

УДК 577.353.2

ИССЛЕДОВАНИЕ *in vitro* АГРЕГАЦИОННЫХ СВОЙСТВ МЫШЕЧНОГО X-БЕЛКА

© 2022 г. Л.Г. Бобылёва*, А.Г. Габдулхаков**, Н.Н. Салмов*,
И.М. Вихлянцев*, А.Г. Бобылёв*.*

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: bobilev1982@gmail.com

**Институт белка РАН, Институтская ул., 4, Пущино Московской области, 142290, Россия

Поступила в редакцию 31.05.2022 г.

После доработки 31.05.2022 г.

Принята к публикации 06.06.2022 г.

Особенностью агрегации X-белка (паралога миозин-связывающего C-белка) скелетных мышц является образование спирально-скрученных ленточных фибрилл, которые были ранее показаны методом электронной микроскопии. Для изучения полиморфизма агрегатов X-белка мы провели электронно-микроскопические исследования его агрегации в различных условиях. Был обнаружен агрегационный полиморфизм X-белка, формировавшего различные типы агрегатов – аморфные, протофибриллы, пучки линейных фибрилл, спирально-скрученные ленточные фибриллы, имеющие, предположительно, амилоидную природу. Для проверки этого предположения были проведены структурные исследования спирально-скрученных ленточных фибрилл X-белка методом рентгеновской дифракции, которые выявили наличие сильно размытых рефлексов 4.6 и 10 Å. Полученные результаты свидетельствуют о том, что фибриллы X-белка не имеют четвертичной кросс-β структуры, свойственной амилоидным фибриллам известных белков и пептидов, таких как, например, инсулин, амилоидный β-пептид и титин. Эти результаты противоречат полученным ранее данным об амилоидной природе агрегатов X-белка, интерпретация которых была основана на результатах о связывании с его фибриллами «амилоидных» красителей Конго красного и тиофлавина Т. Обнаруженная способность X-белка формировать неамилоидные агрегаты *in vitro* является, возможно, следствием защитного механизма, выработанного в ходе эволюции и направленного на предотвращение формирования в клетках токсичных нерастворимых амилоидных агрегатов.

Ключевые слова: мультидоменные мышечные белки, миозин-связывающий белок C, X-белок, агрегация, амилоиды.

DOI: 10.31857/S0006302922040032, EDN: ISNWQL

Известно, что пептиды и белки обладают способностью переходить из нативной формы, обеспечивающей заложенную в них функцию, в амилоидную форму [1]. На сегодняшний день амилоиды определяются как агрегаты «неправильно» свернутого пептида или белка, которые имеют кросс-β-структуру, что способствует их повышенной устойчивости к протеолитической деградации [1, 2]. Такие белковые агрегаты могут образовываться в различных тканях человека и животных, что связывают с развитием целого ряда заболеваний, включая болезнь Альцгеймера, Паркинсона, диабет II типа и другие [1]. Однако амилоиды привлекают внимание не только из-за связи с болезнями, но также благодаря их функциональной роли в организме [3]. Например, амилоиды, формируемые протеолитическими фрагментами белка Pmel17 в меланосомах, защи-

щают клетки от токсического действия предшественников меланина [4].

К настоящему времени механизмы формирования амилоидных агрегатов в организме изучены недостаточно. Модели амилоидообразования *in vitro* являются хорошим инструментом для изучения процесса амилоидной агрегации, поскольку формирование белками и пептидами амилоидо-подобных структур является универсальным свойством полипептидных цепей [5, 6]. Выявлен целый ряд белков, способных при определенных условиях *in vitro* образовывать амилоидо-подобные агрегаты или фибриллы, которые не обнаруживаются *in vivo* [7, 8]. Такими белками являются гладкомышечный титин и миозин-связывающий белок C (C-белок), формирующие амилоидо-подобные агрегаты *in vitro* [9]. Учитывая ряд особенностей агрегации титина и C-белка, таких как вы-

сокая скорость образования агрегатов, отсутствие изменений во вторичной структуре, данные белки представляют интерес для изучения механизмов агрегации.

Известно, что три паралога миозин-связывающего белка С кодируются отдельными генами с разными профилями экспрессии в поперечнополосатых мышцах. Так называемый медленный скелетный миозин-связывающий белок С (Х-белок) кодируется *MYBPC1*, а быстрый скелетный миозин-связывающий белок С (С-белок) кодируется *MYBPC2*, в то время как *MYBPC3* кодирует миозин-связывающий белок С сердечной мышцы [10]. Данные паралоги имеют значительную гомологию последовательностей и состоят из иммуноглобулин-подобных и фибронектин III-подобных доменов [10, 11]. Основной отличительной особенностью гена *MYBPC1* по сравнению с *MYBPC2* и *MYBPC3* является высокий уровень сплайсинга, которому может подвергаться его транскрипт [12]. У людей и мышей описано не менее 14 транскриптов, кодирующих Х-белок, при этом молекулярные массы его изоформ составляют ~126 кДа и 132 кДа [12, 13].

В данной работе методом электронной микроскопии изучены агрегационные свойства Х-белка — наиболее высокомолекулярного паралога миозин-связывающего белка С. Для выявления амилоидной природы агрегатов Х-белка проведены структурные исследования его спирально-скрученных ленточных фибрилл методом рентгеновской дифракции с целью выявления кросс-β-структуры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и очистка Х-белка. Х-белок был очищен из скелетных мышц кролика (мышцы туловища и задних конечностей) согласно методу, описанному в работе [14]. Мышцы гомогенизировали и миозин экстрагировали трехкратным (по отношению к весу мышц) объемом раствора Губа—Штрауба, содержащего 0.3 М КСl, 0.15 М К-фосфатный буфер, 1 мМ фенолметилсульфонилфторида, 20 мкг/мл ингибитора трипсина, рН 6.5. Экстракцию проводили при 4°C в течение 10–15 мин при непрерывном перемешивании, затем центрифугировали в течение 15 мин при 5000 g. Супернатант переосаждали 14-кратным объемом охлажденной бидистиллированной воды, содержащей 0.1 мМ ДТТ и 0.1 мМ NaN₃. Через 40–60 мин осадок миозина собирали центрифугированием в течение 30 мин при 2500 g. К осадку добавляли раствор, содержащий 2 М КСl, 0.2 М К-фосфатный буфер, 4 мМ ЭДТА, рН 7.0, до достижения конечной концентрации в 0.5 М КСl, 0.05 М К-фосфатного буфера, 1 мМ ЭДТА, рН 7.0. После растворения осадка его разбавляли раствором, содержащим 0.5 М КСl, 0.05 М К-

фосфатный буфер, 1 мМ ЭДТА, 0.1 мМ NaN₃, рН 7.0, до концентрации белка 12 мг/мл для последующего фракционирования сульфатом аммония.

К белковому раствору добавляли равный объем охлажденного до 4°C 2.8 М сульфата аммония (до 36%-го насыщения) в растворе, содержащем 0.5 М КСl, 0.05 М К-фосфатный буфер, 1 мМ ЭДТА, рН 7.0, оставляли на 20–30 мин для формирования актомиозинового осадка и затем центрифугировали в течение 1 ч при 2500 g. Осадок отбрасывали, а к супернатанту добавляли насыщенный при 4°C раствор сульфата аммония до достижения 43%-го насыщения. Через 30 мин образовавшийся осадок, содержащий преимущественно миозин и два паралога миозин-связывающего белка С (С-белок и Х-белок) собирали центрифугированием в течение 1 ч при 2500 g. Затем осадок растворяли в 0.15 М К-фосфатном буфере, рН 7.5, содержащем 10 мМ ЭДТА, 0.1 мМ ДТТ и 0.1 мМ NaN₃ («колоночный» буфер), и диализовали против этого же буфера до полного удаления сульфата аммония.

Миозин, полученный после осветления центрифугированием в течение 1 ч при 100000 g («доколоночный» миозин), содержал около 5% Х-белка и С-белка. Для их разделения от миозина «доколоночный» миозин подвергали ионообменной хроматографии на колонке с носителем DEAE-Sephadex A-50, уравновешенным колоночным буфером. Х-белок и С-белок элюировали в свободном объеме колонки и собирали для последующей очистки. В дальнейшем фракции этих двух белков концентрировали сульфатом аммония до степени насыщения 2.08 М и осаждали центрифугированием в течение 1 ч при 3000 g. Осадок растворяли в буфере, содержащем 0.3 М КСl, 4.8 мМ K₂HPO₄, 5.2 мМ KH₂PO₄, 0.1 мМ ДТТ, 0.1 мМ NaN₃, рН 7.0, и диализовали против этого же буфера до полного удаления сульфата аммония. Разделение Х-белка и С-белка проводили на колонке с гидроксипатитом, уравновешенным в этом же буфере. Для снятия белков с колонки использовали фосфатный градиент.

Концентрацию Х-белка определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Cary 100 (Varian, США), используя значение коэффициента экстинкции ($E_{280}^{1 \text{ мг/мл}}$), равное 1.09 [15].

ДСН-гель-электрофорез. Чистоту Х-белка проверяли с помощью ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле по методу [16] с модификациями. Согласно нашей методике, разделяющий гель содержал 7% полиакриламида вместо 15% (соотношение акриламида к бис-акриlamиду 199:1), а также 0.75 М трис-НСl буфер, рН 8.8, 0.1% ДСН, 10% глицерина, 0.05% тетраметилэтилендиамина и 0.05% персульфата аммония. Кроме этого, вместо концентрирующего геля с содер-

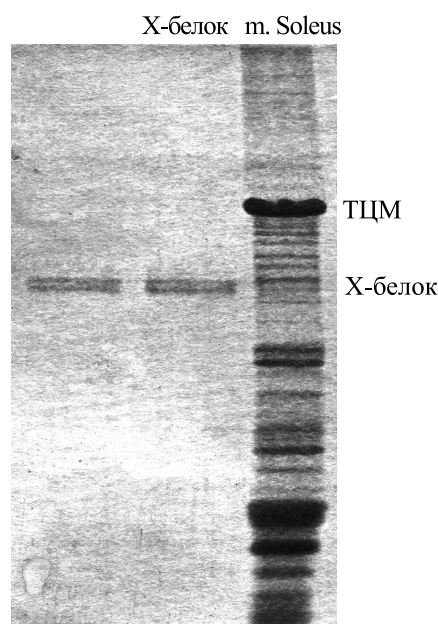


Рис. 1. ДСН-гель-электрофорез препарата очищенного X-белка (две левые дорожки). Правая дорожка – *m. soleus* кролика (контроль). Молекулярный вес X-белка скелетных мышц кролика на основании его электрофоретической подвижности оценивается в 145–152 кДа [18, 19]. ТЦМ – тяжелые цепи миозина.

жанием полиакриламида 5% (согласно работе [16]), мы применяли концентрирующий гель, использованный в работе [17] и содержащий 2.6–2.8% полиакриламида (соотношение акриламида к бис-акриламиду 36.5:1). Эти модификации способствовали лучшему фокусированию белковых полос в геле. Концентрирующий гель также содержал 0.125 М трис-НСl буфер, pH 6.8, 0.1% ДСН, 0.05% тетраметилэтилендиамина и 0.05% персульфата аммония.

Электродный буфер при проведении электрофореза содержал 0.192 М глицина, 0.025 М триса и 0.1% ДСН, pH 8.3. Электрофорез проводили при токе 3–5 мА в течение первых 30–60 мин, затем поднимали силу тока до 12–15 мА. По окончании электрофореза гели фиксировали 20–30 мин в растворе, содержащем 10% этанола и 10% уксусной кислоты, и окрашивали в течение 30–40 мин в растворе, содержащем 0.1% кумасси G-250 и R-250 (смешанных в пропорции 1:1), 45% этанола и 10% уксусной кислоты. Отмывку окрашенных гелей проводили в 7%-й уксусной кислоте при постоянном перемешивании на качалке.

Электронная микроскопия и условия формирования амилоидных агрегатов. Агрегаты X-белка формировали диализом в течение 24 ч при 4°C против следующих растворов: 1) 30 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0; 2) 30 мМ CaCl₂, 10 мМ имидазола, pH 7.0; 3) 30 мМ MgCl₂, 10 мМ имида-

зола, pH 7.0; 4) 10 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0; 5) 50 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0; 6) 500 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0. Каплю суспензии белка в концентрации 0.1 мг/мл наносили на покрытую углеродом пленку коллодия на медной сетке и окрашивали 2%-м водным раствором уранилацетата. Образцы исследовали на электронном микроскопе JEM-100B (Jeol, Япония).

Рентгеновская дифракция. Для исследования методом рентгеновской дифракции агрегаты X-белка, сформированные в растворе, содержащем 30 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0, 24 ч при 4°C, в концентрации 0.5 мг/мл и объеме 5 мл, были лиофилизированы с помощью лиофилизатора FreeZone 1L (Labconco, США). Затем лиофильно высушенные образцы были растворены в деионизированной воде до конечной концентрации ~100 мг/мл и помещены между двумя стеклянными палочками, покрытыми парафином.

Дифракционные изображения были получены с использованием генератора Microstar X-ray с оптикой HELIOX, оснащенный детектором Platimun135 CCD (X8 Proteum system, Bruker, Германия). Использовали Cu K α -излучение с $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$. Образцы располагали под прямым углом к рентгеновскому лучу с применением четырехосного каппа-гонометра.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены результаты ДСН-ПААГ-электрофореза препаратов очищенного X-белка, а также экстракта белков *m. soleus* в качестве контроля. На геле видны две белковые полосы, которые, по всей вероятности, являются изоформами X-белка или изоформой (верхняя полоса) и ее протеолитическим фрагментом (нижняя полоса).

Известно, что X-белок способен формировать высокоупорядоченные спирально-скрученные ленточные фибриллы с осевой периодичностью ~60–70 нм, шириной ~40 нм и длиной более 1 мкм [20]. Ранее также было показано, что X-белок формирует разные типы агрегатов. В частности, в проведенных нами исследованиях было показано, что X-белок формирует аморфные агрегаты, протофибриллы, линейные фибриллы и пучки линейных фибрилл в следующих растворах: 1) 50 мМ NaCl, 10 мМ Hepes, pH 7.0; 2) 25 мМ NaCl, 10 мМ Hepes, pH 7.0; 3) 50 мМ MgCl₂, 10 мМ имидазола, pH 7.0; 4) 30 мМ MgCl₂, 10 мМ имидазола, pH 7.0; 5) 0.15 М глицин-КОН, pH 7.5 [21].

В данном исследовании мы расширили список условий для формирования X-белком разных типов агрегатов. Результаты электронно-микроскопического исследования представлены на рис. 2. Обнаружены пучки фибрилл, полученные в рас-

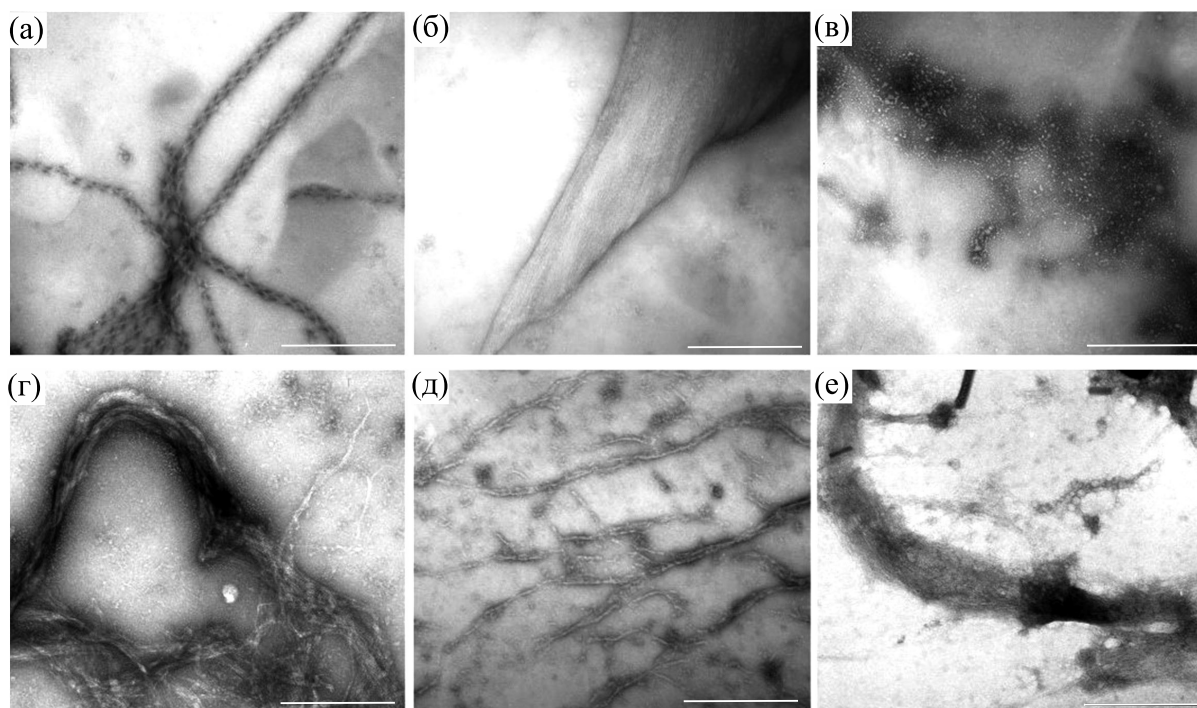


Рис. 2. Электронная микроскопия агрегатов Х-белка: (а) – спирально-скрученные ленточные фибриллы Х-белка, полученные в растворе, содержащем 30 мМ КСl, 10 мМ имидазола, рН 7.0; (б) – пучки фибрилл Х-белка, полученные в растворе, содержащем 30 мМ CaCl₂, 10 мМ имидазола, рН 7.0; (в) – аморфные агрегаты Х-белка, полученные в растворе, содержащем 30 мМ MgCl₂, 10 мМ имидазола, рН 7.0; (г) – пучки фибрилл Х-белка, полученные в растворе, содержащем 10 мМ КСl, 10 мМ имидазола, рН 7.0; (д) – протофибриллы и отдельно лежащие нити фибрилл Х-белка, полученные в растворе, содержащем 50 мМ КСl, 10 мМ имидазола, рН 7.0; (е) – пучки фибрилл Х-белка, полученные в растворе, содержащем 500 мМ КСl, 10 мМ имидазола, рН 7.0. Время инкубации всех образцов – 24 ч при 4°C. Негативное окрашивание 2%-м водным раствором уранилацетата, Шкала 500 нм.

творах, содержащих 30 мМ CaCl₂, 10 мМ КСl и 500 мМ КСl (рис. 2б,г,е); протофибриллы и отдельно лежащие нити фибрилл, полученные в растворе, содержащем 50 мМ КСl (рис. 2д), а также аморфные агрегаты в растворе, содержащем 30 мМ MgCl₂ (рис. 2в). На рис. 2 также представлены высокоупорядоченные спирально-скрученные ленточные фибриллы, полученные в растворе, содержащем 30 мМ КСl (рис. 2а), впервые визуализированные ранее [20]. Полиморфизм агрегатов Х-белка, его способность агрегировать в диапазоне значений ионной силы от 0.03 до 0.50, а также в присутствии различных ионов (Na⁺, Mg²⁺, Ca²⁺) свидетельствуют о высокой склонности данного белка к агрегации.

Проведенные ранее исследования также показали, что со спирально-скрученными ленточными фибриллами Х-белка, сформированными в растворе, содержащем 30 мМ КСl, связывались красители Конго красный и тиофлавин Т [21], которые применяются для выявления амилоидной структуры белковых агрегатов. На основании обнаруженного связывания было сделано заключение, что вышеуказанные агрегаты Х-белка явля-

ются амилоидными. Однако сейчас известно, что для точного определения принадлежности каких-либо фибрилл к амилоидным необходимо доказать наличие их четвертичной кросс-β-структуры. Для этих целей используют метод рентгеновской дифракции. С помощью данного метода четвертичная кросс-β-структура выявляется наличием двух рефлексов – 10.0 и 4.7 Å [22–25]. Предполагается, что рефлекс 4.6–4.8 Å возникает из-за периодичности связанных водородными связями β-цепей, ориентированных перпендикулярно оси волокна, а дифракция в области – 10–11 Å отображает расстояние между β-листами [26, 27].

В нашем исследовании для изучения внутренней структуры спирально-скрученных ленточных фибрилл Х-белка методом рентгеновской дифракции образцы были подготовлены по методике, описанной в работе [9]. При рентгенодифракционном исследовании агрегатов Х-белка были выявлены круговые диффузные рентгеновские рефлексы 10.0 и 4.6 Å (рис. 3б). Полученные рефлексy имеют высокую степень размытости и, по всей вероятности, свидетельствует только о β-структуре, имеющейся в иммуноглобулин- и

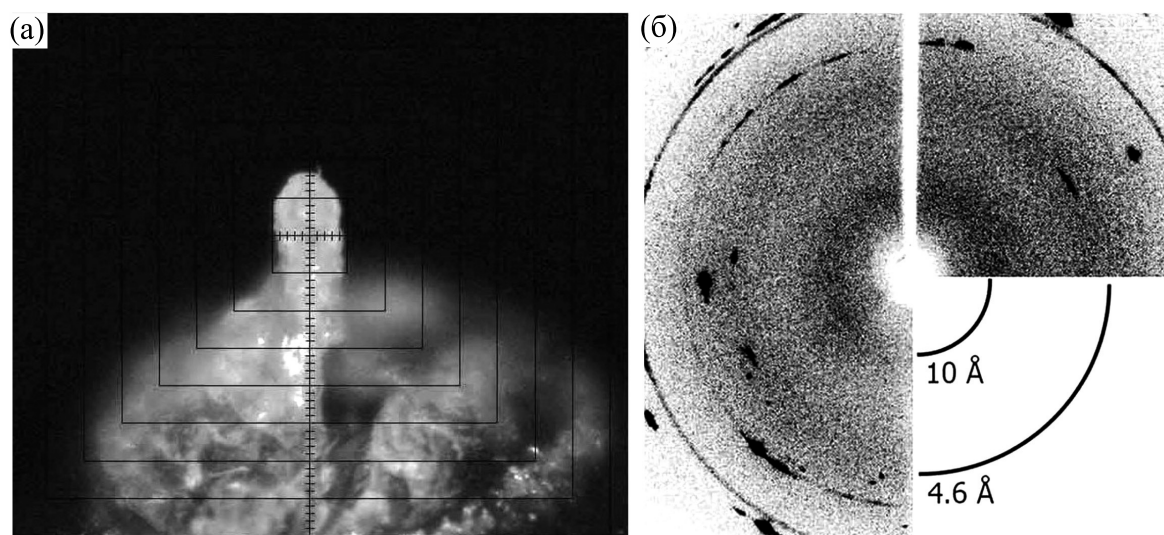


Рис. 3. Дифракция рентгеновских лучей в препаратах частично выровненного Х-белка: (а) — препарат образца фибрилл Х-белка, локализованный на поверхности парафиновой головки; (б) — полученные рефлексы для фибрилл Х-белка. Были обнаружены два диффузных рефлекса (4.6 и 10.0 Å). Из-за экстремально высокого размытия рефлексов можно сделать вывод об отсутствии четвертичной кросс-β-структуры, свойственной амилоидным белкам.

фибронектин III-подобных доменах Х-белка, а не о четвертичной кросс-β-структуре его фибрилл. Таким образом, мы утверждаем, что спирально-скрученные ленточные фибриллы Х-белка не имеют четвертичной кросс-β-структуры и, следовательно, не являются амилоидными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты наших исследований показывают, что Х-белок формирует *in vitro* разные по морфологии агрегаты. Наиболее структурированные спирально-скрученные ленточные фибриллы Х-белка не имеют упорядоченной кросс β-структуры и, следовательно, не являются амилоидными.

Таким образом, несмотря на высокую склонность Х-белка к агрегации *in vitro*, его агрегаты не являются амилоидными. Причина, которая лежит в основе неамилоидной агрегации Х-белка в отличие от амилоидной агрегации, например, «родственного» миозин-связывающего белка С, по всей вероятности, заключается в структурных особенностях доменов Х-белка, которые в процессе эволюции утратили способность формировать в клетках токсичные нерастворимые амилоидные агрегаты. Среди таких структурных особенностей может быть низкая идентичность в аминокислотной последовательности [9], наличие чередующихся структурированных и неструктурированных областей в молекуле белка [9], а также наличие S-S-связей, обеспечивающих общую стабильность молекул, не позволяющих произвести полный разворот молекулы в процес-

се агрегации для дальнейшего сворачивания в амилоидную структуру.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 22-24-00805 (задача, касающаяся выделения миозин-связывающих белков С, подтверждение чистоты выделенных препаратов методом электрофореза).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. F. Chiti and C. M. Dobson, *Annu. Rev. Biochem.*, **86**, 27 (2017).
2. P. J. Crouch, D. J. Tew, T. Du, et al., *J. Neurochem.*, **108**, 1198 (2009).
3. А. А. Нижников, К. С. Антоненц и С. Г. Ингевечтомов, *Биохимия*, **80** (9), 1356 (2015).
4. D. M. Fowler, A. V. Koulov, C. Alory-Jost, et al., *PLoS Biol.* **4** (1), e6 (2006).

5. M. Stefani and C. M. Dobson, *J. Mol. Med. (Berlin)*, **81**, 678 (2003).
6. C. M. Dobson, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **5**, 3 (2004).
7. S. M. Dorta-Estremera, J. Li, and W. Cao, *J. Vis. Exp.*, **82**, 50869 (2013).
8. L. Goldschmidt, P. K. Teng, R. Riek, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107** (8), 3487 (2010).
9. L. G. Bobyleva, S. A. Shumeyko, E. I. Yakupova, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 731 (2021).
10. J. W. McNamara and S. Sadayappan, *Arch. Biochem. Biophys.*, **660**, 121 (2018).
11. A. Vydyanath, Ch. A. Gurnett, S. Marston, et al., *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **33**, 61 (2012).
12. M. A. Ackermann and A. Kontrogianni-Konstantopoulos, *Front. Physiol.*, **4**, 391 (2013).
13. M. A. Ackermann and A. Kontrogianni-Konstantopoulos, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2010**, 652065 (2010).
14. G. Offer, C. Moos, and R. Starr, *J. Mol. Biol.*, **74**, 653 (1973).
15. R. Starr and G. Offer, *Methods Enzymol.*, **85** (Part B), 130 (1982).
16. J. D. Fritz, D. R. Swartz, and M. L. Greaser, *Anal. Biochem.*, **180**, 205 (1989).
17. H. Laemmli, *Nature*, **227** (5259), 680 (1970).
18. K. Yamamoto and K. Moos, *J. Biol. Chem.*, **258** (13), 8395 (1983).
19. R. Starr and G. Offer, *J. Mol. Biol.*, **170**, 675 (1983).
20. P. Bennett, R. Starr, A. Elliott, et al., *J. Mol. Biol.*, **184**, 297 (1985).
21. Л. Г. Марсагишвили, Дис. ... канд. биол. наук (Пушино, 2007).
22. D. M. Fowler, A. V. Koulov, C. Alory-Jost, et al., *PLoS Biol.*, **4**, e6 (2006).
23. H. Ramshini, C. Parrini, A. Relini, et al., *PLoS One*, **6**, e16075 (2011).
24. E. D. Eanes and G. G. Glenner, *J. Histochem. Cytochem.*, **16**, 673 (1968).
25. J. C. Stroud, C. Liu, P. K. Teng, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 7717 (2012).
26. D. Eisenberg and M. Jucker, *Cell*, **148** (6), 1188 (2012).
27. H. Wille, W. Bian, M. McDonald, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106** (40), 16990 (2009).

***In vitro* Study of Aggregation Properties of Muscle X-Protein**

L.G. Bobyleva*, A.G. Gabdulkhakov, N.N. Salmov*, I.M. Vikhlyantsev*, and A.G. Bobylev***

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 4, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

A feature of skeletal muscle X-protein aggregation is the formation of helical fibrils from twisted ribbons, which were previously observed by electron microscopy. To get a deeper understanding of polymorphism of X-protein aggregates, electron microscopy was used to study X-protein aggregation under various conditions. It was found that X-protein formed various types of aggregates: amorphous, protofibrils, bundles of linear fibrils, helical fibrils formed from twisted ribbons, presumably of amyloid nature. In order to confirm this assumption, structural studies of X-protein helical fibrils assembled from twisted ribbons were carried out using information from X-ray diffraction. The analysis revealed the presence of strongly blurred reflections at 4.6 and 10 Å. The results obtained indicate that the fibrils of X-protein do not possess a quaternary cross- β -structure that is characteristic for amyloid fibrils of known proteins and peptides, such as, for example, insulin, amyloid β -peptide and titin. These results contradict the previously obtained data on amyloid-like X-protein aggregation, the findings suggested that fibrils of X protein can bind "amyloid" dyes Congo red and thioflavin T. The ability of X-protein to form non-amyloid aggregates *in vitro* may be due to a defense mechanism developed through evolution that prevents the formation of toxic insoluble amyloid aggregates in cells.

Keywords: multidomain muscle proteins, myosin-binding protein C, X-protein, aggregation, amyloids