. Lei, M. Structure-based correlation of light-induced histidine reactivity in a model protein./ M. Lei, T. Carcelen, B.T. Walters, C. Zamiri, C. Quan, Y.Z. Hu, J. Nishihara, H. Yip, N. Woon, T. Zhang, Y.H. Kao, C. Schoneich // Anal. Chem. – 2017. – V. 89, №13. – P. 7225-7231. doi: 10.1021/acs.analchem.7b01457.

364. LeVine 3rd, H. Thioflavin T interaction with amyloid β-sheet structures./ H. LeVine 3rd // Amyloid. – 1995. – V. 2, – P. 1-6. doi:10.3109/13506129509031881.

365. LeWinter, M.M. Cardiac titin: a multifunctional giant./ M.M. LeWinter, H. Granzier // Circulation. – 2010. – V. 121. №19. – P. 2137-2145. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.860171.

366. Lewis, L.M. Visible and sub-visible particle formation for a model bioconjugate./ L.M. Lewis, M.E. Pizzo, S. Sinha, S.S. Ahmed, L. Joseph // AAPS PharmSciTech. – 2017. – V. 18, №3. – P. 926-931. doi: 10.1208/s12249-016-0540-0.

367. Li, H. Reverse engineering of the giant muscle protein titin./ H. Li, W.A. Linke, A.F. Oberhauser, M. Carrion-Vazquez, J.G. Kerkvliet, H. Lu, P.E. Marszalek, J.M. Fernandez // Nature. – 2002. – V. 418, №6901. – P. 998-1002. doi: 10.1038/nature00938.

368. Li, Y. Multi-variate approach to global protein aggregation behavior and kinetics: effects of pH, NaCl, and temperature for α-chymotrypsinogen A./ Y. Li, B.A. Ogunnaike, C.J. Roberts // J. Pharm. Sci. – 2010. – V. 99, №2. – P. 645-662. doi: 10.1002/jps.21869.

369. Li, Y. Characterization of the self-association of human interferon-alpha2b, albinterferon-alpha2b, and pegasys./ Y. Li, W.F. Stafford, M. Hesselberg, D. Hayes, Z. Wu, M. Byrne // J. Pharm. Sci. – 2012. – V. 101, №1. – P. 68-80. doi: 10.1002/jps.22751.

370. Li, Y. Characterization and stability study of polysorbate 20 in therapeutic monoclonal antibody formulation by multidimensional ultrahigh-performance liquid chromatography-charged aerosol detection-mass spectrometry./ Y. Li, D. Hewitt, Y.K. Lentz, J.Y.A. Ji, T.Y. Zhang, K. Zhang // Anal. Chem. – 2014a. – V. 86, №10. – P. 5150-5157. doi: 10.1021/ac5009628.

371. Li, Y.M. Characterization of the degradation products of a color-changed monoclonal antibody: tryptophan-derived chromophores./ Y.M. Li, A. Polozova, F. Gruia, J.H. Feng // Anal. Chem. – 2014b. – V. 86, №14. – P. 6850-6857. doi: 10.1021/ac404218t.

372. Li, Y. Amyloid fibril structure of α-synuclein determined by cryo-electron microscopy./ Y. Li, C. Zhao, F. Luo, Z. Liu, X. Gui, Z. Luo, X. Zhang, D. Li, C. Liu, X. Li // Cell Res. – 2018. – V. 28, №9. – P. 897-903. doi: 10.1038/s41422-018-0075-x.

373. Liaw, C. Prediction and analysis of antibody amyloidogenesis from sequences./ C. Liaw, C.W. Tung, S.Y. Ho // PLoS One. – 2013. –, V. 8, №1. – P. e53235. doi: 10.1371/journal.pone.0053235.

374. Lilyestrom, W.G. Monoclonal antibody self-association, cluster formation, and rheology at high concentrations./ W.G. Lilyestrom, S. Yadav, S.J. Shire, T.M. Scherer // J. Phys. Chem. B. – 2013. – V. 117, №21. – P. 6373-6384. doi: 10.1021/jp4008152.

375. Lindberg, D.J. Binding of thioflavin-T to amyloid fibrils leads to fluorescence self-quenching and fibril compaction./ D.J. Lindberg, A. Wenger, E. Sundin, E. Wesén, F. Westerlund, E.K. Esbjörner // Biochemistry – 2017. – V. 56, – P. 2170-2174. doi: 10.1021/acs.biochem.7b00035.

376. Lindgren M., Sörgjerd K. and Hammarström P. (2005) Detection and characterization of aggregates, prefibrillar amyloidogenic oligomers, and protofibrils using fluorescence spectroscopy./ M. Lindgren, K. Sörgjerd, P. Hammarström // Biophys. J. V. 88, – P. 4200-4212. doi: 10.1529/biophysj.104.049700.

377. Linke, W.A. Passive and active tension in single cardiac myofibrils./ W.A. Linke, V.I. Popov, G.H. Pollack // Biophys. J. – 1994. – V. 67, №2. – P. 782-792. doi: 10.1016/S0006-3495(94)80538-7.

378. Linke, W.A. Limits of titin extension in single cardiac myofibrils./ W.A. Linke, M.L. Bartoo, M. Ivemeyer, G.H. Pollack, W.A. Linke, M.L. Bartoo, M. Ivemeyer,

G.H. Pollack // J. Muscle. Res. Cell Motil. –1996. – V. 17, №4. – P. 425-438. doi: 10.1007/BF00123359.

379. Linke, R.P. Congo Red Staining of amyloid: improvements and practical guide for a more precise diagnosis of amyloid and the different amyloidoses. / R.P. Linke // in: Uversky V.N. and Fink A.L. (eds) In Protein Misfolding, Aggregation, and Conformational Diseases. Protein Reviews. Springer, Boston, MA. – 2006. – P. 239-276. doi: 10.1007/0-387-25919-8_12.

380. Linke, W. Sense and stretchability: the role of titin and titin-asso ciated proteins in myocardial stresssensing and mechanical dysfunction./ W. Linke // Cardiovasc. Res. – 2008. – V. 77. №4. – P. 637-648. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.03.029.

381. Linke, W.A. The giant protein titin as an integrator of myocyte signaling pathways./ W.A. Linke, M. Krüger // Physiology (Bethesda). – 2010. – V. 25. №3. – P. 186-198. doi: 10.1152/physiol.00005.2010.

382. Linke, W.A. Gigantic Business: Titin Properties and Function through Thick and Thin./ W.A. Linke, N. Hamdani // Circ. Res. – 2014. – V. 114, №6. 1052-1068. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.301286.

383. Liu, G. Glycation of whey protein to provide steric hindrance against thermal aggregation./ G. Liu, Q. Zhong // J. Agric. Food. Chem. – 2012. – V. 60, №38. – P. 9754-9762. doi: 10.1021/jf302883b.

384. Liu, J. Characterization and stabilization of recombinant human protein pentraxin (rhPTX-2)./ J. Liu, C.A. Blasie, S. Shi, S.B. Joshi, C.R. Middaugh, D.B. Volkin // J. Pharm. Sci. – 2013a. – V. 102, №3. – P. 827-841. doi: 10.1002/jps.23360.

385. Liu, L. The effects of excipients on protein aggregation during agitation: An interfacial shear rheology study./ L. Liu, W. Qi, D.K. Schwartz, T.W. Randolph, J.F. Carpenter // J. Pharm. Sci. – 2013b. – V. 102, №8. – P. 2460-2470. doi: 10.1002/jps.23622.

386. Liu, L. Carpenter Freezing-induced perturbation of tertiary structure of a monoclonal antibody./ L. Liu, L.J. Braun, W. Wang, T.W. Randolph, J.F. Carpenter // J. Pharm. Sci. – 2014. – V. 103, №7. – P. 1979-1986. doi: 10.1002/jps.24013.

387. Liu, J. Glycation of bovine serum albumin with monosaccharides inhibits heat-induced protein aggregation./ J. Liu, H. Jing // RSC Adv. – 2016. – V. 6, – P. 115183-115188. doi: 10.1039/C6RA24580C.

388. Liversage, A.D. Titin and the sarcomere symmetry paradox./ A.D. Liversage, D. Holmes, P.J. Knight, L. Tskhovrebova, J. Trinick // J. Mol. Biol. – 2001. – V. 305, №3. – P. 401-409. doi: 10.1006/jmbi.2000.4279.

389. Lobanov, M.Y. The Ising model for prediction of disordered residues from protein sequence alone./ M.Y. Lobanov, O.V. Galzitskaya // Phys. Biol. – 2011. – V. 8, №3. – P. 035004. doi: 10.1088/1478-3975/8/3/035004.

390. Lobanov, M.Y. IsUnstruct: prediction of the residue status to be ordered or disordered in the protein chain by a method based on the Ising model./ M.Y. Lobanov, I.V. Sokolovskiy, O.V. Galzitskaya // J. Biomol. Struct. Dyn. – 2013. – V. 31, №10. – P. 1034-1043. doi: 10.1080/07391102.2012.718529.

391. Lomakin, A. On the nucleation and growth of amyloid beta-protein fibrils: detection of nuclei and quantitation of rate constants./ A. Lomakin, D.S. Chung, G.B. Benedek, D.A. Kirschner, D.B. Teplow // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1996. – V. 93, – P. 1125-1129 doi: 10.1073/pnas.93.3.1125.

392. Lourenço, B.N. Wettability influences cell behavior on superhydrophobic surfaces with different topographies./ B.N. Lourenço, G. Marchioli, W. Song, R.L. Reis, C.A. van Blitterswijk, M. Karperien, A. van Apeldoorn, J.F. Mano // Biointerphases. – 2012. – V. 7, №1-4. – P. 46. doi: 10.1007/s13758-012-0046-6.

393. Lu, H. Unfolding of titin immunoglobulin domains by steered molecular dynamics simulation./ H. Lu, B. Isralewitz, A. Krammer, V. Vogel, K. Schulten // Biophys J. – 1998. – V.75, №2. – P. 662-671. doi: 10.1016/S0006-3495(98)77556-3.

394. Lu, Y. The motif of human cardiac myosin-binding protein C is required for its Ca^{2+}-dependent interaction with calmodulin./ Y. Lu, A.H. Kwan, C.M. Jeffries, J.M. Guss, J. Trewhella // J. Biol. Chem. – 2012. – V. 287, №37. – P. 31596-31607.

395. Luan, B.W. Cooperative cold denaturation: the case of the C-terminal domain of ribosomal protein L9./ B.W. Luan, B. Shan, C. Baiz, A. Tokmakoff, D.P. Raleigh // Biochemistry. – 2013. – V. 52, №14. – P. 2402-2409. doi: 10.1021/bi3016789.

396. Lührs, T. 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils./ T. Lührs, C. Ritter, M. Adrian, D. Riek-Loher, B. Bohrmann, H. Döbeli, D. Schubert, R. Riek // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2005. – V. 102, №48. 17342-17347. doi: 10.1073/pnas.0506723102.

397. Luo, X.D. Macromolecular crowding favors the fibrillization of β2-microglobulin by accelerating the nucleation step and inhibiting fibril disassembly./ X.D. Luo, F.L. Kong, H.B. Dang, J. Chen, Y. Liang // Biochim. Biophys. Acta. – 2016. – V. 1864, №11. – P. 1609-1619. doi: 10.1016/j.bbapap.2016.07.012.

398. Ma, B. Macromolecular crowding modulates the kinetics and morphology of amyloid self-assembly by beta-lactoglobulin./ B. Ma, J. Xie, L. Wei, W. Li // Int. J. Biol. Macromol. – 2013. – V. 53, – P. 82-87. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2012.11.008.

399. Mackay, J.P. The Hydrophobin EAS is Largely Unstructured in Solution and Functions by Forming Amyloid-like Structures./ J.P. Mackay, J.M. Matthews, R.D. Winefield, L.G. Mackay, R.G. Haverkamp, M.D. Templeton // Structure. – 2001. – V. 9, №2. – P. 83-91. doi: 10.1016/s0969-2126(00)00559-1.

400. Madine, J. Structural insights into the polymorphism of amyloid-like fibrils formed by region 20-29 of amylin revealed by solid-state NMR and X-ray fiber diffraction./ J. Madine, E. Jack, P.G. Stockley, S.E. Radford, L.C. Serpell, D.A. Middleton // J. Am. Chem. Soc. – 2008. – V. 130, №45. – P. 14990-5001. doi: 10.1021/ja802483d.

401. Maezawa, I. Congo red and thioflavin-T analogs detect Abeta oligomers./ I. Maezawa, H.S. Hong, R. Liu, C.Y. Wu, R.H. Cheng, M.P. Kung, H.F. Kung, K.S. Lam, S. Oddo, F.M. Laferla, L.W. Jin // J. Neurochem. – 2008. – V. 104, №2. – P. 457-468. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04972.x.

402. Maher, P. Zeugmatin: A new high molecular weight protein associated with Z-lines in adult and early embryonic striated muscle./ P. Maher, G.F. Cox, S.J. Singer // J. Cell Biol. – 1985. – V. 101, №5. Pt 1. – P. 1871-1883. doi: 10.1083/jcb.101.5.1871.

403. Maji, S.K. Amyloid as a depot for the formulation of long-acting drugs./ S.K. Maji, D. Schubert, C. Rivier, S. Lee, J.E. Rivier, R. Riek // PLoS Biol. – 2008. – V. 6, №2. – P. e17. doi: 10.1371/journal.pbio.0060017.

404. Maji, S.K. Functional Amyloids as Natural Storage of Peptide Hormones in Pituitary Secretory Granules./ S.K. Maji, M.H. Perrin, M.R. Sawaya, S. Jessberger, K. Vadodaria, R.A. Rissman, P.S. Singru, K.P. Nilsson, R. Simon, D. Schubert, D. Eisenberg, J. Rivier, P. Sawchenko, W. Vale, R. Riek // Science. – 2009. – V. 325, №5938. – P. 328-332. doi: 10.1126/science.1173155.

405. Majumdar, R. Effects of salts from the hofmeister series on the conformational stability, aggregation propensity, and local flexibility of an IgG1 monoclonal antibody./ R. Majumdar, P. Manikwar, J.M. Hickey, H.S. Samra, H.A. Sathish, S.M. Bishop, C.R. Middaugh, D.B. Volkin, D.D. Weis // Biochemistry. – 2013. – V. 52, №19. – P. 3376-3389. doi: 10.1021/bi400232p.

406. Makhnovskii, P.A. Regulation of Proteins in Human Skeletal Muscle: The Role of Transcription./ P.A. Makhnovskii, V.G. Zgoda, R.O. Bokov, E.I. Shagimardanova, G.R. Gazizova, O.A. Gusev, E.A. Lysenko, F.A. Kolpakov, O.L. Vinogradova, D.V. Popov // Sci. Rep. – 2020. – V. 10, №1. – P. 3514. doi: 10.1038/s41598-020-60578-2.

407. Makin, O.S. X-ray diffraction studies of amyloid structure./ O.S. Makin, L.C. Serpell // Methods Mol. Biol. – 2005a. – V. 299, – P. 67-80. doi: 10.1385/1-59259-874-9:067.

408. Makin, O.S. Structures for amyloid fibrils./ O.S. Makin, L.C. Serpell // FEBS J. – 2005b. – V. 272, №23. – P. 5950-5961. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.05025.x.

409. Marsagishvili, L. New amyloid-forming proteins./ L. Marsagishvili, M. Shpagina, V. Emelyanenko, Z. Podlubnaya // FEBS J. – 2005. – V. 272, № s1. – P. 297.

410. Maruyama, K. Connectin, an elastic protein of muscle. Identification of "titin" with connectin./ K. Maruyama, S. Kimura, K. Ohashi, Y. Kuwano // J Biochem. – 1981. – V. 89, №3. – P. 701-709. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133249.

411. Mason, B.D Effect of pH and light on aggregation and conformation of an IgG1 mAB./ B.D. Mason, C. Schoneich, B.A. Kerwin // Mol. Pharm. – 2012. – V. 9, №4. – P. 774-790. doi: 10.1021/mp2004719.

412. Matsumura, S. Two distinct amyloid beta-protein (Ab) assembly pathways leading to oligomers and fibrils identified by combined fluorescence correlation spectroscopy, morphology, and toxicity analyses./ S. Matsumura, K. Shinoda, M. Yamada,

S. Yokojima, M. Inoue, T. Ohnishi, T. Shimada, K. Kikuchi, D. Masui, S. Hashimoto, M. Sato, A. Ito, M. Akioka, S. Takagi, Y. Nakamura, K. Nemoto, Y. Hasegawa, H. Takamoto, H. Inoue, S. Nakamura, Y. Nabeshima, D.B. Teplow, M. Kinjo, M. Hoshi // J. Biol. Chem. – 2011. – V. 286, №13. – P. 11555-11562. doi: 10.1074/jbc.M110.181313.

413. Matsuyama, S. Interaction between cardiac myosin-binding protein C and formin Fhod3./ S. Matsuyama, Y. Kage, N. Fujimoto, T. Ushijima, T. Tsuruda, K. Kitamura, A. Shiose, Y. Asada, H. Sumimoto, R. Takeya // Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. – 2018. – V. 115, №19. – P. e4386-e4395. doi: 10.1073/pnas.1716498115.

414. Maurer, M.S. Expert Consensus Recommendations for the Suspicion and Diagnosis of Transthyretin Cardiac Amyloidosis./ M.S. Maurer, S. Bokhari, T. Damy, S. Dorbala, B.M. Drachman, M. Fontana, M. Grogan, A.V. Kristen, I. Lousada, J. Nativi-Nicolau, C. Cristina Quarta, C. Rapezzi, F.L. Ruberg, R. Witteles, G. Merlini // Circ. Heart. Fail. – 2019. – V. 12, №9. – P. e006075. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.119.006075.

415. McCubbin, W.D. Circular-dichroism studies on two murine serum amyloid A proteins./ W.D. McCubbin, C.M. Kay, S. Narindrasorasak, R. Kisilevsky // Biochem. J. – 1988. – V. 256, – P. 775-783. doi: 10.1042/bj2560775.

416. McGrath, M.J. Four and a half LIM protein 1 binds myosin-binding protein C and regulates myosin filament formation and sarcomere assembly./ M.J. McGrath, D.L. Cottle, M.A. Nguyen, J.M. Dyson, I.D. Coghill, P.A. Robinson, M. Holdsworth, B.S. Cowling, E.C. Hardeman, C.A. Mitchell, S. Brown // J. Biol. Chem. – 2006. – V. 281, №11. – P. 7666-7683. doi: 10.1074/jbc.M512552200.

417. McNamara, W. Skeletal myosin binding protein-C: An increasingly important regulator of striated muscle physiology./ W. McNamara, S. Sadayappan // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2018. – V. 660, – P. 121-128. doi: 10.1016/j.abb.2018.10.007.

418. Mearini, G. The ubiquitin–proteasome system in cardiac dysfunction./ G. Mearini, S. Schlossarek, M.S. Willis, L. Carrier // Biochim. Biophys. Acta. – 2008. – V. 1782, №12. – P. 749-763. doi: 10.1016/j.bbadis.2008.06.009.

419. Meehan, S. Amyloid fibril formation by lens crystallin proteins and its implications for cataract formation./ S. Meehan, Y. Berry, B. Luisi, C.M. Dobson, J.A. Carver C.E. MacPhee // J. Biol. Chem. – 2004. – V. 279, – P. 3413-3419. doi: 10.1074/jbc.M308203200.

420. Mehta, S.B. Partial unfolding of a monoclonal antibody: role of a single domain in driving protein aggregation./ S.B. Mehta, J.S. Bee, T.W. Randolph, J.F. Carpenter // Biochemistry. – 2014. – V. 53, №20. – P. 3367-3377. doi: 10.1021/bi5002163.

421. Meliga, S.C. Cold-induced precipitation of a monoclonal IgM: a negative activation enthalpy reaction./ S.C. Meliga, W. Farrugia, P.A. Ramsland, R.J. Falconer // J. Phys. Chem. B. – 2013. – V. 117, №2. – P. 490-494. doi: 10.1021/jp309109k.

422. Meinhardt J, Sachse C, Hortschansky P, Grigorieff N, Fändrich M. Abeta(1-40) fibril polymorphism implies diverse interaction patterns in amyloid fibrils./ J. Meinhardt, C. Sachse, P. Hortschansky, N. Grigorieff, M. Fändrich // J. Mol. Biol. – 2009. – V. 386, №3. – P. 869-877. doi: 10.1016/j.jmb.2008.11.005.

423. Meric, G. Driving forces for nonnative protein aggregation and approaches to predict aggregation-prone regions./ G. Meric, A.S. Robinson, C.J. Roberts // Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng. – 2017. – V. 8, – P. 139-159. doi: 10.1146/annurev-chembioeng-060816-101404.

424. Merlini, G. Molecular mechanisms of amyloidosis./ G. Merlini, V. Bellotti // N. Engl. J. Med. – 2003. – V. 349, – P. 583-596 doi: 10.1056/NEJMra023144.

425. Merlini, G. Systemic immunoglobulin light chain amyloidosis./ G. Merlini, A. Dispenzieri, V. Sanchorawala, S.O. Schönland, G. Palladini, P.N. Hawkins, MA. Gertz// Nat. Rev. Dis. Primers. – 2018. – V. 4, №1. –P. 38. doi: 10.1038/s41572-018-0034-3.

426. Mezhebovsky, T. Enabling freeze-thaw stability of PBS-based formulations of a monoclonal antibody Part I: freeze-thaw stress testing./ T. Mezhebovsky, E. Routhier, P. Sass, Z. Shahrokh // Biopharm. Int. – 2016a. – V. 29, №8. – P. 33-39.

427. Mezhebovsky, T. Enabling freeze-thaw stability of PBS-based formulations of a monoclonal antibody Part II: long-term frozen storage./ T. Mezhebovsky, E. Routhier, P. Sass, Z. Shahrokh // Biopharm Int. – 2016b. – V. 29, – P. 38-47.

428. Miller M., Granzier H., Ehler E., Gregorio C. C.. The Sensitive Giant: the Role of Titin-Based Stretch Sensing Complexes in the Heart./ M. Miller, H. Granzier, E. Ehler, C.C. Gregorio // Trends Cell Biol. – 2004. – V. 14, №3. – P. 119-126. doi: 10.1016/j.tcb.2004.01.003.

429. Minajeva, A. Unfolding of titin domains explains the viscoelastic behavior of skeletal myofibrils./ A. Minajeva, M. Kulke, J.M. Fernandez, W.A. Linke // Biophys. J. – 2001. – V. 80, №3. – P. 1442-1451. doi: 10.1016/S0006-3495(01)76116-4.

430. Miners, J.S. Neprilysin protects against cerebral amyloid angiopathy and Aβ-induced degeneration of cerebrovascular smooth muscle cells./ J.S. Miners, P. Kehoe, S. Love // Brain Pathol. – 2011. – V. 21, №5. – P. 594-605. doi:10.1111/j.1750-3639.2011.00486.x.

431. Misra, P. Mechanistic Insights into the Early Events in the Aggregation of Immunoglobulin Light Chains./ P. Misra, L.M. Blancas-Mejia, M. Ramirez-Alvarado // Biochemistry. – 2019. – V. 58, №29. – P. 3155-3168. doi: 10.1021/acs.biochem.9b00311.

432. Mok, Y.F. Sedimentation velocity analysis of amyloid oligomers and fibrils./ Y.F. Mok, G.J. Howlett // Methods Enzymol. – 2006. – V. 413, – P. 199-217. doi: 10.1016/S0076-6879(06)13011-6.

433. Mok, Y.F. Sedimentation velocity analysis of the size distribution of amyloid oligomers and fibrils./ Y.F. Mok, G.J. Howlett, M.D. Griffin // Methods Enzymol. – 2015. – V. 562, – P. 241-256. doi: 10.1016/bs.mie.2015.06.024.

434. Monsellier, E. Prevention of amyloid-like aggregation as a driving force of protein evolution./ E. Monsellier, F. Chiti // EMBO Rep. – 2007. – V. 8, №8. – P. 737-742. doi: 10.1038/sj.embor.7401034.

435. Moos, C. Interaction of C-protein with myosin, myosin rod and light meromyosin./ C. Moos, G. Offer, R. Starr, P. Bennett // J. Mol. Biol. – 1975. – V. 97, №1. – P. 1-9. doi: 10.1016/s0022-2836(75)80017-9.

436. Moos, C. The binding of skeletal muscle C-protein to F-actin, and its relation to the interaction of actin with myosin subfragment-1./ C. Moos, Mason CM, Besterman

JM, Feng IN, Dubin JH.// J. Mol. Biol. – 1978. – V. 124, №4. – P. 571-586. doi: 10.1016/0022-2836(78)90172-9.

437. Morel, B. A single mutation induces amyloid aggregation in the α-spectrin SH3 domain: analysis of the early stages of fibril formation./ B. Morel, S. Casares, F. Conejero-Lara // J. Mol. Biol. – 2006. – V. 356, – P. 453-468. doi: 10.1016/j.jmb.2005.11.062.

438. Morel, B. The thermodynamic stability of amyloid fibrils studied by differential scanning calorimetry./ B. Morel, L. Varela, F. Conejero-Lara // J. Phys. Chem. B. – 2010. – V. 114, – P. 4010-4019. doi: 10.1021/jp9102993.

439. Morris, A.M. Protein aggregation kinetics, mechanism, and curve-fitting: a review of the literature./ A.M. Morris, M.A. Watzky, R.G. Finke // Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Proteins and Proteomics. – 2009. – V. 1794, №3. – P. 375-397. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.10.016.

440. Morris, K.L. X-ray fibre diffraction studies of amyloid fibrils./ K.L. Morris L.C. Serpell // Methods Mol. Biol. – 2012. – V. 849, – P. 121-135. doi: 10.1007/978-1-61779-551-0_9.

441. Mozziconacci, O. Chemical degradation of proteins in the solid state with a focus on photochemical reactions./ O. Mozziconacci, C. Schoneich // Adv. Drug Delivery Rev. – 2015. – V. 93, – P. 2-13. doi: 10.1016/j.addr.2014.11.016.

442. Mozziconacci, O. Comparative evaluation of the chemical stability of 4 well-defined immunoglobulin G1-Fc glycoforms./ O. Mozziconacci, S. Okbazghi, A.S. More, D.B. Volkin, T. Tolbert, C. Schoneich // J. Pharm. Sci. – 2016a. – V. 105, №2. – P. 575-587. doi: 10.1016/j.xphs.2015.10.024.

443. Mozziconacci, O. Site-specific hydrolysis reaction c-terminal of methionine in met-His during metal-catalyzed oxidation of IgG-1./ O. Mozziconacci, J. Arora, R.T. Toth IV, S.B. Joshi, S. Zhou, D.B. Volkin, C. Schoneich // Mol. Pharm. – 2016b. – V. 13, №4. – P. 1317-1328. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00944.

444. Mues, A. Two Immunoglobulin-like Domains of the Z-Disc Portion of Titin Interact in a Conformation-dependent Way with Telethonin./ A. Mues, P.F.van der Ven,

P. Young, D.O. Fürst, M. Gautel // FEBS Lett. – 1998. – V. 428, №1-2. V. 111-114. doi:10.1016/s0014-5793(98)00501-8.

445. Mukherjee, S. Effect of dehydration on the aggregation kinetics of two amyloid peptides./ S. Mukherjee, P. Chowdhury, F. Gai // J. Phys. Chem. B. – 2009. – V. 113, – P. 531-535.

446. Mukherjee, A. Type 2 diabetes as a protein misfolding disease./ A. Mukherjee, D. Morales-Scheihing, P.C. Butler, C. Soto // Trends Mol. Med. – 2015. – V. 21, №7. – P. 439-449. doi: 10.1016/j.molmed.2015.04.005.

447. Murakami, K. Monoclonal antibody with conformational specificity for a toxic conformer of amyloid β42 and its application toward the Alzheimer's disease diagnosis./ K. Murakami, M. Tokuda, T. Suzuki, Y. Irie, M. Hanaki, N. Izuo Y. Monobe, K. Akagi, R. Ishii, H. Tatebe, T. Tokuda, M. Maeda, T. Kume, T. Shimizu, K. Irie // Sci. Rep. – 2016. – V. 6, – P. 29038. doi: 10.1038/srep29038.

448. Naiki, H. Fluorometric determination of amyloid fibrils *in vitro* using the fluorescent dye, thioflavin T1./ H. Naiki, K. Higuchi, M. Hosokawa, T. Takeda // Anal. Biochem. – 1989. – V. 177, – P. 244-249. doi:10.1016/0003-2697(89)90046-8.

449. Naiki, H. Human amyloidosis, still intractable but becoming curable: The essential role of pathological diagnosis in the selection of type-specific therapeutics./ H. Naiki, Y. Sekijima, M. Ueda, K. Ohashi, Y. Hoshii, M. Shimoda, Y. Ando // Pathol. Int. – 2020. V. 70, №4. – P.– 191-198. doi: 10.1111/pin.12902.

450. Nayak, A. Characterization of subvisible particle formation during the filling pump operation of a monoclonal antibody solution./ A. Nayak, J. Colandene, V. Bradford, M. Perkins // J. Pharm. Sci. – 2011. – V. 100, №10. – P. 4198-204. doi: 10.1002/jps.22676.

451. Neagoe C., Opitz C. A., Makarenko I., Linke W. A. (). Gigantic Variety: Expression Patterns of Titin Isoforms in Striated Muscles and Consequences for Myofibrillar Passive Stiffness./ C. Neagoe, C.A. Opitz, I. Makarenko, W.A. Linke // J. Muscle Res. Cell Motil. – 2003. – V. 24 №2-3. – P. 175-189. doi:10.1023/a:1026053530766.

452. Necci, M. CAID Predictors; DisProt Curators, Tosatto SCE. Critical assessment of protein intrinsic disorder prediction./ M. Necci, D. Piovesan // Nat. Methods. – 2021. – V. 18, №5. – P. 472-481. doi: 10.1038/s41592-021-01117-3.

453. Neergaard, M.S. Viscosity of high concentration protein formulations of monoclonal antibodies of the IgG1 and IgG4 subclass - Prediction of viscosity through protein-protein interaction measurements./ M.S. Neergaard, D.S. Kalonia, H. Parshad, A.D. Nielsen, E.H. Moller, M. van de Weert // Eur. J. Pharm. Sci. – 2013. – V. 49, №3. – P. 400-410. doi: 10.1016/j.ejps.2013.04.019.

454. Neergaard, M.S. Stability of monoclonal antibodies at high-concentration: head-to-head comparison of the IgG1 and IgG4 subclass./ M.S. Neergaard, A.D. Nielsen, H. Parshad, M.V. de Weert // J. Pharm. Sci. – 2014. – V. 103, №1. – P. 115-127. doi: 10.1002/jps.23788.

455. Nelson, R. Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils./ R. Nelson, M.R. Sawaya, M. Balbirnie, A.Ø. Madsen, C. Riekel, R. Grothe, D. Eisenberg // Nature. – 2005. – V. 435, №7043. – P. 773-778. doi: 10.1038/nature03680.

456. Nelson, R. Recent atomic models of amyloid fibril structure./ Nelson, R. Eisenberg, D.// Curr. Opin. Struct. Biol. – 2006. – V. 16, №2. – P. 260-265. doi: 10.1016/j.sbi.2006.03.007.

457. Nemergut, M. Analysis of IgG kinetic stability by differential scanning calorimetry, probe fluorescence and light scattering./ M. Nemergut, G. Žoldák, J.V. Schaefer, F. K. Miškovský kovsky, A. Plückthun, E. Sedlák // Protein Sci. – 2017. – V. 26, №11. – P. 2229-2239. doi: 10.1002/pro.3278.

458. Nick Pace, C. Forces stabilizing proteins./ C. Nick Pace, J.M. Scholtz, G.R.Grimsley // FEBS Lett. – 2014. – V. 588, №14. – P. 2177-2184. doi: 10.1016/j.febslet.2014.05.006.

459. Nicoud, L. Kinetic analysis of the multistep aggregation mechanism of monoclonal antibodies./ L. Nicoud, P. Arosio, M. Sozo, A. Yates, E. Norrant, M. Morbidelli // J. Phys. Chem. B. – 2014. – V. 118, №36. – P. 10595-10606. doi: 10.1021/jp505295j.

460. Nilsson, M.R. Insulin amyloid at injection sites of patients with diabetes / M.R. Nilsson // Amyloid. – 2016. – V. 23, №3. – P. 139-147. doi: 10.1080/13506129.2016.1179183.

461. Nishi, H. Phase separation of an IgG1 antibody solution under a low ionic strength condition./ H. Nishi, M. Miyajima, H. Nakagami, M. Noda, S. Uchiyama, K. Fukui // Pharm. Res. – 2010. – V. 27, №7. – P. 1348-1360. doi: 10.1007/s11095-010-0125-7.

462. Noguchi, H. Chicken breast muscle connectin: passive tension and I-band region primary structure./ H. Noguchi, S. Takemori, J. Kajiwara, M. Kimura, K. Maruyama, S. Kimura // J. Mol. Biol. – 2007. – V. 370, №2. – P. 213–219. doi: 10.1016/j.jmb.2007.04.054.

463. Nomizu, M. Identification of cell binding sites in the laminin alpha 1 chain carboxyl-terminal globular domain by systematic screening of synthetic peptides./ M. Nomizu, W.H. Kim, K. Yamamura, A. Utani, S.Y. Song, A. Otaka, P.P. Roller, H.K. Kleinman, Y. Yamada // J. Biol. Chem. – 1995. – V. 270, №35. – P. 20583-20590. doi: 10.1074/jbc.270.35.20583.

464. Nuvolone, M. Systemic amyloidosis: novel therapies and role of biomarkers./ M. Nuvolone, G. Merlini // Nephrol. Dial. Transplant. – 2017. – V. 32, №5. – P. 770-780. doi: 10.1093/ndt/gfw305.

465. Oberg, K.A. A new attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy method for the study of proteins in solution./ K.A. Oberg, A.L. Fink // Anal. Biochem. – 1998. – V. 256, №1. – P. 92–106. doi: 10.1006/abio.1997.2486.

466. Oberhauser, A.F. Single protein misfolding events captured by atomic force microscopy./ A.F. Oberhauser, P.E. Marszalek, M. Carrion-Vazquez, J.M. Fernandez // Nature Structural & Molecular Biology. – 1999. – V. 6, – P. 1025-1028. doi: 10.1038/14907.

467. Oboroceanu, D. Characterization of beta-lactoglobulin fibrillar assembly using atomic force microscopy, polyacrylamide gel electrophoresis, and in situ fourier transform infrared spectroscopy./ D. Oboroceanu, L. Wang, A. Brodkorb, E. Magner, M.A. Auty // J. Agric. Food Chem. – 2010. – V. 58, №6. – P. 3667-3673. doi: 10.1021/jf9042908.

468. Offer, G. A new protein of the thick filaments of vertebrate skeletal myofibrils: extractions, purification and characterization./ G. Offer, C. Moos, R. Starr // J. Mol. Biol. – 1973. – V. 74, №4. – P. 653-676. doi: 10.1016/0022-2836(73)90055-7.

469. Oh, J. Amyloidogenesis of type III-dependent harpins from plant pathogenic bacteria./ J. Oh, J.G. Kim, E. Jeon, C.H. Yoo, J.S. Moon, S. Rhee, I. Hwang, // J. Biol. Chem. – 2007. – V. 282, №18. – P. 13601-13609. doi: 10.1074/jbc.M602576200.

470. Okagaki, T. The major myosin-binding domain of skeletal muscle MyBP-C (C protein) resides in the COOH-terminal, immunoglobulin C2 motif./ T. Okagaki, F.E. Weber, D.A. Fischman, K.T. Vaughan, T. Mikawa, F.C. Reinach // J. Cell Biol. – 1993. – V. 123, №3. – P. 619-626. doi: 10.1083/jcb.123.3.619.

471. Oliva, A. Fitting bevacizumab aggregation kinetic data with the Finke-Watzky two-step model: Effect of thermal and mechanical stress./ A. Oliva, M. Llabrés, J.B. Fariña // Eur. J. Pharm. Sci. – 2015. – V. 77, – P. 170-179. doi: 10.1016/j.ejps.2015.06.011.

472. Oliveira, C.L. A SAXS study of glucagon fibrillation./ C.L. Oliveira, M.A. Behrens, J.S. Pedersen, K. Erlacher, D. Otzen, J.S Pedersen.// J. Mol. Biol. – 2009. – V. 387, №1. – P. 147-161. doi: 10.1016/j.jmb.2009.01.020.

473. Oliveira, L.M.A. Insights into the molecular mechanism of protein native-like aggregation upon glycation./ L.M.A. Oliveira, R.A. Gomes, D. Yang, S.R. Dennison, C. Familia, A. Lages, A.V. Coelho, R.M. Murphy, D.A. Phoenix, A. Quintas // Biochim. Biophys. Acta. – 2013. – V. 1834, №6. – P. 1010-1022. doi: 10.1016/j.bbapap.2012.12.001.

474. Onuchic, J.N. Theory of protein folding: the energy landscape perspective./ J.N. Onuchic, Z. Luthey-Schulten, P.G. Wolynes // Annu. Rev. Phys. Chem. – 1997. – V. 48, – P. 545-600. doi: 10.1146/annurev.physchem.48.1.545.

475. Ota, C. Assessment of the protein-protein interactions in a highly concentrated antibody solution by using raman spectroscopy./ C. Ota, S. Noguchi, S. Nagatoishi, K. Tsumoto // Pharm. Res. – 2016. – V. 33, №4. – P. 956-969. doi: 10.1007/s11095-015-1842-8.

476. Ottenheijm, C.A. Role of titin in skeletal muscle function and disease./ C.A. Ottenheijm, H. Granzier // Adv. Exp. Med. Biol. – 2010. – V. 682, – P. 105-122. doi: 10.1007/978-1-4419-6366-6_6.

477. Otzen, D. We find them here, we find them there: functional bacterial amyloid./ D. Otzen, P.H. Nielsen // Cell Mol. Life Sci. – 2008. – V. 65, №6. – P. 910-927. doi: 10.1007/s00018-007-7404-4.

478. Otzen, D. Functional amyloid: turning swords into plowshares./ D. Otzen // Prion. – 2010. – V. 4, №4. – P. 256-264. doi: 10.4161/pri.4.4.13676.

479. Oyetayo, O.O. Experimental model system to study pH shift-induced aggregation of monoclonal antibodies under controlled conditions./ O.O. Oyetayo, H. Kiefer // Pharm. Res. – 2016. – V. 33, №6. – P. 1359-1369. doi: 10.1007/s11095-016-1878-4.

480. Ow, S.Y. A brief overview of amyloids and Alzheimer's disease./ S.Y. Ow, D.E. Dunstan // Protein Sci. – 2014. – V. 23, №10. – P. 1315-1331. doi: 10.1002/pro.2524.

481. Owczarz, M. Sulfate anion delays the self-assembly of human insulin by modifying the aggregation pathway./ M. Owczarz, P. Arosio // Biophys. J. – 2014. – V. 107, №1. – P. 197-207. doi: 10.1016/j.bpj.2014.05.030.

482. Pace, C.N. Forces contributing to the conformational stability of proteins./ C.N. Pace, B.A. Shirley, M. McNutt, K. Gajiwala // FASEB J. – 1996. – V. 10, №1. – P. 75-83. doi: 10.1096/fasebj.10.1.8566551.

483. Pande, A. Deamidation of human γS-crystallin increases attractive protein interactions: implications for cataract./ A. Pande, N. Mokhor, J. Pande // Biochemistry. – 2015. – V. 54, №31. – P. 4890-4899. doi: 10.1021/acs.biochem.5b00185.

484. Pal, S. Antioxidant ferulic acid prevents the aggregation of bovine β-lactoglobulin *in vitro*./ S. Pal, S. Maity, S. Sardar, S. Begum, R. Dalui, H. Parvej, K. Bera, A. Pradhan, N. Sepay, S. Paul, U.C. Halder // J. Chem. Sci. – 2020. – V. 132, №103. doi: 10.1007/s12039-020-01796-z.

485. Papanikolopoulou, K. Amyloid fibril formation from sequences of a natural beta-structured fibrous protein, the adenovirus fiber./ K. Papanikolopoulou, G. Schoehn,

V. Forge, V.T. Forsyth, C. Riekel, J.F. Hernandez, R.W. Ruigrok, A. Mitraki // J. Biol. Chem. – 2005. – V. 280, №4. – P. 2481-2490. doi: 10.1074/jbc.M406282200.

486. Pardeshi, N.N. Microparticles and nanoparticles delivered in intravenous saline and in an intravenous solution of a therapeutic antibody product./ N.N. Pardeshi, W. Qi, K. Dahl, L. Caplan, J.F. Carpenter // J. Pharm. Sci. – 2017. – V. 106, №2. – P. 511-520. doi: 10.1016/j.xphs.2016.09.028.

487. Parsons, J.T. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension./ J.T. Parsons, A.R. Horwitz, M.A. Schwartz // Nature reviews. – 2010. – V. 11, №9. – P. 633-643. doi: 10.1038/nrm2957.

488. Pardee, J.D. Purification of muscle actin./ J.D. Pardee, J.A. Spudich // Methods Enzymol. 1982;85 Pt B:164-81. doi: 10.1016/0076-6879(82)85020-9. PMID: 7121269.

489. Paul, A.J. Fluorescence dye-based detection of mAb aggregates in CHO culture supernatants./ A.J. Paul, K. Schwab, N. Prokoph, E. Haas, R. Handrick, F. Hesse // Anal. Bioanal. Chem. – 2015. – V. 407, №16 – P. 4849-4856. doi: 10.1007/s00216-015-8672-8.

490. Paul, A.J. High-throughput analysis of sub-visible mAb aggregate particles using automated fluorescence microscopy imaging./ A.J. Paul, F. Bickel, M. Rohm, L. Hospach, B. Halder, N. Rettich, R. Handrick, E.M. Herold, H. Kiefer, F. Hesse // Anal. Bioanal. Chem. – 2017. – V. 409, №17. – P. 4149-4156. doi: 10.1007/s00216-017-0362-2.

491. Pauling, L. Two rippled-sheet configurations of polypeptide chains, and a note about the pleated sheets./ L. Pauling, R.B. Corey // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1953. – V. 39, №4. – P. 253-256. doi: 10.1073/pnas.39.4.253.

492. Pavišić, R. Differences between reversible (self-association) and irreversible aggregation of rHuG-CSF in carbohydrate and polyol formulations./ R. Pavišić, I. Dodig, A. Horvatić, L. Mijić, M. Sedić, M.R. Linarić, I.G. Sovulj, T. Preočanin, M.B. Krajačić, M. Cindrić // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2010. – V. 76, №3. – P. 357-365. doi: 10.1016/j.ejpb.2010.09.006.

493. Peckham, M. Constitutive and variable regions of Z-disk titin/connectin in myofibril formation: a dominant-negative screen./ M. Peckham, P. Young, M. Gautel // Cell Struct. Funct. – 1997. – V. 22, №1. – P. 95-101. doi: 10.1247/csf.22.95.

494. Pepys, M.B. Pathogenesis, diagnosis and treatment of systemic amyloidosis./ Pepys, M.B. // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. – 2001. – V. 356, №1406. – P. 203-210. Discussion 210-211. doi: 10.1098/rstb.2000.0766.

495. Perchiacca, J.M. Mutational analysis of domain antibodies reveals aggregation hotspots within and near the complementarity determining regions./ J.M. Perchiacca, M. Bhattacharya, P.M. Tessier // Proteins. – 2011. – V. 79, №9. – P. 2637-2647. doi: 10.1002/prot.23085.

496. Persichilli, C. Does thioflavin-T detect oligomers formed during amyloid fibril assembly./ C. Persichilli, S.E. Hill, J. Mast, M. Muschol // Biophys. J. – 2011. – V. 100, – P. 538a. doi: 10.1016/j.bpj.2010.12.3140.

497. Petkova, A.T. A structural model for Alzheimer's beta-amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR./ A.T. Petkova, Y. Ishii, J.J. Balbach, O.N. Antzutkin, R.D. Leapman, F. Delaglio, R. Tycko // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2002. – V. 99, №26. – P. 16742-16747. doi: 10.1073/pnas.262663499.

498. Petkova, A.T. Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils./ A.T. Petkova, R.D. Leapman, Z. Guo, W.M. Yau, M.P. Mattson, R. Tycko // Science. – 2005. – V. 307, №5707. – P. 262-265. doi: 10.1126/science.1105850.

499. Pfuhl, M. Tertiary structure of an immunoglobulin-like domain from the giant muscle protein titin: a new member of the I set./ M. Pfuhl, A. Pastore // Structure. – 1995. – V. 3, №4. – P. 391-401. doi: 10.1016/s0969-2126(01)00170-8.

500. Pham, C.L. Sedimentation velocity analysis of amyloid fibrils./ C.L. Pham, Y.F. Mok, G.J. Howlett // Methods Mol. Biol. – 2011. – V. 752, – P.179-196. doi: 10.1007/978-1-60327-223-0_12.

501. Pham, C.L. Functional amyloid: widespread in Nature, diverse in purpose./ C.L. Pham, A.H. Kwan, M. Sunde, // Essays Biochem. – 2014. – V. 56, – P. 207-219. doi: 10.1042/bse0560207.

502. Picken, M.M. Alect2 amyloidosis: primum non nocere (first, do no harm)./ M.M. Picken // Kidney Int. – 2014. – V. 86, №2. – P. 229-232. doi: 10.1038/ki.2014.45.

503. Picken, M.M. The Pathology of Amyloidosis in Classification: A Review./ M.M. Picken // Acta Haematol. – 2020. – V. 143, №4. – P. 322-334. doi: 10.1159/000506696.

504. Pindrus, M. Solubility Challenges in High Concentration Monoclonal Antibody Formulations: Relationship with Amino Acid Sequence and Intermolecular Interactions./ M. Pindrus, S.J. Shire, R.F. Kelley, B. Demeule, R. Wong, Y. Xu, S. Yadav // Mol. Pharm. – 2015. – V. 12, №11. – P. 3896-3907. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00336.

505. Planinc, A. Glycan characterization of biopharmaceuticals: Updates and perspectives./ A. Planinc, J. Bones, B. Dejaegher, P. Van Antwerpen, C. Delporte // Anal. Chim. Acta. – 2016. –V. 921, – P. 13-27. doi: 10.1016/j.aca.2016.03.049.

506. Podrabsky, J.E. Survival of water stress in annual fish embryos: dehydration avoidance and egg envelope amyloid fibers./ J.E. Podrabsky, J.F. Carpenter, S.C. Hand // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2001. – V. 280, №1. – P. R123–R131. doi: 10.1152/ajpregu.2001.280.1.R123.

507. Ponsonnet, L. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour./ L. Ponsonnet, K. Reybier, N. Jaffrezic, V. Comte, C. Lagneau, M. Lissac, C. Martelet // Mater. Sci. Eng. – 2003. – V. 23, – P. 551-560. doi: 10.1016/S0928-4931(03)00033-X.

508. Pot, S.A. Nanoscale topography-induced modulation of fundamental cell behaviors of rabbit corneal keratocytes, fibroblasts, and myofibroblasts./ S.A. Pot, S.J. Liliensiek, K.E. Myrna, E. Bentley, J.V. Jester, P.F. Nealey, C.J. Murphy, J.M. Christopher // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2010. – V. 51, №3. – P. 1373-1381. doi: 10.1167/iovs.09-4074.

509. Psonka-Antonczyk, K.M. Nanoscale structure and spectroscopic probing of Aβ1-40 fibril bundle formation./ K.M. Psonka-Antonczyk, P. Hammarström, L.B. Johansson, M. Lindgren, B.T. Stokke, K.P. Nilsson, S. Nyström // Front. Chem. – 2016. – V. 4, – P. 44. doi: 10.3389/fchem.2016.00044.

510. Prado, L.G. Isoform diversity of giant proteins in relation to passive and active contractile properties of rabbit skeletal muscles./ L.G. Prado, I. Makarenko, C. Andresen, M. Krüger, C.A. Opitz, W.A. Linke // J. Gen. Physiol. – 2005. – V. 126. №5. – P. 461-480. doi: 10.1085/jgp.200509364.

511. Privalov, P.L. Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins./ P.L. Privalov, S.A. Potekhin // Methods Enzymol. – 1986. – V. 131, – P. 4–51. doi: 10.1016/0076-6879(86)31033-4.

512. Puchner, E.M. Mechanoenzymatics of titin kinase./ E.M. Puchner, A. Alexandrovich, A.L. Kho, U. Hensen, L.V. Schäfer, B. Brandmeier, F. Gräter, H. Grubmüller, H.E. Gaub, M. Gautel // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2008. – V. 105, №36. – P. 13385-13390. doi: 10.1073/pnas.0805034105. Erratum in: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2008. – V. 105, №52. – P. 21045.

513. Pulze, L. NET amyloidogenic backbone in human activated neutrophils./ L. Pulze, B. Bassani, E. Gini, P. D'Antona, A. Grimaldi, A. Luini, F. Marino, D.M. Noonan, G. Tettamanti, R. Valvassori, M. de Eguileor // Clin. Exp. Immunol. – 2016. – V. 183, №3. – P. 469-479. doi: 10.1111/cei.12730.

514. Radmanovic, N. Understanding the freezing of biopharmaceuticals: First-principle modeling of the process and evaluation of its effect on product quality./ N. Radmanovic, T. Serno, S. Joerg, O. Germershaus // J. Pharm. Sci. – 2013. – V. 102, №8. – P. 2495-2507. doi: 10.1002/jps.23642.

515. Raimondi, S. Effects of the known pathogenic mutations on the aggregation pathway of the amyloidogenic peptide of apolipoprotein A-1./ S. Raimondi, F. Guglielmi, S. Giorgetti, S. di Gaetano, A. Arciello, D.M. Monti, A. Relini, D. Nichino, S.M. Doglia, A. Natalello, P. Pucci, P. Mangione, L. Obici, G. Merlini, M. Stoppini, P. Robustelli, G.G. Tartaglia, M. Vendruscolo, C.M. Dobson, R. Piccoli, V. Bellotti // J. Mol. Biol. – 2011. – V. 407, №3. – P. 465-476. doi: 10.1016/j.jmb.2011.01.044.

516. Ramakrishna, D. Hydrophobic collapse overrides Coulombic repulsion in ferricytochrome c fibrillation under extremely alkaline condition./ D. Ramakrishna, M.D. Prasad, A.K. Bhuyan // Arch. Biochem. Biophys. – 2012. – V. 528, №1. – P. 67-71. doi: 10.1016/j.abb.2012.08.013.

517. Ranganathan, S. Molecular interpretation of ACTH–β-endorphin coaggregation: relevance to secretory granule biogenesis./ S. Ranganathan, P.K. Singh, U. Singh, P.S. Singru, R. Padinhateeri, S.K. Maji // PLoS One. – 2012. – V. 7, №3. – P. e31924. doi: 10.1371/journal.pone.0031924.

518. Ramshini, H. Large proteins have a great tendency to aggregate but a low propensity to form amyloid fibrils./ H. Ramshini, C. Parrini, A. Relini, M. Zampagni, B. Mannini, A. Pesce, A.A. Saboury, M. Nemat-Gorgani, F. Chiti // PloS One. – 2011. – V. 6, №1. – P. e16075. doi: 10.1371/journal.pone.0016075.

519. Rashno, F. Very rapid amyloid fibril formation by a bacterial lipase in the absence of a detectable lag phase./ F. Rashno, K. Khajeh, C. Capitini, R.H. Sajedi, M.M. Shokri, F. Chiti // Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom. – 2017. – V. 1865, №6. – P. 652-663. doi: 10.1016/j.bbapap.2017.03.004.

520. Rasmussen, J. Amyloid polymorphisms constitute distinct clouds of conformational variants in different etiological subtypes of Alzheimer's disease./ J. Rasmussen, J. Mahler, N. Beschorner, S.A. Kaeser, L.M. Häsler, F. Baumann, S. Nyström, E. Portelius, K. Blennow, T. Lashley, N.C. Fox, D. Sepulveda-Falla, M. Glatzel, A.L. Oblak, B. Ghetti, K.P.R. Nilsson, P. Hammarström, M. Staufenbiel, L.C. Walker, M. Jucker // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2017. – V. 114, №49. – P. 13018-13023. doi: 10.1073/pnas.1713215114.

521. Ratanji, K.D. Subvisible aggregates of immunogenic proteins promote a th1-type response./ K.D. Ratanji, R.J. Dearman, I. Kimber, R. Thorpe, M. Wadhwa, J.P. Derrick // Toxicol. Sci. – 2016. – V. 153, №2. – P. 258-270. doi: 10.1093/toxsci/kfw121.

522. Raut, A.S. Opalescence in monoclonal antibody solutions and its correlation with intermolecular interactions in dilute and concentrated solutions./ A.S. Raut, D.S. Kalonia // J. Pharm. Sci. – 2015a. – V. 104, №4. – P. 1263-1274. doi: 10.1002/jps.24326.

523. Raut, A.S. Effect of excipients on liquid-liquid phase separation and aggregation in dual variable domain immunoglobulin protein solutions./ A.S. Raut, D.S. Kalonia // Mol. Pharm. – 2016b. – V. 13, №3. – P. 774-783. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00668.

524. Rayfield, W.J. Impact of freeze/thaw process on drug substance storage of therapeutics./ W.J. Rayfield, S. Kandula, H. Khan, N. Tugcu //J. Pharm. Sci. – 2017. – V. 106, №8. – P. 1944-1951. doi: 10.1016/j.xphs.2017.03.019.

525. Reiche, K. Liquid-liquid phase separation of a monoclonal antibody at low ionic strength: Influence of anion charge and concentration./ K. Reiche, J. Hartl, A. Blume, P. Garidel // Biophys. Chem. – 2017. – V. 220, – P. 7-19. doi: 10.1016/j.bpc.2016.08.003.

526. Reichert, D. New insights into the interaction of proteins and disaccharides-The effect of pH and concentration./ D. Reichert, S. Gröger, C. Hackel // Biopolymers. – 2017. – V. 107, №2. – P. 39-45. doi: 10.1002/bip.22990.

527. Reinsch, H. Examining the freezing process of an intermediate bulk containing an industrially relevant protein./ H. Reinsch, O. Spadiut, J. Heidingsfelder, C. Herwig // Enzyme Microb. Technol. – 2015. – V. 71, – P. 13-19. doi: 10.1016/j.enzmictec.2015.01.003.

528. Rezaei, H. Amyloidogenic unfolding intermediates differentiate sheep prion protein variants./ H. Rezaei, Y. Choiset, F. Eghiaian, E. Treguer, P. Mentre, P. Debey, J. Grosclaude, T. Haertle // J. Mol. Biol. – 2002. – V. 322, – P. 799-814. doi: 10.1016/S0022-2836(02)00856-2.

529. Rief, M. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM./ M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J.M. Fernandez, H.E. Gaub // Science. – 1997. – V. 276, №5315. – P. 1109-1112. doi: 10.1126/science.276.5315.1109.

530. Ritter, C. Correlation of structural elements and infectivity of the HET-s prion./ C. Ritter, M.L. Maddelein, A.B. Siemer, T. Lührs, M. Ernst, B.H. Meier, S.J. Saupe, R. Riek // Nature. – 2005. – V. 435, №7043. – P. 844-848. doi: 10.1038/nature03793.

531. Rivas-Pardo, J.A. Work done by titin protein folding assists muscle contraction./ J.A. Rivas-Pardo, E.C. Eckels, I. Popa, P. Kosuri, W.A. Linke, J.M. Fernández // Cell Rep. – 2016. – V. 14, №6. – P. 1339-1347. doi: 10.1016/j.celrep.2016.01.025.

532. Rochet, J.C. Amyloid fibrillogenesis: themes and variations./ J.C. Rochet, P.T. Jr Lansbury // Curr. Opin. Struct. Biol. – 2000. – V. 10, №1. – P. 60-68. doi: 10.1016/s0959-440x(99)00049-4.

533. Roefs, S.P. A model for the denaturation and aggregation of β-lactoglobulin./ S.P. Roefs, K.G. de Kruif // Eur. J. Biochem. – 1994. – V. 226, №3. – P. 883-889. doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.00883.x.

534. Roessl, U. Design of experiments reveals critical parameters for pilot-scale freeze-and-thaw processing of L-lactic dehydrogenase./ U. Roessl, S. Humi, S. Leitgeb, B. Nidetzky // Biotechnol. J. – 2015. – V. 10, №9. – P. 1390-1399. doi: 10.1002/biot.201400766.

535. Röhr, D. Label-free vibrational imaging of different Aβ plaque types in Alzheimer's disease reveals sequential events in plaque development./ D. Röhr, B.D.C. Boon, M. Schuler, K. Kremer, J.J.M. Hoozemans, F.H. Bouwman, S.F. El-Mashtoly, A. Nabers, F. Großerueschkamp, A.J.M. Rozemuller, K. Gerwert // Acta Neuropathol. Commun. – 2020. – V. 8, №1. – P. 222. doi: 10.1186/s40478-020-01091-5.

536. Römling, U. Curli fibers are highly conserved between Salmonella typhimurium and Escherichia coli with respect to operon structure and regulation./ U. Römling, Z. Bian, M. Hammar, W.D. Sierralta, S. Normark // J. Bacteriol. – 1998. – V. 180, №3. – P. 722-731. doi: 10.1128/JB.180.3.722-731.1998.

537. Ross, P.L. Physical and Chemical Stability of Antibody Drug Conjugates: Current Status./ P.L. Ross, J.L. Wolfe // J. Pharm. Sci. – 2016. – V. 105, №2. – P. 391-397. doi: 10.1016/j.xphs.2015.11.037.

538. Roughton, B.C. Protein aggregation and lyophilization: Protein structural descriptors as predictors of aggregation propensity./ B.C. Roughton, L.K. Iyer, E. Bertelsen, E.M. Topp, K.V. Camarda // Comput. Chem. Eng. – 2013. – V. 58, – P. 369-377. doi: 10.1016/j.compchemeng.2013.07.008.

539. Ruggeri, F.S. Influence of the β-sheet content on the mechanical properties of aggregates during amyloid fibrillization./ F.S. Ruggeri, J. Adamcik, J.S. Jeong, H.A. Lashuel, R. Mezzenga, G. Dietler // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. – 2015. – V. 54, №8. – P. 2462-2466. doi: 10.1002/anie.201409050.

540. Ruzali, W.A. Influence of LRP-1 and apolipoprotein E on amyloid-β uptake and toxicity to cerebrovascular smooth muscle cells./ W.A. Ruzali, P.G. Kehoe, S. Love // J. Alzheimers. Dis. – 2013. – V. 33, №1. – P. 95-110. doi:10.3233/JAD-2012-121336.

541. Rygula, A. Raman spectroscopy of proteins: a review./ A. Rygula, K. Majzner, K.M. Marzec, A. Kaczor, M. Pilarczyk, M. Baranska // J. Raman Spectrosc.– 2013. – V. 44, №8. – P. 1061-1076. doi: 10.1002/jrs.4335

542. Sabate, R. The role of protein sequence and amino acid composition in amyloid formation: Scrambling and backward reading of IAPP amyloid fibrils./ R. Sabate, A. Espargaro, N.S. de Groot, J.J. Valle-Delgado, X. Fernandez-Busquets, S. Ventura // J. Mol. Biol. – 2010. – V. 404, №2. – P. 337-352. doi: 10.1016/j.jmb.2010.09.052.

543. Sabate, R. Native structure protects SUMO proteins from aggregation into amyloid fibrils./ R. Sabate, A. Espargaro, R. Grana-Montes, D. Reverter, S. Ventura // Biomacromolecules. – 2012. – V. 13, №6. – P. 1916-1926. doi: 10.1021/bm3004385.

544. Sachse, C. Paired beta-sheet structure of an Abeta(1-40) amyloid fibril revealed by electron microscopy./ C. Sachse, M. Fändrich, N. Grigorieff // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2008. – V. 105, №21. – P. 7462-7466. doi: 10.1073/pnas.0712290105.

545. Saggu, M. Identification of subvisible particles in biopharmaceutical formulations using raman spectroscopy provides insight into polysorbate 20 degradation pathway./ M. Saggu, J. Liu, A. Patel // Pharm. Res. – 2015. – V. 32, №9. – P. 2877-2888. doi: 10.1007/s11095-015-1670-x.

546. Sahin, E. Aggregation and pH-temperature phase behavior for aggregates of an IgG2 antibody./ E. Sahin, W.F. Weiss 4th, A.M. Kroetsch, K.R. King, R.K. Kessler, T.K. Das, C.J. Roberts // J. Pharm. Sci. – 2012. – V. 101, №5. – P. 1678-1687. doi: 10.1002/jps.23056.

547. Sahin, Z. Global kinetic analysis of seeded BSA aggregation./ Z. Sahin, Y.K. Demir, V. Kayser // Eur. J. Pharm. Sci. – 2016. – V. 86, – P. 115-124. doi: 10.1016/j.ejps.2016.03.007.

548. Sahoo, B. Fluorescence correlation spectroscopy: a tool to study protein oligomerization and aggregation *in vitro* and *in vivo*./ B. Sahoo, K.W. Drombosky, R. Wetzel // Methods Mol. Biol. – 2016. – V. 1345, – P. 67-87. doi: 10.1007/978-1-4939-2978-8_5.

549. Saibil, H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation./ H. Saibil // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. – 2013. – V. 14, №10. – P. 630-642. doi: 10.1038/nrm3658.

550. Saito, S. Effects of ionic strength and sugars on the aggregation propensity of monoclonal antibodies: Influence of colloidal and conformational stabilities./ S. Saito, J. Hasegawa, N. Kobayashi, T. Tomitsuka, S. Uchiyama, K. Fukui // Pharm. Res. – 2013. – V. 30, №5. – P. 1263-1280. doi: 10.1007/s11095-012-0965-4.

551. Salinas, B.A. Understanding and modulating opalescence and viscosity in a monoclonal antibody formulation./ B.A. Salinas, H.A. Sathish, S.M. Bishop, N. Harn, J.F. Carpenter, T.W. Randolph // J. Pharm. Sci. – 2010. – V. 99, №1. – P. 82-93. doi: 10.1002/jps.21797.

552. Saluja, A. Significance of unfolding thermodynamics for predicting aggregation kinetics: a case study on high concentration solutions of a multi-domain protein./ A. Saluja, V. Sadineni, A. Mungikar, V. Nashine, A. Kroetsch, C. Dahlheim, V.M. Rao // Pharm. Res. – 2014. – V. 31, №6. – P. 1575-1587. doi: 10.1007/s11095-013-1263-5.

553. Sant'Anna, R. Characterization of Amyloid Coresin Prion Domains./ R. Sant'Anna, M. Fernández, C. Batlle, S. Navarro, N.S. DeGroot, L. Serpell, S. Ventura // Sci. Rep. – 2016. – V. 6, – P. 34274. doi: 10.1038/srep34274.

554. Sarikas, A. Impairment of the ubiquitin–proteasome system by truncated cardiac myosin binding protein C mutants./ A. Sarikas, L. Carrier, C. Schenke, D. Doll, J. Flavigny, K.S. Lindenberg, T. Eschenhagen, O. Zolk // Cardiovasc. Res. – 2005. – V. 66, №1. – P. 33-44. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.01.004.

555. Sarsoza, F. A fibril-specific, conformation-dependent antibody recognizes a subset of Abeta plaques in Alzheimer disease, Down syndrome and Tg2576 transgenic mouse brain./ F. Sarsoza, T. Saing, R. Kayed, R. Dahlin, M. Dick, C. Broadwater-Hollifield, S. Mobley, I. Lott, E. Doran, D. Gillen, C. Anderson-Bergman, D.H. Cribbs, C. Glabe, E. Head // Acta Neuropathol. – 2009. – V. 118, №4. – P. 505-517. doi: 10.1007/s00401-009-0530-3.

556. Saupe, S.J. Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous ascomycetes./ S.J. Saupe // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2000. – V. 64, №3. – P. 489-502. doi: 10.1128/MMBR.64.3.489-502.2000.

557. Sawaya, M.R. Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers./ M.R. Sawaya, S. Sambashivan, R. Nelson, M.I. Ivanova, S.A. Sievers, M.I. Apostol, M.J. Thompson, M. Balbirnie, J.J. Wiltzius, H.T. McFarlane, A.Ø. Madsen, C. Riekel, D. Eisenberg // Nature. – 2007. – V. 447, №7143. – P. 453-457. doi: 10.1038/nature05695.

558. Sawyer, E.B. The Assembly of Individual Chaplin Peptides from Streptomyces coelicolor into Functional Amyloid Fibrils./ E.B. Sawyer, D. Claessen, M. Haas, B. Hurgobin, S.L. Gras, // PLoS ONE. – 2011. – V. 6, №4. – P. e18839. doi: 10.1371/journal.pone.0018839.

559. Scarlett, G. Circular dichroism for the analysis of protein-DNA interactions./ G. Scarlett, G. Siligardi, G.G. Kneale // Methods Mol. Biol. – 2015. – V. 1334, – P. 299-312. doi: 10.1007/978-1-4939-2877-4_19.

560. Schafer, S. Titin-truncating variants affect heart function in disease cohorts and the general population./ S. Schafer, A. de Marvao, E. Adami, L.R. Fiedler, B. Ng, E. Khin, O.J. Rackham, S. van Heesch, C.J. Pua, M. Kui, R. Walsh, U. Tayal, S.K. Prasad, T.J. Dawes, N.S. Ko, D. Sim, L.L. Chan, C.W. Chin, F. Mazzarotto, P.J. Barton, F. Kreuchwig, D.P. de Kleijn, T. Totman, C. Biffi, N. Tee, D. Rueckert, V. Schneider, A. Faber, V. Regitz-Zagrosek, J.G. Seidman, C.E. Seidman, W.A. Linke, J.P. Kovalik, D. O'Regan, J.S. Ware, N. Hubner, S.A. Cook // Nat. Genet. – 2017. – V.49, №1. – P. 46-53. doi: 10.1038/ng.3719.

561. Schakenraad, J.M. In vivo quantification of cell polymer interactions./ J.M. Schakenraad, J.H. Kuit, J. Arends, H.J. Busscher, J. Feijen, C.R.H. Wildevuur // Biomaterials. – 1987. – V. 8, №3. – P. 207-210. doi: 10.1016/0142-9612(87)90065-2.

562. Schakenraad, J.M. Cell–polymer interactions: The influence of protein adsorption./ J.M. Schakenraad, H.J. Busscher // Colloids Surf. – 1989. – V. 42, №3-4. – P. 331-343. doi: 10.1016/0166-6622(89)80349-X.

563. Scheidt, H.A. Solid-state NMR spectroscopic investigation of Aβ protofibrils: implication of a β-sheet remodeling upon maturation into terminal amyloid fibrils./ H.A. Scheidt, I. Morgado, S. Rothemund, D. Huster, M. Fändrich // Angew. Chem. Int. Ed. (Engl.) – 2011. – V. 50, – P. 2837-2840. doi: 10.1002/anie.201007265.

564. Schermeyer, M.T. Characterization of highly concentrated antibody solution - A toolbox for the description of protein long-term solution stability./ M.T. Schermeyer, A.K. Woll, B. Kokke, M. Eppink, J. Hubbuch // MAbs. – 2017. – V. 9, №7. – P. 1169-1185. doi: 10.1080/19420862.2017.1338222.

565. Scherzer-Attali, R. Generic inhibition of amyloidogenic proteins by two naphthoquinone-tryptophan hybrid molecules./ R. Scherzer-Attali, R. Shaltiel-Karyo, Y.H. Adalist, D. Segal, E. Gazit // Proteins. – 2012. – V. 80, №8. – P. 1962-1973. doi: 10.1002/prot.24080.

566. Schmidt, M. Comparison of Alzheimer Abeta(1-40) and Abeta(1-42) amyloid fibrils reveals similar protofilament structures./ M. Schmidt, C. Sachse, W. Richter, C. Xu, M. Fändrich, N. Grigorieff // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2009. – V. 106, №47. – P. 19813-19818. doi: 10.1073/pnas.0905007106.

567. Schon, A. Temperature stability of proteins: analysis of irreversible denaturation using isothermal calorimetry./ A. Schon, B.R. Clarkson, M. Jaime, E. Freire // Proteins-Struct. Funct. Bioinf. – 2017. – V. 85, №11. – P. 2009-2016. doi: 10.1002/prot.25354.

568. Schuck, P. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling./ P. Schuck // Biophys. J. – 2000. – V. 78, – P. 1606-1619. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76713-0.

569. Sediq, A.S. No Touching! Abrasion of adsorbed protein is the root cause of subvisible particle formation during stirring./ A.S. Sediq, R.B. van Duijvenvoorde, W. Jiskoot, M.R. Nejadnik // J. Pharm. Sci. 2016, V. 105, №2. – P. 519-529. doi: 10.1016/j.xphs.2015.10.003.

570. Sedlak, E. Pluckthun Advanced analyses of kinetic stabilities of IgGs modified by mutations and glycosylation./ E. Sedlak, J.V. Schaefer, J. Marek, P. Gimeson, A. Pluckthun // Protein Sci. – 2015. – V. 24, №7. – P. 1100-1113. doi: 10.1002/pro.2691.

571. Selivanova, O.M. How to determine the size of folding nuclei of protofibrils from the concentration dependence of the rate and lag-time of aggregation. II. Experimental application for insulin and lyspro insulin: aggregation morphology, kinetics, and sizes of nuclei./ O.M. Selivanova, M.Y. Suvorina, N.V. Dovidchenko, I.A. Eliseeva, A.K. Surin, A.V. Finkestein, V.V. Schmatchenko, O.V. Galzitskaya // J. Phys. Chem. B. – 2014. – V. 118, №5. – P. 1198-1206. doi: 10.1021/jp4083568.

572. Selivanova, O.M. X-ray diffraction and electron microscopy data for amyloid formation of Aβ40 and Aβ42./ O.M. Selivanova, E.I. Grigorashvili, M.Y. Suvorina, U.F. Dzhus, A.D. Nikulin, V.V. Marchenkov, A.K. Surin, O.V. Galzitskaya // Data Brief. – 2016. – V. 8, – P. 108-113. doi: 10.1016/j.dib.2016.05.020.

573. Selkoe, D.J. Folding proteins in fatal ways./ D.J. Selkoe // Nature. – 2003. – V. 426, №6968. – P. 900-904. doi: 10.1038/nature02264. Erratum in: Nature. – 2004. – V. 428, №6981. – P. 445.

574. Senin, A.A. Differential scanning microcalorimetr SCAL-1./ A.A. Senin, S.A. Potekhin, E.I. Tiktopulo, V.V. Filomonov // J. Therm. Anal. Cal. – 2000. – V. 62, – P. 153-160. doi: 10.1023/A:1010171013669.

575. Sept, D. Thermodynamics and kinetics of actin filament nucleation./ D. Sept, J.A. McCammon, // Biophys. J. – 2001. – V. 81, №2. – P. 667-674. doi: 10.1016/S0006-3495(01)75731-1.

576. Serpell, L.C. Fiber diffraction of synthetic α-synuclein filaments shows amyloid-like cross-β conformation./ L.C. Serpell, J. Berriman, R. Jakes, M. Goedert, R.A. Crowther // Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. – 2000. – V. 97, №9. – P. 4897-4902. doi: 10.1073/pnas.97.9.4897.

577. Sethi, S. Mass spectrometry-based proteomic diagnosis of renal immunoglobulin heavy chain amyloidosis./ S. Sethi, J.D. Theis, N. Leung, A. Dispenzieri, S.H. Nasr, M.E. Fidler, L.D. Cornell, J.D. Gamez, J.A. Vrana, A. Dogan // Clin. J. Am. Soc. Nephrol. – 2010. – V. 5, №12. – P. 2180-2187. doi: 10.2215/CJN.02890310.

578. Seuring, C. Amyloid Fibril Polymorphism: Almost Identical on the Atomic Level, Mesoscopically Very Different./ C. Seuring, J. Verasdonck, P. Ringler, R.

Cadalbert, H. Stahlberg, A. Böckmann, B.H. Meier, R. Riek // J. Phys. Chem. B. – 2017. – V. 121, №8. – P. 1783-1792. doi: 10.1021/acs.jpcb.6b10624.

579. Shaffer, J.F. The myosin-binding protein C motif binds to F-actin in a phosphorylation-sensitive manner./ J.F. Shaffer, R.W. Kensler, S.P. Harris // J. Biol. Chem. – 2009. – V. 284, №18. – P. 12318-12327. doi: 10.1074/jbc.M808850200.

580. Shah, M. Evaluation of aggregate and silicone-oil counts in pre-filled siliconized syringes: an orthogonal study characterising the entire subvisible size range./ M. Shah, Z. Rattray, K. Day, S. Uddin, R. Curtis, C.F. van der Walle, A. Pluen // Int. J. Pharm. – 2017. – V. 519, №1-2. – P. 58-66. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.01.015.

581. Shahnawaz, M. Prion-like characteristics of the bacterial protein Microcin E492./ M. Shahnawaz, K.W. Park, A. Mukherjee, R. Diaz-Espinoza, C. Soto, // Sci. Rep. – 2017. – V. 7, – P. 45720. doi: 10.1038/srep45720.

582. Shemesh, T. Role of focal adhesions and mechanical stresses in the formation and progression of the lamellipodium-lamellum interface [corrected]./ T. Shemesh, A.B. Verkhovsky, T.M. Svitkina, A.D. Bershadsky, M.M. Kozlov // Biophys. J. – 2009. – V. 97, №7. – P. 1254-1264. doi: 10.1016/j.bpj.2009.05.065. Erratum in: Biophys J. – 2009. – V. 97, №7. – P. 2115.

583. Shewmaker, F. he functional curli amyloid is not based on in-register parallel beta-sheet structure./ F. Shewmaker, R.P. McGlinchey, K.R. Thurber, P. McPhie, F. Dyda, R. Tycko, R.B. Wickner // J. Biol. Chem. – 2009. – V. 284, №37. – P. 25065-25076. doi: 10.1074/jbc.M109.007054.

584. Shewmaker, F. Structural insights into functional and pathological amyloid./ F. Shewmaker, R.P. McGlinchey, R.B. Wickner // J. Biol. Chem. – 2011. – V. 286, №19. – P. 16533-16540. doi: 10.1074/jbc.R111.227108.

585. Shi, Y.H. Deamidation of asparagine to aspartate destabilizes Cu, Zn superoxide dismutase, accelerates fibrillization, and mirrors ALS-linked mutations./ Y.H. Shi, N.R. Rhodes, A. Abdolvahabi, T. Kohn, N.P. Cook, A.A. Marti, B.F. Shaw // J. Am. Chem. Soc. – 2013. – V. 135, №42. – P. 15897-15908. doi: 10.1021/ja407801x.

586. Shi, S. Overcoming challenges with intravenous administration of an investigational protein therapeutic./ S. Shi, V. Hashemi, S.-C. Wang, J. Yang, M. Yang, A.

Semple, C. Narasimhan, V. Antochshuk // J. Pharm. Sci. – 2017. – V. 106, №12. – P. 3465-3473. doi: 10.1016/j.xphs.2017.07.018.

587. Shieh, I.C. Predicting the agitation-induced aggregation of monoclonal antibodies using surface tensiometry./ I.C. Shieh, A.R. Patel // Mol. Pharm. – 2015. – V. 12, №9. – P. 3184-3193. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00089.

588. Si, K. A neuronal isoform of the aplysia CPEB has prion-like properties./ K. Si, S.L. Lindquist, E.R. Kandel // Cell. – 2003a. – V. 115, №7. – P. 879-891. doi: 10.1016/s0092-8674(03)01020-1.

589. Si, K. A neuronal isoform of CPEB regulates local protein synthesis and stabilizes synapse-specific long-term facilitation in aplysia./ K. Si, M. Giustetto, A. Etkin, R. Hsu, A.M. Janisiewicz, M.C. Miniaci, J.H. Kim, H. Zhu, E.R. Kandel // Cell. – 2003b. – V. 115, №7. – P. 893-904. doi: 10.1016/s0092-8674(03)01021-3.

590. Silvers, T.R. Osmolyte effects on the self-association of concanavalin a: testing theoretical models./ T.R. Silvers, J.K. Myers // Biochemistry. – 2013. – V. 52, №51. – P. 9367-9374. doi: 10.1021/bi401049s.

591. Singh, S.M. Mechanisms of m-cresol-induced protein aggregation studied using a model protein cytochrome C./ S.M. Singh, R.L. Hutchings, K.M. Mallela // J. Pharm. Sci. – 2011. – V. 100, №5. – P. 1679-1689. doi: 10.1002/jps.22426.

592. Singh, S.K. Antibody-Drug Conjugates: Design, Formulation and Physicochemical Stability./ S.K. Singh, D.L. Luisi, R.H. Pak // Pharm. Res. – 2015. – V. 32, №11. – P. 3541-3571. doi: 10.1007/s11095-015-1704-4.

593. Singh, S.R. Effect of polysorbate 80 quality on photostability of a monoclonal antibody./ S.R. Singh, J.M. Zhang, C. O'Dell, M.C. Hsieh, J. Goldstein, J. Liu, A. Srivastava // AAPS PharmSciTech. – 2012. – V. 13, №2. – P. 422-430. doi: 10.1208/s12249-012-9759-6.

594. Siska, C.C. Free fatty acid particles in protein formulations, Part 2: contribution of polysorbate raw material./ C.C. Siska, C.J. Pierini, H.R. Lau, R.F. Latypov, R.M. Fesinmeyer, J.R. Litowski // J. Pharm. Sci. – 2015. – V. 104, №2. – P. 447-456. doi: 10.1002/jps.24144.

595. Skamris, T. Monoclonal antibodies follow distinct aggregation pathways during production-relevant acidic incubation and neutralization./ T. Skamris, X.S. Tian, M. Thorolfsson, H.S. Karkov, H.B. Rasmussen, A.E. Langkilde, B. Vestergaard // Pharm. Res. – 2016. – V. 33, №3. – P. 716-728. doi: 10.1007/s11095-015-1821-0.

596. Sleutel, M. Does solution viscosity scale the rate of aggregation of folded proteins?/ M. Sleutel, A.E.S. van Driessche, W. Pan, E.K. Reichel, D. Maes, P.G. Vekilov // J. Phys. Chem. Lett. – 2012. – V. 3, №10. – P. 1258-1263. doi: 10.1021/jz300459n.

597. Slotta, U. pider silk and amyloid fibrils: a structural comparison./ U. Slotta, S. Hess, K. Spiess, T. Stromer, L. Serpell, T. Scheibel // Macromol. Biosci. – 2007. – V. 7, №2. – P. 183-188. doi: 10.1002/mabi.200600201.

598. Smirnova, E. pH-responsive modulation of insulin aggregation and structural transformation of the aggregates. / E. Smirnova, I. Safenkova, V. Stein-Margolina, V. Shubin, V. Polshakov, B. Gurvits // Biochimie. – 2015. – V. 109, – P. 49-59. doi: 10.1016/j.biochi.2014.12.006.

599. Smith, B.C. Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy./ B.C. Smith // 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, Florida. – 2011. – P. 1-207. doi: 10.1201/b10777.

600. Smith, M.A. Amyloid-beta and tau serve antioxidant functions in the aging and Alzheimer brain./ M.A. Smith, G. Casadesus, J.A. Joseph, G. Perry // Free Radic. Biol. Med. – 2002. – V. 33, №9. – P. 1194-1199. doi: 10.1016/s0891-5849(02)01021-3.

601. Smith, J.F. Characterization of the nanoscale properties of individual amyloid fibrils./ J.F. Smith, T.P. Knowles, C.M. Dobson, C.E. Macphee, M.E. Welland // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2006. – V. 103, №43. – P. 15806-15811. doi: 10.1073/pnas.0604035103.

602. Smith, M.I. Factors affecting the formation of insulin amyloid spherulites./ M.I. Smith, V. Fodera, J.S. Sharp, C.J. Roberts, A.M. Donald // Colloids Surfaces B Biointerfaces. – 2012. – V. 89, – P. 216-222. doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.09.018.

603. Snell, J.R. Particle formation and aggregation of a therapeutic protein in nanobubble suspensions./ J.R. Snell, C. Zhou, J.F. Carpenter, T.W. Randolph // J. Pharm. Sci. – 2016. – V. 105, №10. – P. 3057-3063. doi: 10.1016/j.xphs.2016.06.020.

604. Socolich, M. Evolutionary information for specifying a protein fold./ M. Socolich, S.W. Lockless, W.P. Russ, H. Lee, K.H. Gardner, R. Ranganathan // Nature. – 2005. – V. 437, №7058. – P. 512-518. doi: 10.1038/nature03991.

605. Sorimachi, H. Tissue-specific Expression and α-actinin Binding Properties of the Z-Disc Titin: Implications for the Nature of Vertebrate Z-Discs./ H. Sorimachi, A. Freiburg, B. Kolmerer, S. Ishiura, G. Stier, C.C. Gregorio, D. Labeit, W.A. Linke, K. Suzuki, S. Labeit // J. Mol. Biol. – 1997. – V. 270, №5, – P. 688-695. doi:10.1006/jmbi.1997.1145.

606. Sreedhara, A. Effect of ambient light on IgG1 monoclonal antibodies during drug product processing and development./ A. Sreedhara, J. Yin, M. Joyce, K. Lau, A.T. Wecksler, G. Deperalta, L. Yi, Y.J. Wang, B. Kabakoff, R.S.K. Kishore // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2016. – V. 100, – P. 38-46. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.12.003.

607. Sreerama, N. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set./ N. Sreerama, R.W. Woody // Anal. Biochem. – 2000. – V. 287, №2. – P. 252-260. doi: 10.1006/abio.2000.4880.

608. Srinivasan, A.R. Investigation of the stability and cellular uptake of self-associated monoclonal antibody (MAb) nanoparticles by non-small lung cancer cells./ A.R. Srinivasan, A. Lakshmikuttyamma, S.A. Shoyele // Mol. Pharm. – 2013. – V. 10, №9. doi: 10.1021/mp3005935.

609. St Clair, J.B. Immunogenicity of isogenic igg in aggregates and immune complexes./ J.B. St Clair, T. Detanico, K. Aviszus, G.A. Kirchenbaum, M. Christie, J.F. Carpenter, L.J. Wysocki // PLoS One. – 2017. – V. 12, №1. – P. e0170556. doi: 10.1371/journal.pone.0170556.

610. Stahl, S.W. A conditional gating mechanism assures the integrity of the molecular force-sensor titin kinase./ S.W. Stahl, E.M. Puchner, A. Alexandrovich, M. Gautel, H.E. Gaub // Biophys. J. – 2011. – V. 101, №8. – P. 1978-1986. doi: 10.1016/j.bpj.2011.09.027.

611. Starr, R. Preparation of C-protein, H-protein, X-protein and phosphofructokinase./ R. Starr, G. Offer // Methods Enzymol. – 1982. – V. 85, №Pt B. – P. 130-138. doi: 10.1016/0076-6879(82)85016-7.

612. Steckmann, T. Kinetics of peptide secondary structure conversion during amyloid beta-protein fibrillogenesis./ T. Steckmann, Z. Awan, B.S. Gerstman, P.P. Chapagain // J. Theor. Biol. – 2012. – V. 301, – P. 95-102. doi: 10.1016/j.jtbi.2012.02.012.

613. Stefani, M. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution./ M. Stefani, C.M. Dobson // J. Mol. Med. (Berl). – 2003. – V. 81, №11. – P. 678-99. doi: 10.1007/s00109-003-0464-5.

614. Stepanskiy L.G. Sonication-induced unfolding proteins./ L.G. Stepanskiy // J. Theor. Biol. – 2012. – V. 298, – P. 77-81. doi: 10.1016/j.jtbi.2012.01.008.

615. Stradner, A. Equilibrium cluster formation in concentrated protein solutions and colloids./ A. Stradner, H. Sedgwick, F. Cardinaux, W.C. Poon, S.U. Egelhaaf, P. Schurtenberger // Nature. –2004. – V. 432, №7016. – P. 492-495. doi: 10.1038/nature03109.

616. Strege, R.J. Diagnosis and immunohistochemical classification of systemic amyloidoses. Report of 43 cases in an unselected autopsy series./ R.J. Strege, W. Saeger, R. Linke // Virch. Arch. – 1998. – V. 433, – P. 19-27. doi: 10.1007/s004280050211.

617. Streets, A.M. Simultaneous measurement of amyloid fibril formation by dynamic light scattering and fluorescence reveals complex aggregation kinetic./ A.M. Streets, Y. Sourigues, R.R. Kopito, R. Melki, S.R. Quake // PLoS ONE. – 2013. – V. 8, – P. e54541. doi: 10.1371/journal.pone.0054541.

618. Stuart, B. Biological applications of infrared spectroscopy./ B. Stuart // in: D.J. Ando (ed) In ACOL series, John Wiley & Sons, New York. – 1997. – P. 1-212.

619. Sule, S.V. Solution pH that minimizes self-association of three monoclonal antibodies is strongly dependent on ionic strength./ S.V. Sule, J.K. Cheung, V. Antochshuk, A.S. Bhalla, C. Narasimhan, S. Blaisdell, M. Shameem, P.M. Tessier // Mol. Pharm. – 2012. – V. 9, №4. – P. 744-751. doi: 10.1021/mp200448j.

620. Sunde, M. The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction./ M. Sunde, C. Blake // Adv. Protein Chem. – 1997. – V. 50, – P. 123-159. doi: 10.1016/s0065-3233(08)60320-4.

621. Sunde, M. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction./ M. Sunde, L.C. Serpell, M. Bartlam, P.E. Fraser, M.B. Pepys, C.C. Blake // J. Mol. Biol. – 1997. – V. 273, №3. – P. 729-739. doi: 10.1006/jmbi.1997.1348.

622. Surroca, Y. Towards the understanding of molecular mechanism in the early stages of heat-induced aggregation of β-lactoglobulin AB./ Y. Surroca, J. Haverkamp, A.J.R. Heck // J. Chromatogr. A. – 2002. – V. 970, №1-2. – P. 275-285. doi: 10.1016/s0021-9673(02)00884-1.

623. Susi, H. Resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy of enzymes./ H. Susi, D.M. Byler // Methods Enzymol. – 1986. – V. 130, – P. 290-311. doi: 10.1016/0076-6879(86)30015-6.

624. Suzuki, J. Electron microscopic filament lengths of connection and its fragments./ J. Suzuki, S. Kimura, K. Maruyama // J. Biochem. – 1994. – V. 116, №2. – P. 406-410. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124539.

625. Svergun, D.I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing./ D.I. Svergun // Biophys. J. – 1999. – V. 76, №6. – P. 2879-2886. doi: 10.1016/S0006-3495(99)77443-77446.

626. Takata, T. Deamidation destabilizes and triggers aggregation of a lens protein, {beta}A3-crystallin./ T. Takata, J.T. Oxford, B. Demeler, K.J. Lampi // Protein Sci. – 2008. – doi: 10.1110/ps.035410.108.

627. Telikepalli, S.N. Structural characterization of IgG1 mAb aggregates and particles generated under various stress conditions./ S.N. Telikepalli, O.S. Kumru, C. Kalonia, R. Esfandiary, S.B. Joshi, C.R. Middaugh, D.B. Volkin // J. Pharm. Sci. – 2014. – V. 103, №3. – P. 796-809. doi: 10.1002/jps.23839.

628. Telikepalli, S. Physical characterization and in vitro biological impact of highly aggregated antibodies separated into size-enriched populations by fluorescence-activated cell sorting./ S. Telikepalli, H.E. Shinogle, P.S. Thapa, J.H. Kim, M. Deshpande,

V. Jawa, C.R. Middaugh, L.O. Narhi, M.K. Joubert, D.B. Volkin // J. Pharm. Sci. – 2015. – V. 104, №5. – P. 1575-1591. doi: 10.1002/jps.24379.

629. Tjernberg, L.O. Amyloid beta-peptide polymerization studied using fluorescence correlation spectroscopy./ L.O. Tjernberg, A. Pramanik, S. Björling, P. Thyberg, J. Thyberg, C. Nordstedt, K.D. Berndt, L. Terenius, R. Rigler // Chem. Biol. – 1999. – V. 6, №1. – P. 53-62. doi: 10.1016/S1074-5521(99)80020-9.

630. Thangakani, A.M. How do thermophilic proteins resist aggregation?/ A.M. Thangakani, S. Kumar, D. Velmurugan, M.S.M. Gromiha // Proteins-Struct. Funct. Bioinform. – 2012. – V. 80, №4. – P. 1003-1015. doi: 10.1002/prot.24002.

631. Tian, P. Best structural determinants of misfolding in multidomain proteins./ P. Tian, R.B. Best // PLoS Computational Biology. – 2016. – V. 12, №5. – P. e1004933. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004933.

632. Timchenko, M.A. Investigation of Structural Peculiarities of Smooth Muscle Titin Aggregates, Formed under Different *In Vitro* Conditions, by Small-Angle X-Ray Scattering and Fourier Transform Infrared Spectroscopy./ M.A. Timchenko, A.A. Timchenko, A.S. Kazakov, I.M Vikhlyantsev, L.G. Bobyleva, Bobylev A.G. // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2024. – V. 177, №4. – P. 454-459. doi: 10.1007/s10517-024-06207-8.

633. Tipping, K.W. Amyloid Fibres: Inert End-Stage Aggregates or Key Players in Disease?/ K.W. Tipping, P. van Oosten-Hawle, E.W. Hewitt, S.E. Radford // Trends Biochem. Sci. – 2015. – V. 40, №12. – P. 719-727. doi: 10.1016/j.tibs.2015.10.002.

634. Tokhadze, N. Stability of infliximab solutions in different temperature and dilution conditions./ N. Tokhadze, P. Chennell, Y. le Basle, V. Sautou // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2018. – V. 150, – P. 386-395. doi: 10.1016/j.jpba.2017.12.012.

635. Tonino, P. Fine mapping titin's C-zone: Matching cardiac myosin-binding protein C stripes with titin's super-repeats./ P. Tonino, B. Kiss, J. Gohlke, J.E. Smith 3rd, H. Granzier // J. Mol. Cell Cardiol. – 2019. – V. 133, – P. 47-56. doi: 10.1016/j.yjmcc.2019.05.026.

636. Torosantucci, R. Oxidation of therapeutic proteins and peptides: structural and biological consequences./ R. Torosantucci, C. Schoneich, W. Jiskoot // Pharm. Res. – 2014. – V. 31, №3. – P. 541-553. doi: 10.1007/s11095-013-1199-9.

637. Towbin, H. Immunoblotting in the clinical laboratory./ H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon // J. Clin. Chem. Clin. Biochem. – 1989. – V. 27, №8. – P. 495-501.

638. Toyama, B.H. The structural basis of yeast prion strain variants./ B.H. Toyama, M.J. Kelly, J.D. Gross, J.S. Weissman // Nature. – 2007. – V. 449, №7159. – P. 233-237. doi: 10.1038/nature06108.

639. Treuheit, M.J. Inverse relationship of protein concentration and aggregation./ M.J. Treuheit, A.A. Kosky, D.N. Brems // Pharm. Res. – 2002. – V. 19, №4. – P. 511-516. doi: 10.1023/a:1015108115452.

640. Trinick, J. Purification and properties of native titin./ J. Trinick, P. Knight, A. Whiting // J. Mol. Biol. – 1984. – V. 180, – P. 331-356. doi: 10.1016/s0022-2836(84)80007-8.

641. True, H.L. Epigenetic regulation of translation reveals hidden genetic variation to produce complex traits./ H.L. True, I. Berlin, S.L. Lindquist // Nature. – 2004. – V. 431, №7005. – P. 184-187. doi: 10.1038/nature02885.

642. Tskhovrebova, L. Direct visualization of extensibility in isolated titin molecules./ L. Tskhovrebova, J. Trinick // J. Mol. Biol. – 1997. – V. 265. №2. – P. 100-106. doi: 10.1006/jmbi.1996.0717.

643. Tskhovrebova, L. Titin: properties and family relationships./ L. Tskhovrebova, J. Trinick // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2003. – V. 4, – P. 679-689. doi: 10.1038/nrm1198.

644. Tskhovrebova, L. Properties of Titin Immunoglobulin and Fibronectin-3 Domains./ L. Tskhovrebova, J. Trinick // J. Biol. Chem. – 2004. – V. 279, №45, – P. 46351-46354. doi: 10.1074/jbc.R400023200.

645. Tskhovrebova, L. Muscle disease: a giant feels the strain./ L. Tskhovrebova, J. Trinick // Nat. Med. – 2005. – V. 11, №5. – P. 478-479. doi: 10.1038/nm0505-478.

646. Tskhovrebova, L. Roles of Titin in the Structure and Elasticity of the Sarcomere./ L. Tskhovrebova, J. Trinick // J. Biomed. Biotechnol. – 2010. – V. 7, doi: 10.1155/2010/612482.

647. Tsytlonok, M. Complex energy landscape of a giant repeat protein./ M. Tsytlonok, P.O. Craig, E. Sivertsson, D. Serquera, S. Perrett, R.B. Best, P.G. Wolynes, L.S. Itzhaki // Structure. – 2013. – V. 21, №11, – P. 1954-1965. doi: 10.1016/j.str.2013.08.028.

648. Tu, L.H. Role of aromatic interactions in amyloid formation by islet amyloid polypeptide./ L.H. Tu, D.P. Raleigh // Biochemistry. – 2013. – V. 52, №2. – P. 333-342. doi: 10.1021/bi3014278.

649. Twomey, A. In situ spectroscopic quantification of protein-ice interactions./ A. Twomey, R. Less, K. Kurata, H. Takamatsu, A. Aksan // J. Phys. Chem. B. – 2013. – V. 117, №26. – P. 7889-7897. doi: 10.1021/jp403267x.

650. Tycko, R. Progress towards a molecular-level structural understanding of amyloid fibrils./ R. Tycko // Curr. Opin. Struct. Biol. – 2004. – V. 14, – P. 96-103. doi: 10.1016/j.sbi.2003.12.002.

651. Tycko, R. Solid-state NMR studies of amyloid fibril structure./ R. Tycko // Annu. Rev. Phys. Chem. – 2011. – V. 62, – P. 279-299. doi: 10.1146/annurev-physchem-032210-103539.

652. Tycko, R. Physical and structural basis for polymorphism in amyloid fibrils./ R. Tycko // Protein Sci. – 2014. – V. 23, №11. – P. 1528-1539. doi: 10.1002/pro.2544.

653. Tycko, R. Amyloid polymorphism: structural basis and neurobiological relevance./ R. Tycko // Neuron. – 2015. – V. 86, №3. – P. 632-645. doi: 10.1016/j.neuron.2015.03.017.

654. Uchino, T. Immunogenicity of protein aggregates of a monoclonal antibody generated by forced shaking stress with siliconized and nonsiliconized syringes in BALB/c mice./ T. Uchino, Y. Miyazaki, T. Yamazaki, Y. Kagawa // J. Pharm. Pharmacol. – 2017. – V. 69, №10. – P. 1341-1351. doi: 10.1111/jphp.12765.

655. Uesugi, K. Mechanisms of ultrasonically induced fibrillation of amyloid beta(1–40) peptides./ K. Uesugi, H. Ogi, M. Fukushima, M. So, H. Yagi, Y. Goto, M. Hirao // Jpn. J. Appl. Phys. – 2013. – V. 52, №7S. – P. 07HE10. doi: 10.7567/JJAP.52.07HE10.

656. Ulamec, S.M. Spot the Difference: Function versus toxicity in amyloid fibrils./ S.M. Ulamec, S.E. Radford // Trends Biochem. Sci. – 2020. – V. 45, №8. – P. 635-636. doi: 10.1016/j.tibs.2020.04.007.

657. Uversky V.N. Mysterious oligomerization of the amyloidogenic proteins./ V.N. Uversky // FEBS J. – 2010. – V. 277, №4, – P. 2940-2953. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07721.x.

658. Vafiadaki, E. Muscle LIM protein: master regulator of cardiac and skeletal muscle functions./ E. Vafiadaki, D.A. Arvanitis, D. Sanoudou // Gene. – 2015. – V. 566, №1, – P. 1-7. doi: 10.1016/j.gene.2015.04.077.

659. Van der Ven, P.F. A functional knock-out of titin results in defective myofibril assembly./ P.F. Van der Ven, J.W. Bartsch, M. Gautel, H. Jockusch, D.O. Furst // J. Cell Sci. – 2000. – V. 113, Pt 8. – P. 1405-1414. doi: 10.1242/jcs.113.8.1405.

660. Vassar, P.S. Fluorescent stains with special reference to amyloid and connective tissues./ P.S. Vassar, C.F.A. Culling // Arch. Pathol. – 1959. – V. 68, – P. 487-494.

661. Vendruscolo, M. Towards complete descriptions of the free-energy landscapes of proteins./ M. Vendruscolo, C.M. Dobson // Philos. Transact. A Math. Phys. Eng. Sci. – 2005. – V. 363, №1827. – P. 433-450, discussion – P. 450-452. doi: 10.1098/rsta.2004.1501.

662. Vaughan, K.T., Molecular cloning of chicken myosin-binding protein (MyBP) H (86-kDa protein) reveals extensive homology with MyBP-C (C-protein) with conserved immunoglobulin C2 and fibronectin type III motifs./ K.T. Vaughan, F.E. Weber, S. Einheber, D.A. Fischman // J. Biol. Chem. – 1993. – V. 268, №5. – P. 3670-3676.

663. Venyaminov, S. Water (H_2O and D_2O) molar absorptivity in the 1000–4000 cm^{-1} range and quantitative infrared spectroscopy of aqueous solutions./ S. Venyaminov,

F.G. Prendergast // Anal. Biochem. – 1997. – V. 248, №2. – P. 234-245. doi: 10.1006/abio.1997.2136.

664. Vestergaard, B. A helical structural nucleus is the primary elongating unit of insulin amyloid fibrils./ B. Vestergaard, M. Groenning, M. Roessle, J.S. Kastrup, M. Van De Weert, J.M. Flink S. Frokjaer, M. Gajhede, D.I. Svergun // PLoS Biol. – 2007. – V. 5, №5. – P. e134. doi: 10.1371/journal.pbio.0050134.

665. Vikhliantsev, I.M. Phosphorylation of sarcomeric cytoskeletal proteins--an adaptive factor for inhibiting the contractile activity of muscle during hibernation./ I.M. Vikhliantsev, Z.A. Podlubnaia // Biofizika. – 2003. – V. 48, – P. 499-504.

666. Visschers, R.W. Disulphide bond formation in food protein aggregation and gelation./ R.W. Visschers, H.H.J. De Jongh // Biotechnol. Adv. – 2005. – V. 23, №1. – P. 75-80. doi: 10.1016/j.biotechadv.2004.09.005.

667. Vladkova, T.G. Surface engineered polymeric biomaterials with improved biocontact properties./ T.G. Vladkova // Int. J. Polym. Sci. – 2010. – V. 2010, №1. – P. 296094. doi: 10.1155/2010/296094.

668. Vlieland, N.D. The Impact of inadequate temperature storage conditions on aggregate and particle formation in drugs containing tumor necrosis factor-alpha inhibitors./ N.D. Vlieland, M.R. Nejadnik, H. Gardarsdottir, S. Romeijn, A.S. Sediq, M.L. Bouvy, A.C.G. Egberts, B.J.F. van den Bemt, W. Jiskoot // Pharm. Res. – 2018. – V. 35, №2. – P. 42. doi: 10.1007/s11095-017-2341-x.

669. Vogler, T.O. TDP-43 and RNA form amyloid-like myo-granules in regenerating muscle./ T.O. Vogler, J.R. Wheeler, E.D. Nguyen, M.P. Hughes, K.A. Britson, E. Lester, B. Rao, N.D. Betta, O.N. Whitney, T.E. Ewachiw, E. Gomes, J. Shorter, T.E. Lloyd, D.S. Eisenberg, J.P. Taylor, A.M. Johnson, B.B. Olwin, R. Parker // Nature. – 2018. – V. 563, №7732. – P. 508-513. doi: 10.1038/s41586-018-0665-2.

670. Vydyanath, A. Axial distribution of myosin binding protein-C is unaffected by mutationsin human cardiac and skeletal muscle./ A. Vydyanath, C.A. Gurnett, S. Marston, P.K. Luther, // J. Muscle Res. Cell Motil. – 2012. – V. 33, №1. – P. 61-74. doi: 10.1007/s10974-012-9286-9.

671. Waeytens, J. Probing amyloid fibril secondary structures by infrared nanospectroscopy: experimental and theoretical considerations./ J. Waeytens, J. Mathurin, A. Deniset-Besseau, V. Arluison, L. Bousset, H. Rezaei, V. Raussens, A. Dazzi // Analyst. – 2021. – V. 146, №1, – P. 132-145. doi: 10.1039/d0an01545h.

672. Wan, W. Degradation of fungal prion HET-s(218-289) induces formation of a generic amyloid fold./ W. Wan, H. Wille, J. Stöhr, U. Baxa, S.B. Prusiner, G. Stubbs, // Biophys. J. – 2012. – V. 102, №10. – P. 2339-2344. doi: 10.1016/j.bpj.2012.04.011.

673. Wang, K. Titin: major myofibrillar components of striated muscle./ K. Wang, J. McClure, A. Tu // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1979. – V. 76, №8. – P. 3698-3702. doi: 10.1073/pnas.76.8.3698.

674. Wang, Y.W. Effect of mitomycin on normal dermal fibroblast and HaCat cell: an *in vitro* study./ Y.W. Wang, J.H. Ren, K. Xia, S.H. Wang, T.F. Yin, D.H. Xie, L.H. Li, // Journal of Zhejiang University. Science. B. – 2012. – V. 13, №12. – P. 997-1005. doi: 10.1631/jzus.B1200055.

675. Wang, X.L. Impact of deglycosylation and thermal stress on conformational stability of a full length murine igG2a monoclonal antibody: Observations from molecular dynamics simulations./ X.L. Wang, S. Kumar, P.M. Buck, S.K. Singh // Proteins. – 2013a. – V. 81, №3. – P. 443-460. doi: 10.1002/prot.24202.

676. Wang, T. Effect of ionic strength and pH on the physical and chemical stability of a monoclonal antibody antigen-binding fragment./ T. Wang, O.S. Kumru, L. Yi, Y.J. Wang, J. Zhang, J.H. Kim, S.B. Joshi, C.R. Middaugh, D.B. Volkin // J. Pharm. Sci. – 2013b. – V. 102, №8. – P. 2520-2537. doi: 10.1002/jps.23645.

677. Wang, W. Advanced protein formulations./ W. Wang // Protein Sci. – 2015. – V. 24, №7. – P. 1031-1039. doi: 10.1002/pro.2684.

678. Wang, H.L. Deamidation slows curli amyloid-protein aggregation./ H.L. Wang, Q. Shu, C. Frieden, M.L. Gross // Biochemistry. – 2017a. – V. 56, №23. – P. 2865-2872. doi: 10.1021/acs.biochem.7b00241.

679. Wang, S. Optimization of high-concentration endostatin formulation: harmonization of excipients' contributions on colloidal and conformational stabilities./ S.

Wang, X. Zhang, G. Wu, Z. Tian, F. Qian // Int. J. Pharm. – 2017b. – V. 530, №1-2. – P. 173-186. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.07.057.

680. Wang, W. Protein aggregation - Mechanisms, detection, and control./ W. Wang, C.J. Roberts // Int. J. Pharm. – 2018. – V. 550, №1-2. – P. 251-268. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.08.043.

681. Watt, B. N-terminal domains elicit formation of functional Pmel17 amyloid fibrils./ B. Watt, G. van Niel, D.M. Fowler, I. Hurbain, K.C. Luk, S.E. Stayrook, M.A. Lemmon, G. Raposo, J. Shorter, J.W. Kelly, M.S. Marks // J. Biol. Chem. – 2009. – V. 284, №51.– P. 35543-35555. doi: 10.1074/jbc.M109.047449.

682. Waxman, L. A comparison of protein stability in prefillable syringes made of glass and plastic PDA./ L. Waxman, V.D. Vilivalam // J. Pharm. Sci. Technol. – 2017. – V. 71, №6. – P. 462-477. doi: 10.5731/pdajpst.2016.007146.

683. Wechalekar, A.D. Systemic amyloidosis./ A.D. Wechalekar, J.D. Gillmore, P.N. Hawkins // Lancet. – 2016. – V. 387, №10038. – P. 2641-2654. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01274-X.

684. Wei, J.Y. Technical decision-making with higher order structure data: detecting reversible concentration-dependent self-association in a monoclonal antibody and a preliminary investigation to eliminate it./ J.Y. Wei, G.M. Bou-Assaf, D. Houde, A. Weiskopf // J. Pharm. Sci. – 2015. – V. 104, №11. – P. 3984-3989. doi: 10.1002/jps.24616.

685. Westermark, G.T. Staining methods for identification of amyloid in tissue./ G.T. Westermark, K.H. Johnson, P. Westermark // Methods Enzymol. – 1999. – V. 309, – P. 3-25 doi: 10.1016/S0076-6879(99)09003-5.

686. Westermark, P. A primer of amyloid nomenclature./ P. Westermark, M.D. Benson, J.N. Buxbaum, A.S. Cohen, B. Frangione, S.I. Ikeda, C.L. Masters, G. Merlini, J.D.A. Sipe, M.J. Saraiva // Amyloid. – 2007. – V. 14, №3. – P. 179-183. doi: 10.1080/13506120701460923.

687. Westermark G.T. Development of mouse monoclonal antibodies against human amyloid fibril proteins for diagnostic and research purposes./ G.T. Westermark, E. Ihse, P. Westermark // Methods Mol. Biol. – 2018. – V. 1779, – P. 401-414. doi: 10.1007/978-1-4939-7816-8_24.

688. Wiesbauer, J. Shaking and stirring: Comparison of controlled laboratory stress conditions applied to the human growth hormone./ J. Wiesbauer, M. Cardinale, B. Nidetzky // Process Biochem. – 2013. – V. 48, №1. – P. 33-40. doi: 10.1016/j.procbio.2012.11.007.

689. Wille, H. Natural and synthetic prion structure from X-ray fiber diffraction./ H. Wille, W. Bian, M. McDonald, A. Kendall, D.W. Colby, L. Bloch, J. Ollesch, A.L. Borovinskiy, F.E. Cohen, S.B. Prusiner, G. Stubbs // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2009. – V. 106, №40. – P. 16990-16995. doi: 10.1073/pnas.0909006106.

690. Willis, M.S. Build it up-Tear it down: protein quality control in the cardiac sarcomere./ M.S. Willis, J.C. Schisler, A.L. Portbury, C. Patterson // Cardiovasc. Res. – 2009. – V. 81, №3, – P. 439-448. doi: 10.1093/cvr/cvn289.

691. Williams, A.F. The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition./ A.F. Williams, A.N. Barclay // Annu. Rev. Immunol. – 1988. – V. 6. – P. 381-405. doi: 10.1146/annurev.iy.06.040188.002121.

692. Witt, C.C. Nebulin regulates thin filament length, contractility, and Z-disk structure *in vivo*./ C.C. Witt, C. Burkart, D. Labeit, M. McNabb, Y. Wu, H. Granzier, S. Labeit // Embo J. – 2006. – V. 25, №16. – P. 3843-3855. doi: 10.1038/sj.emboj.7601242.

693. Woodruff, J.B. Organization and function of non-dynamic biomolecular condensates./ J.B. Woodruff, A.A. Hyman, E. Boke // Trends. Biochem. Sci. – 2018. – V. 43, №2 – P. 81-94. doi: 10.1016/j.tibs.2017.11.005.

694. Wright, C.F. The importance of sequence diversity in the aggregation and evolution of proteins./ C.F. Wright, S.A. Teichmann, J. Clarke, C.M. Dobson // Nature. – 2005. – V. 438. №7069. – P. 878-881. doi: 10.1038/nature04195.

695. Wu, H. Competing aggregation pathways for monoclonal antibodies./ H. Wu, R. Kroe-Barrett, S. Singh, A.S. Robinson, C.J. Roberts // FEBS Lett. – 2014. – V. 588, №6. – P. 936-941. doi: 10.1016/j.febslet.2014.01.051.

696. Wu, G. Elucidating the weak protein-protein interaction mechanisms behind the liquid-liquid phase separation of a mAb solution by different types of additives./ G. Wu, S. Wang, Z. Tian, N. Zhang, H. Sheng, W. Dai, F. Qian // Eur. J. Pharm. Biopharm.

– 2017. – V. 120, – P. 1-8. doi: 10.1016/j.ejpb.2017.07.012. Erratum in: Eur, J, Pharm, Biopharm. – 2018. – V. 125, – P.182. doi: 10.1016/j.ejpb.2018.02.005.

697. Yakupova, E.I. Different amyloid aggregation of smooth muscles titin in vitro./ E.I. Yakupova, I.M. Vikhlyantsev, L.G. Bobyleva, N.V. Penkov, A.A. Timchenko, M.A. Timchenko, G.A. Enin, S.S. Khutzian, O.M. Selivanova, A.G. Bobylev // J. Biomol. Struct. Dyn. – 2018. – V. 36, №9. – P. 2237-2248. doi: 10.1080/07391102.2017.1348988.

698. Yakupova, E.I. Congo Red and amyloids: history and relationship./ E.I. Yakupova, L.G. Bobyleva, I.M. Vikhlyantsev, A.G. Bobylev // Biosci. Rep. – 2019. – V. 39 №1. – P. pii: BSR20181415. doi: 10.1042/BSR20181415.

699. Yakupova, E.I. Amyloid properties of titin./ E.I. Yakupova, I.M. Vikhlyantsev, M.Y. Lobanov, O.V. Galzitskaya, A.G. Bobylev // Biochemistry (Moscow). – 2017. – V. 82, №13. – P. 1675-1685. doi: 10.1134/S0006297917130077.

700. Yakupova, E.I. Amyloids: The History of Toxicity and Functionality./ E.I. Yakupova, L.G. Bobyleva, S.A. Shumeyko, I.M. Vikhlyantsev, A.G. Bobylev // Biology (Basel). – 2021. – V. 10, №5. – P. 394. doi: 10.3390/biology10050394.

701. Yang, H. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy./ H. Yang, S. Yang, J. Kong, A. Dong, S. Yu // Nat. Protoc. – 2015. – V. 10, №3, – P. 382-396. doi: 10.1038/nprot.2015.024.

702. Yang, T.C. Trimerization dictates solution opalescence of a monoclonal antibody./ T.C. Yang, A.J. Langford, S. Kumar, J.C. Ruesch, W. Wang // J. Pharm. Sci. – 2016. – V. 105, №8. – P. 2328-2337. doi: 10.1016/j.xphs.2016.05.027.

703. Ye, G.J. The role of mechanotransduction on vascular smooth muscle myocytes' [corrected] cytoskeleton and contractile function./ G.J. Ye, A.P. Nesmith, K.K. Parker // Anat. Rec. (Hoboken). – 2014. – V. 297, №9. – P. 1758-69. doi: 10.1002/ar.22983. Erratum in: Anat Rec (Hoboken). – 2015. – V. 298, №3. – P.637.

704. Yearley, E.J. Observation of small cluster formation in concentrated monoclonal antibody solutions and its implications to solution viscosity./ E.J. Yearley, P.D. Godfrin, T. Perevozchikova, H. Zhang, P. Falus, L. Porcar, M. Nagao, J.E. Curtis, P.

Gawande, R. Taing, I.E. Zarraga, N.J. Wagner, Y. Liu // Biophys. J. – 2014. – V. 106, №8. – P. 1763-1770. doi: 10.1016/j.bpj.2014.02.036.

705. Yoshimura, Y. Distinguishing crystal-like amyloid fibrils and glass-like amorphous aggregates from their kinetics of formation./ Y. Yoshimura, Y.X. Lin, H. Yagi, Y.H. Lee, H. Kitayama, K. Sakurai, M. So, H. Ogi, H. Naiki, Y. Goto // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2012. – V. 109, №36. –P. 14446-14451. doi: 10.1073/pnas.1208228109.

706. Yoshizawa, S. Trimethylamine N-oxide (TMAO) is a counteracting solute of benzyl alcohol for multi-dose formulation of immunoglobulin./ S. Yoshizawa, S. Oki, T. Arakawa, K. Shiraki // Int. J. Biol. Macromol. – 2018. – V. 107, Pt. A. – P. 984-989. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.09.072.

707. Zandomeneghi, G. FTIR reveals structural differences between native beta-sheet proteins and amyloid fibrils./ G. Zandomeneghi, M.R. Krebs, M.G. McCammon, M. Fändrich // Protein Sci. – 2004. – V. 13, №12. – P. 3314-3321. doi: 10.1110/ps.041024904.

708. Zastrow, M.S. Nuclear titin interacts with A- and B-type lamins *in vitro* and *in vivo*./ M.S. Zastrow, D.B. Flaherty, G.M. Benian, K.L. Wilson // J. Cell Sci. – 2006. – V. 119, Pt. 2. P. 239-249. doi: 10.1242/jcs.02728.

709. Zhai, J. Characterization of early stage intermediates in the nucleation phase of a beta aggregation./ J. Zhai, T.H. Lee, D.H. Small, M.I. Aguilar // Biochemistry. – 2012. – V. 51, №6. – P. 1070-1078. doi: 10.1021/bi201871r.

710. Zhang, A. A new approach to explore the impact of freeze-thaw cycling on protein structure: hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry (HX-MS)./ A. Zhang, W. Qi, S.K. Singh, E.J. Fernandez // Pharm. Res. – 2011. – V. 28, №5. – P. 1179-1193. doi: 10.1007/s11095-011-0383-z.

711. Zhang, N. Tailored poly(2-oxazoline) polymer brushes to control protein adsorption and cell adhesion./ N. Zhang, T. Pompe, I. Amin, R. Luxenhofer, C. Werner, R. Jordan // Macromol. Biosci. – 2012. – V. 12, №7. – P. 926-936. doi: 10.1002/mabi.201200026.

712. Zhang, L. Phase behavior of an Fc-fusion protein reveals generic patterns of ion-specific perturbation on protein-protein interactions./ L. Zhang, L. Yu, J.Z.-V. Enk, G.

Huang, J. Zhang // J. Pharm. Sci. – 2017a. – V. 106, №11. – P. 3287-3292. doi: 10.1016/j.xphs.2017.07.011.

713. Zhang, L. Degradation Mechanisms of Polysorbate 20 Differentiated by ^{18}O-labeling and Mass Spectrometry./ L. Zhang, S. Yadav, B. Demeule, Y.J. Wang, O. Mozziconacci, C. Schöneich // Pharm. Res. – 2017b. – V. 34, №1. – P. 84-100. doi: 10.1007/s11095-016-2041-y.

714. Zhou, R. Utilization of zwitterion-based solutions to dissect the relative effects of solution pH and ionic strength on the aggregation behavior and conformational stability of a fusion protein./ R. Zhou, V. Nashine, T. Palm, R. Gandhi, M. Adams // J. Pharm. Sci. – 2014. – V. 103, №10. – P. 3065-3074. doi: 10.1002/jps.24118.

715. Zolk, O. The ubiquitin–proteasome system: focus on the heart./ O. Zolk, C. Schenke, A. Sarikas // Cardiovasc. Res. – 2006. – V. 70, №3. – P. 410-421. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.12.021.

716. Zou, P. Palindromic assembly of the giant muscle protein titin in the sarcomeric Z-disk./ P. Zou, N. Pinotsis, S. Lange, Y.H. Song, A. Popov, I. Mavridis, O.M. Mayans, M. Gautel, M. Wilmanns // Nature. – 2006. – V. 439, №7073. – P. 229-233. doi: 10.1038/nature04343.

717. Zou, Y. Parallel β-sheet fibril and antiparallel β-sheet oligomer: new insights into amyloid formation of hen egg white lysozyme under heat and acidic condition from FTIR spectroscopy./ Y. Zou, Y. Li, W. Hao, X. Hu, G. Ma. // J. Phys. Chem. B. – 2013. – V. 117, – P. 4003-4013. doi: 10.1021/jp4003559.