

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.353.2

ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ ТИТИНА ПРИ ЕГО АГРЕГАЦИИ

© 2020 г. А. Г. Бобылёв^{а, *}, Э. И. Якупова^а, Л. Г. Бобылёва^а, О. В. Галзитская^{а, b},
А. Д. Никулин^b, С. А. Шумейко^а, Д. А. Юршенас^а, И. М. Вихлянцев^{а, **}

^аИнститут теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино,
Московская обл., 142290 Россия

^bИнститут белка Российской академии наук, Пущино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: bobylev1982@gmail.com

**e-mail: ivanvikhlyantsev@gmail.com

Поступила в редакцию 04.12.2019 г.

После доработки 03.02.2020 г.

Принята к публикации 14.02.2020 г.

Изучена способность мышечного белка титина формировать *in vitro* особого рода амилоидо-подобные агрегаты. Основное отличие этих агрегатов от известных амилоидных состоит в образовании четвертичной структуры, напоминающей кросс-β-структуру, при отсутствии изменений во вторичной структуре. Высказаны предположения об изменениях в структуре титина, происходящих при формировании амилоидо-подобных агрегатов. Результаты рентгеноструктурного изучения агрегатов титина позволяют предположить, что β-участки в агрегатах располагаются не перпендикулярно оси фибриллы, как у других амилоидных белков, а параллельно. При этом расстояние между β-листами может варьировать, а сами β-листы не ориентированы строго по одной из осей, что может приводить к появлению диффузного кольцевого рефлекса ~8–12 Å. В связи с этим агрегаты титина следует называть не амилоидными, а амилоидо-подобными с четвертичной структурой, напоминающей кросс-β. Нельзя исключить, что формирование подобной четвертичной структуры может происходить и за счет частичного разворачивания доменов титина с последующим взаимодействием открытых β-стрендов между соседними доменами и/или доменами соседних молекул белка.

Ключевые слова: титин, амилоидо-подобные агрегаты, функциональные амилоиды, рентгеновская дифракция, кросс-β структура

DOI: 10.31857/S0026898420040047

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что формирование пространственной структуры белков имеет важное значение для выполнения ими своей функции и, следовательно, для нормальной жизнедеятельности клетки [1, 2]. Белки с двумя или более доменами распространены у высших организмов, они составляют до 70% всех белков эукариотических клеток. При этом белки с повторяющимися доменами составляют около 20% протеома многоклеточных организмов [3, 4]. Однако из-за сходства аминокислотных последовательностей соседних доменов, имеющих одинаковую структуру, например, β-складчатость, многодоменные белки чаще подвержены неправильному сворачиванию (misfolding/мисфолдингу) [5]. Накопление подобных форм белков или их агрегатов может приводить к нарушению жизнедеятельности и гибели клеток. Неправильное сворачивание белков и дальнейшая их агрегация — хорошо известный патологический процесс, который ассоциирован с такими заболеваниями, как амило-

идозы [6, 7]. К наиболее известным заболеваниям, связанным с амилоидной агрегацией белков, относятся амилоидозы почек, печени, селезенки, болезни Альцгеймера и Паркинсона, сахарный диабет типа II, прионные заболевания, а также системные амилоидозы [8–11].

Нами изучены амилоидные свойства мультидоменного мышечного белка титина (тайтина/коннектина). Молекулярные массы изоформ титина в гладких и поперечно-полосатых мышцах составляют 500–3800 кДа [12, 13]. В саркомерах поперечно-полосатых мышц титин взаимодействует как с миозиновыми (толстыми), так и с актиновыми (тонкими) нитями (рис. 1). Его молекулы длиной около 1 мкм и диаметром 3–4 нм перекрывают половину саркомера от M-зоны до Z-диска, формируя третий тип нитей, получивших название эластичных. Локализация титина в гладких мышцах не установлена. Титин — самый большой из известных мультидоменных белков. Наиболее высокомолекулярная изоформа титина, синтези-

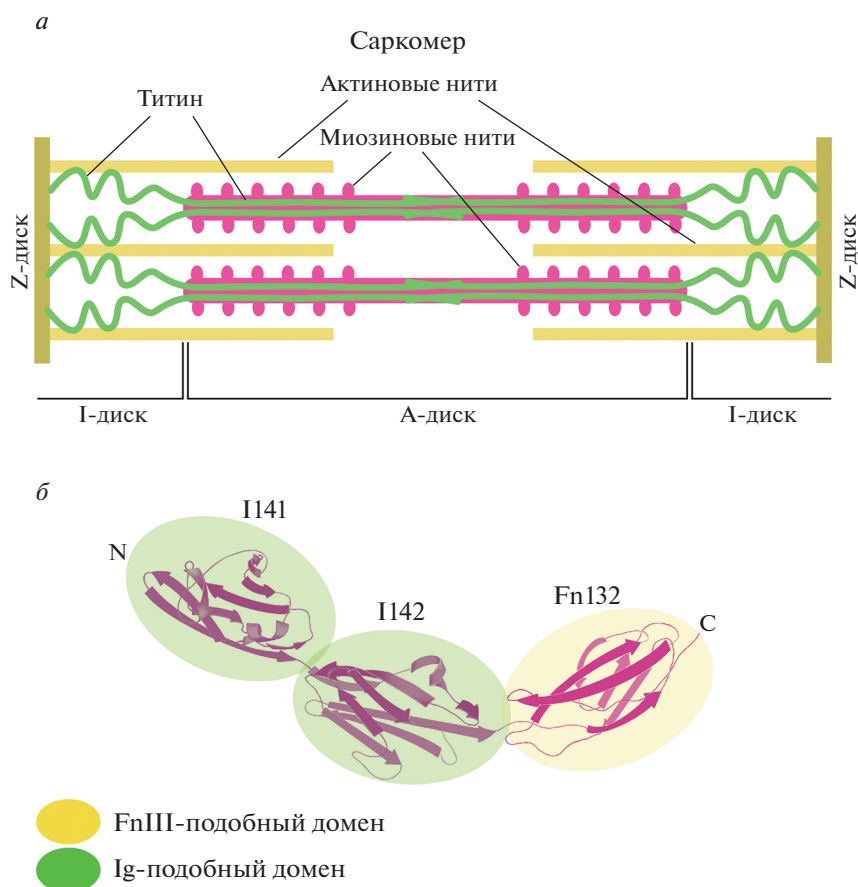


Рис. 1. Схематическое строение саркомера поперечно-полосатых мышц. *a* – Локализация титина внутри саркомера (показана зеленым цветом). *б* – Внутренняя структура титина на примере трех доменов белка (двух иммуноглобулин-подобных и одного фибронектин III-подобного), расположенных в А-диске саркомера. Источник: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q8WZ42>.

руемая в саркомерах скелетных мышц, содержит 283 домена, большая часть которых (до 90%) представлена повторяющимися иммуноглобулин-подобными (Ig) и фибронектин III-подобными (FnIII) доменами с β -складчатой структурой [14, 15].

Проведенные нами ранее исследования показали, что титин (м.м. 500 кДа) гладких мышц формирует *in vitro* амилоидные агрегаты [16, 17], которые оказывают токсическое действие на культуру гладкомышечных клеток [16]. Обнаружено также, что гладкомышечный титин способен формировать амилоидные агрегаты двух типов, которые имеют четвертичную кросс- β -структуру, но отличаются способностью связываться с красителем тиофлавином T [17]. При этом у амилоидных агрегатов одного типа, имеющих низкую способность к связыванию с тиофлавином T, обнаружена способность к дезагрегации. Методами кругового дихроизма не выявлено изменений во вторичной структуре гладкомышечного титина при формировании агрегатов указанного типа. Ранее [16, 17] мы утверждали, что титин формирует именно амило-

идные агрегаты со свойственной им четвертичной кросс- β -структурой. Однако на сегодняшний день мы можем сказать, что это не совсем верное утверждение.

В данной работе мы предприняли попытку объяснить, почему агрегаты титина не являются амилоидными в классическом понимании этого термина. Предпосылкой к подобным рассуждениям стали результаты, полученные при исследовании структуры агрегатов титина методом рентгеновской дифракции.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение титина из гладких мышц. Титин (м.м. 500 кДа) выделяли из гладких мышц желудка курицы согласно [18] с модификациями. Мышцы желудка гомогенизировали в 3–5-кратном (по отношению к массе мышц) объеме раствора, содержащего 50 мМ KCl, 2 мМ MgCl₂, 1 мМ EDTA, 1 мМ EGTA, 10 мМ имидазола, pH 7.0. Для уменьшения деградации белка в процессе выделения в раствор добавляли набор ингибиторов протеаз:

0.2 мМ фенолметансульфонилфторид, 0.5 мМ ди-тиотреитол (ДТТ), 0.05 мМ леупептин. Гомогенат мышц центрифугировали в течение 10 мин при 5000 g. Супернатант удаляли, а процедуру промывки повторяли 3–5 раз. К промытому осадку добавляли трехкратный объем экстрагирующего раствора, содержащего 0.6 М KCl, 2 мМ MgCl₂, 1 мМ EDTA, 1 мМ EGTA, 0.5 мМ ДТТ, 0.2 мМ фенолметансульфонилфторид, 10 мМ имидазол, рН 7.0, а также 0.05 мМ леупептин. Экстракцию проводили при 4°C в течение 60 мин при непрерывном перемешивании. Экстракт осветляли в течение 60 мин при 15000 g, супернатант разбавляли в 2.5 раза охлажденной бидистиллированной водой для преципитации актомиозина (конечная ионная сила ~0.2). Через 1 ч супернатант осветляли в течение 90 мин при 20000 g. Для осаждения титина супернатант разбавляли в 4 раза охлажденной бидистиллированной водой (конечная ионная сила ~0.05). Через 60 мин осадок, содержащий преимущественно титин, собирали центрифугированием в течение 60 мин при 15000 g. Осадок растворяли в небольшом объеме (не более 0.5 мл) колоночного буферного раствора, содержащего 0.6 М KCl, 30 мМ KН₂РO₄, 0.5 мМ ДТТ, 0.1 М NaN₃, рН 7.0, и осветляли в течение 10 мин при 20000 g. Титин очищали методом гель-филтрации на колонке с носителем Sepharose-CL2В, уравновешенным в этом же буфере.

ДСН-гель-электрофорез и Вестерн-блоттинг. Чистоту выделенного титина проверяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (ДСН-ПААГ) по методу [19] с нашими модификациями. В частности, мы использовали разделяющий гель с 7%-ным содержанием полиакриламида, приготовленный согласно [19]. Концентрирующий гель содержал 4% ПААГ и был приготовлен согласно [20]. Вестерн-блоттинг гладкомышечного титина проводили по [21] с модификациями, описанными в работе [16]. В частности, перенос белков из геля на PVDF-мембраны проводили в течение 24 ч. Использовали антитела 9D10 (моноклональные антитела на PEVK-область титина). В качестве вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, использовали антитела против IgG мышей (“Sigma”, США).

Электронная микроскопия и условия формирования амилоидных агрегатов. Агрегаты гладкомышечного титина формировали диализом в течение 3 и 24 ч при 4°C против раствора, содержащего 0.15 М глицин-КОН, рН 7.0–7.5, или раствора, содержащего 0.2 М KCl, 10 мМ имидазола, рН 7.0. Каплю суспензии белка в концентрации 0.1 мг/мл наносили на покрытую углеродом пленку коллодия на медной сетке и окрашивали 2%-ным водным

раствором уранилацетата. Образцы исследовали на электронном микроскопе JEM-100В (Япония).

Рентгеновская дифракция. Каплю концентрированного (~10 мг/мл) препарата белка в буферном растворе 0.15 М глицин-КОН, рН 7.0–7.5 или 0.2 М KCl, 10 мМ имидазол, рН 7.0 помещали между двух стеклянных палочек, покрытых парафином и находящихся на расстоянии 3–5 мм. При высыхании капли белок предположительно ориентировался в одном направлении, вытягиваясь между двумя стеклянными палочками и превращаясь в тонкую нить. Буферные растворы помещали в специальные стеклянные капилляры “для рентгеновской дифракции”. После чего образцы высушивали с образованием бесцветных кристаллов, которые и использовали для получения дифракционных данных. Дифракционные изображения получали, используя генератор Microstar X-ray с оптикой HELIOX, оснащенный Platinun135 CCD detector (X8 Proteum system, Bruker AXS). Использовали CuK_α-излучение с $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ (1 $\text{\AA} = 0.1 \text{ нм}$). Образцы располагали под прямым углом к рентгеновскому лучу с применением четырехосного каппа-гонометра.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Электронно-микроскопическое исследование агрегации титина

В настоящей работе методом электронной микроскопии показано, что титин формирует крупные аморфные агрегаты уже через 3 ч после начала диализа в двух разных растворах (рис. 2а, б). Учитывая относительно мягкие условия агрегации (нейтральные значения рН, ионная сила, близкая к физиологической, температура 4°C), подобная скорость агрегации белка является достаточно высокой. Эти результаты согласуются с данными, полученными нами ранее [17]. Однако следует отметить, что на электронных микрофотографиях мы наблюдали не только аморфные агрегаты, но и олигомеры (промежуточные формы агрегатов) размером 100 нм и менее (рис. 2в, г), которых не было среди аморфных агрегатов титина, сформированных в течение 24 ч [17]. Присутствие олигомерной фракции среди молекулярной формы белка было обнаружено нами ранее методом динамического светорассеяния [16, 17]. Однако тогда мы не обратили на это внимания и приняли олигомеры за возможную примесь. Новые электронно-микроскопические данные указывают на присутствие олигомеров титина на более ранних сроках его агрегации. Мы полагаем, что совокупность полученных нами данных может объяснить высокую скорость агрегации титина. Известно, что присутствие олигомеров в препарате белка значительно ускоряет его агрегацию [22]. Учитывая полученные нами результаты,

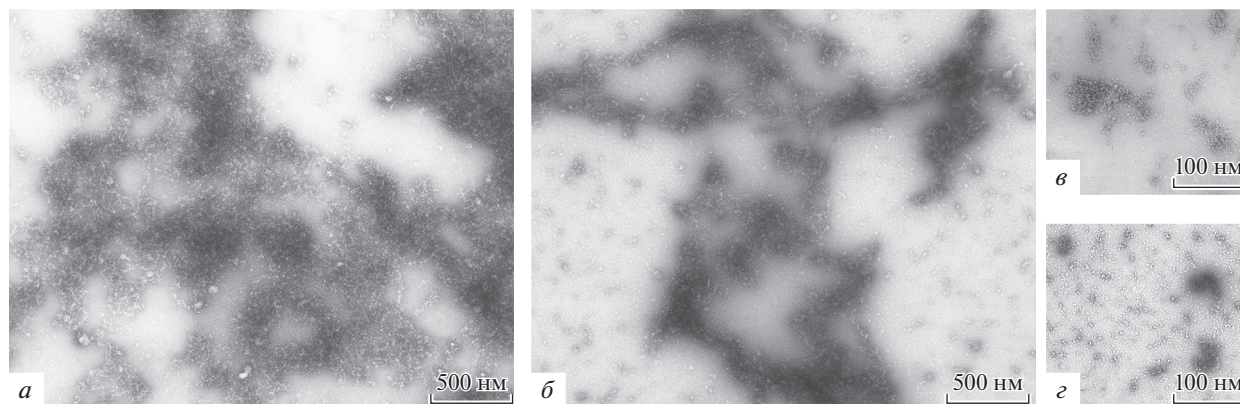


Рис. 2. Электронные микрофотографии аморфных агрегатов титина (*а, б*) и олигомеров титина (*в, з*), сформированных в течение 3 ч при 4°C в растворе 0.15 М глицин-КОН, рН 7.0 (*а, в*) и 0.2 М КСl, 10 мМ имидазола, рН 7.0 (*б, з*). Для окрашивания использовали 2%-ный водный раствор уранилацетата. Шкала 500 и 100 нм.

можно предположить, что высокая скорость агрегации титина обусловлена присутствием его олигомеров на начальных стадиях агрегации.

Итак, нами показано, что титин имеет достаточно высокую скорость агрегации. При этом необходимо обратить внимание на то, что условия агрегации титина *in vitro* близки к физиологическим, что отличает его от других амилоидных белков. По условиям агрегации, скорости и обратимости [17] этого процесса агрегаты титина, на наш взгляд, схожи с функциональными амилоидами. И теперь следует обсудить особенности изменения структуры титина при его агрегации.

Исследование структуры агрегатов титина методом рентгеновской дифракции

Известно, что основное свойство всех амилоидных агрегатов — это наличие четвертичной кросс- β -структуры с отдельными слоями, ориентированными параллельно главной оси роста фибрилл [23, 24] (рис. 3*а*). Подобную структуру обнаруживают методом рентгеновской дифракции. На препаратах частично выровненных амилоидных фибрилл дифракция рентгеновских лучей дает характерную картину, которая состоит из двух дифракционных рефлексов, расположенных на взаимно перпендикулярных осях [25–28]. 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 соответствует 4.7–4.8 Å. Второй тип дифракционных рефлексов, расположенных по горизонтали дифракционной картины (экваториальное направление), соответствует периоду 10–11 Å. Данные рефлексy указывают на то, что

полипептидные цепи организованы в β -листы, которые находятся на расстоянии 10–11 Å друг от друга [29, 30] (рис. 3*а*). Основное влияние на предложенную модель организации амилоидных фибрилл из β -листов оказали начатые в 30-е годы XX века исследования по рентгеноструктурному анализу ряда фибриллярных белков (фиброина, β -кератина, β -миозина, фибрина), а также фибрилл из глобулярного денатурированного белка альбумина [26, 31]. Получены сходные картины дифракции рентгеновских лучей. С помощью рентгеновской дифракции выявлены два экваториальных рефлекса 9.8 Å (“side-chain spacing”) и 4.65 Å (“backbone spacing”), характерных для фибриллярных и глобулярных денатурированных белков, а расстояние 3.4 Å отражало среднюю длину аминокислотного остатка в направлении главной цепи. До появления термина кросс- β -структура существовало понятие “pleated sheet” (“складчатый лист”) и “rippled sheet” (“рифленый лист”). В таких терминах описывали конфигурацию полипептидных цепей [31].

В случае менее ориентированных фибрилл оба типа рефлексов размываются и отображаются на дифракционной картинке в виде кольца [32]. Поэтому при исследовании амилоидных структур методом рентгеновской дифракции проводят специальную подготовку образца, позволяющую получить хорошо ориентированные фибриллы. В нашем исследовании структуры агрегатов титина методом рентгеновской дифракции применяли именно такую технику приготовления образца. В частности, каплю концентрированного препарата белка в буферном растворе помещали между двух стеклянных палочек, покрытых парафином и находящихся на расстоянии 3–5 мм. При высыхании капли белок ориентировался в одном направлении, вытягиваясь между двумя стеклянными палочками, превращаясь в тонкую нить. Подобная

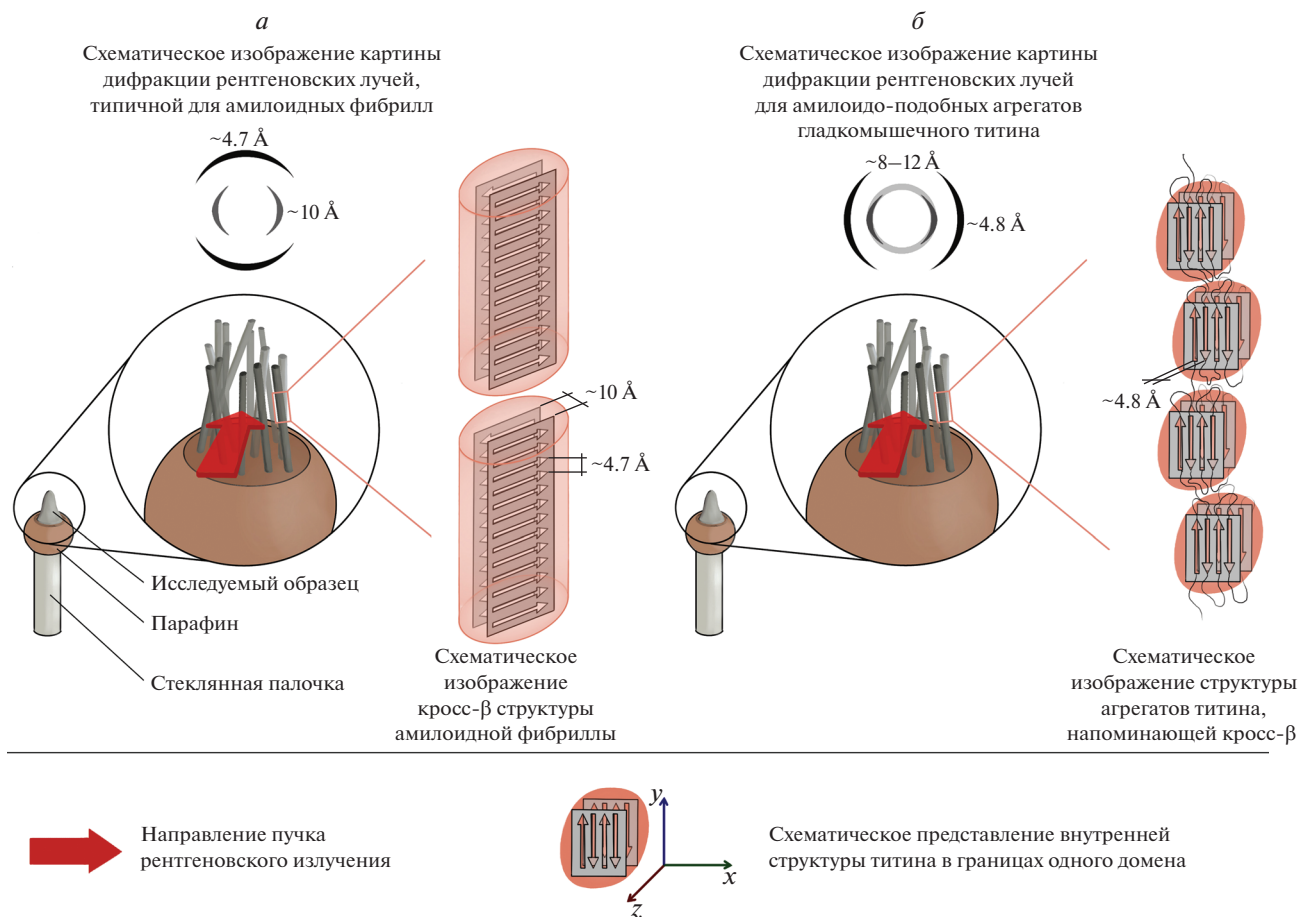


Рис. 3. Исследование амилоидной кросс-β-структуры методом рассеяния рентгеновских лучей на частично ориентированных препаратах известных амилоидных белков (а) и амилоидных агрегатов гладкомышечного титина (б). Для амилоидных фибрилл известных белков рефлексы, расположенные по вертикали (меридиональное 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. Для амилоидных агрегатов титина характерна дифракционная картина с экваториальным расположением рефлекса 4.8 Å, 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. Мы предполагаем, что Ig- и FnIII-подобные домены, состоящие из двух антипараллельных β-листов, находятся под разными углами к рентгеновому пучку, что и отображается диффузным рефлексом на дифракционной картине.

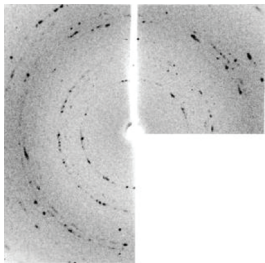
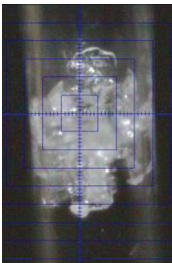
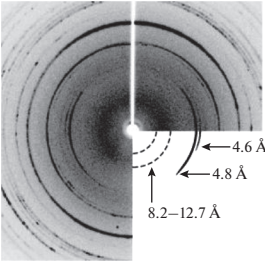
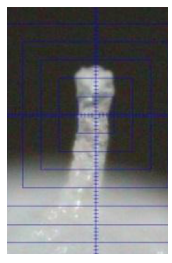
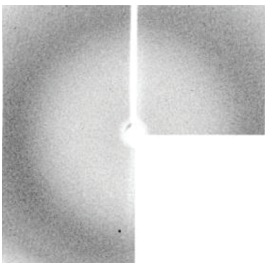
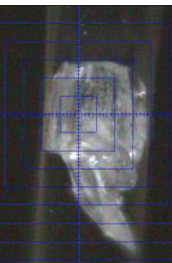
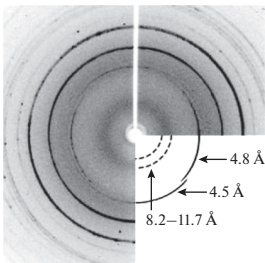

техника приготовления образца описана в работе [32]. Далее образец помещали в пучок рентгеновских лучей.

В табл. 1 (строки Б и Г) приведены полученные нами дифракционные рефлексы агрегатов гладкомышечного титина, сформированных в двух растворах: 0.2 М КСl, 10 мМ имидазол, рН 7.0 (Б) и 0.15 М глицин-КОН, рН 7.0 (Г). Как видно, оба типа агрегатов титина имеют схожую дифракционную картину с основными рефлексами (~8–12 и ~4.8 Å). Подобные рефлексы позволяют сделать вывод о том, что образцы титина имеют четвертичную кросс-β-структуру и являются амилоидными. Подобное заключение сделано нами ранее [17]. Однако мы столкнулись с рядом особенностей

и трудностей интерпретации полученных результатов, ставших причиной некоторых дискуссионных моментов, о которых речь пойдет далее.

Помимо указанных рефлексов обнаружены и другие (табл. 1 Б и Г), которые не удалось идентифицировать, т.е. определить, каким структурным элементам в агрегатах титина они соответствуют. Возможно, появление дополнительных рефлексов обусловлено присутствием 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 исследуемому белку. Поэтому мы провели дополнительные исследу-

Таблица 1. Данные, полученные методом рентгеновской дифракции

Строка	Дифракционная картина	Кристаллы образца	Состав образца	Рефлексы
А			Буферный раствор, содержащий 0.2 М КСl, 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 КСl, 10 мМ имидазоле (агрегация 24 ч) [17]	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-КОН	Область диффузии ~3.7 Å
Г			Гладкомышечный титин (м.м. 500 кДа) в агрегированной форме в 0.15 М глицин-КОН (агрегация 24 ч) [17]	2.2; 2.4; 2.5; 2.6; 2.8; 3.1; 3.7; 4.5; 4.8; 8.2–11.7 Å

дования образцов буферных растворов методом рентгеновской дифракции.

В табл. 1 (строки А и В) приведены данные рентгеновской дифракции буферных растворов, использованных для агрегации титина. Как видно, компоненты буферного раствора (0.2 М КСl, 10 мМ имидазол, рН 7.0) тоже имеют рефлексы, из которых только 3.7 Å и 3.8 Å совпадают с рефлексами образца белка (табл. 1 А, Б). В буферном растворе глицина не обнаружено рефлексов, выявлена лишь область диффузии с центром ~3.7 Å (табл. 1 В). Другие рефлексы (кроме 3.7–3.8 Å) на

картинах рентгеновской дифракции титина и буферных растворов не совпадают. Область диффузии с центром ~3.7 Å в образце с буферным раствором, содержащим 0.15 М глицин-КОН, может, вероятно, соответствовать расстоянию между атомами С α в *транс*-конформации С–N-связи самого глицина. Таким образом, наше предположение о том, что дополнительные рефлексы (помимо ~8–12 Å и ~4.8 Å) на картинах рентгеновской дифракции титина обусловлены присутствием в образце примесей в виде кристаллов солей и других компонентов буферных раство-

ров, 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 [33]. Рефлекс 2.4 Å, наблюдаемый на наших картинах рентгеновской дифракции титина, может соответствовать четвертому порядку указанного рефлекса (табл. 1 Б, Г). Также известно, что рефлекс 3.7 Å (табл. 1 Б, Г) соответствует парафину, с помощью которого крепится образец [34].

Другое наше затруднение было связано с интерпретацией основных “амилоидных” рефлексов на дифракционной диаграмме агрегатов титина. При вертикальной ориентации в пространстве образца с титином первый дифракционный рефлекс у обоих образцов (4.8 Å) располагался не по вертикали дифракционной картины (меридиональное направление), а по горизонтали (экваториальное направление) (рис. 3б, табл. 1 Б, Г). Исходя из этого, мы предположили, что β-участки в агрегатах титина располагаются не перпендикулярно оси фибриллы, как у других амилоидных белков (рис. 3а), а параллельно (рис. 3б). Второй рефлекс (~8–12 Å), характеризующий расстояние между β-листами, был диффузным и кольцевым (рис. 3б, табл. 1 Б, Г). Мы предполагаем, что расстояние между β-листами может варьировать, а сами β-листы не ориентированы строго по одной из осей (рис. 3б). Здесь следует отметить, что мы не встречали описания случаев, когда один из рефлексов, известных для кросс-β-структуры, кольцевой, а второй нет. Считается, что такое невозможно именно в случае кросс-β-структуры. Существует вероятность, что указанный диффузный рефлекс агрегированного белка может отображать не только расстояние между β-листами. Однако, что именно отображает этот рефлекс, мы пока не знаем. Полученные данные указывают на уникальность и сложность объекта нашего исследования – гигантского белка титина.

Известно, что Ig- и FnIII-подобные домены титина представляют собой β-сэндвич-домены, которые имеют два противоположных антипараллельных β-листа [35, 36]. Можно предположить, что в препаратах титина домены расположены под разными углами к рентгеновскому пучку, что приводит к появлению диффузного рефлекса на дифракционной картине (рис. 3б). Схематично представленные на рис. 3 структуры показывают лишь ориентацию листов и полипептидных цепей в них согласно полученной дифракционной картине. Реальная структура внутри агрегатов титина может быть иной. Одна из возможных структур титина при его агрегации описана в работе [37]. При исследовании неправильного сворачивания двух Ig-подобных (Ig27 и Ig28) доменов титина *in vitro* ме-

тодом молекулярной динамики описаны группы конформаций, получившие название “внутримолекулярный амилоид”. Исходя из полученных нами данных, можно сделать вывод, что агрегированный титин имеет лишь близкую к кросс-β четвертичную структуру, а если учитывать данные кругового дихроизма об отсутствии изменений во вторичной структуре титина при его агрегации [16], то можно предположить, что в его агрегатах представлены лишь участки кросс-β-структуры. В связи с этим, агрегаты титина следует называть амилоидо-подобными, а не амилоидными.

Рассуждая о возможном механизме формирования амилоидо-подобных агрегатов титина с четвертичной структурой, напоминающей кросс-β, необходимо отметить следующее. Поскольку вторичная структура агрегированного титина не изменяется [16], то можно предположить, что формирование четвертичной структуры, напоминающей кросс-β, при его агрегации также может происходить за счет частичного разворачивания его доменов с последующим взаимодействием открытых β-стрендов между соседними доменами и/или доменами соседних молекул белка. Подобные изменения не кажутся маловероятными, учитывая данные, описывающие значения силы, необходимой для разворачивания доменов титина. В частности, методом атомно-силовой микроскопии показано, что разворачивание доменов Ig/FnIII титина скелетных мышц происходит при относительно невысоких значениях силы (примерно 30–150 pN) [15, 38, 39]. На интактных миофибриллах, выделенных из скелетных мышц, показано, что частичное разворачивание отдельных Ig-доменов титина в I-зоне саркомера происходит при значении силы около 10 pN [40, 41]. Таким образом, опубликованные данные свидетельствуют, что для разворачивания доменов титина как *in situ*, так и *in vitro* требуются относительно небольшие затраты энергии. Высказано предположение, что в работающей мышце происходит разворачивание доменов титина [40, 41]. Возможно, с подобным явлением мы столкнулись в наших *in vitro* экспериментах при изучении агрегации этого белка. Мы предполагаем, что при агрегации происходит взаимодействие отдельных молекул титина, в результате которого боковые полипептидные цепи отдельных частично развернутых доменов взаимодействуют друг с другом, формируя участки, имеющие амилоидо-подобную структуру. При этом сам белок в агрегатах сохраняет большую часть вторичной структуры. Вероятно, это необходимо для того, чтобы была возможность вернуться в исходное состояние. Подтверждением могут служить наши результаты, свидетельствующие о дезагрегации титиновых агрегатов, сформированных в растворе, содержащем KCl [17]. Возможно, что такая амилои-

до-подобная обратимая агрегация титина играет некую роль в клетке. Полное разворачивание доменов титина как *in vivo*, так и *in vitro* маловероятно из-за наличия S-S-связей, а, следовательно, маловероятно и формирование амилоидных агрегатов этого белка в клетке.

Итак, результаты наших рентгеноструктурных исследований агрегатов титина позволяют сделать предположение, что β -участки в агрегатах этого белка располагаются не перпендикулярно оси фибриллы, как у других амилоидных белков, а параллельно. При этом расстояние между β -листами может варьировать, а сами β -листы не являются строго ориентированными по одной из осей, что может приводить к появлению диффузного кольцевого рефлекса $\sim 8\text{--}12 \text{ \AA}$. Поэтому агрегаты титина следует называть не амилоидными, а амилоидо-подобными, с четвертичной структурой, напоминающей кросс- β . Нельзя исключить, что формирование подобной четвертичной структуры может происходить и за счет частичного разворачивания доменов титина с последующим взаимодействием открытых β -стрендов между соседними доменами и/или доменами соседних молекул белка. Полученные результаты расширяют фундаментальные представления о белковой агрегации в широком понимании этого процесса и открывают перспективы изучения возможной функциональной роли агрегации амилоидо-подобного типа *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 18-04-00125, № 19-34-90054 “Аспиранты”) и гранта Российского научного фонда (№ 19-74-10051 для Якуповой Э.И. (исполнитель)) с использованием оборудования Регионального Пушкинского центра коллективного пользования “Структурно-функциональные исследования биосистем” Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН и Сектора электронной микроскопии ЦКП ПНЦБИ РАН.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tsytlonok M., Craig P.O., Sivertsson E., Serquera D., Perrett S., Best R.B., Wolynes P.G., Itzhaki L.S. (2013) Complex energy landscape of a giant repeat protein. *Structure*. **21**(11), 1954–1965. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.08.028>
2. Tian P., Best R.B. (2016) Best structural determinants of misfolding in multidomain proteins. *PLOS Comput. Biol.* **12**(5), e1004933. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004933>
3. Apic G., Gough J., Teichmann S.A. (2001) Domain combinations in archaeal, eubacterial and eukaryotic proteomes. *J. Mol. Biol.* **310**(2), 311–325. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4776>
4. Ekman D., Björklund A.K., Frey-Skött J., Elofsson A. (2005) Multi-domain proteins in the three kingdoms of life: orphan domains and other unassigned regions. *J. Mol. Biol.* **348**(1), 231–243. <https://doi.org/10.1016/j.jmb>
5. Han J.H., Batey S., Nickson A.A., Teichmann S.A., Clarke J. (2007) The folding and evolution of multi-domain proteins. *J. Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**(4), 319–330. <https://doi.org/10.1038/nrm2144>
6. Dobson C.M. (2003) Protein folding and misfolding. *Nature*. **426**(6968), 884–890. <https://doi.org/10.1038/nature02261>
7. Rousseau F., Schymkowitz J., Itzhaki L.S. (2012) Implications of 3D domain swapping for protein folding, misfolding and function. *Adv. Exp. Med. Biol.* **747**, 137–152. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3229-6_9
8. Knowles T.P., Vendruscolo M., Dobson C.M. (2014) The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**(6), 384–396. <https://doi.org/10.1038/nrm3810>
9. Dobson C.M. (2004) Experimental investigation of protein folding and misfolding. *Methods*. **34**(1), 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.03.002>
10. Buxbaum J.N., Linke R.P. (2000) A molecular history of the amyloidosis. *J. Mol. Biol.* **421**(2–3), 142–159. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.01.024>
11. Dobson C.M. (2004) Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**(1), 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2003.12.008>
12. Freundt J.K., Linke W.A. (2019) Titin as a force-generating muscle protein under regulatory control. *J. Appl. Physiol.* **126**(5), 1474–1482. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00865.2018>
13. Vikhlyantsev I.M., Podlubnaya Z.A. (2017) Nuances of electrophoresis study of titin/connectin. *Biophys. Rev.* **9**(3), 189–199. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0266-6>
14. Gregorio C.C., Granzier H., Sorimachi H., Labeit S. (1999) Muscle assembly: a titanic achievement? *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**(1), 18–25. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(99\)80003-9](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(99)80003-9)
15. Giganti D., Yan K., Badilla C.L., Fernandez J.M., Alegre-Cebollada J. (2018) Disulfide isomerization reactions in titin immunoglobulin domains enable a mode of protein elasticity. *Nat. Commun.* **9**(1), 185. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02528-7>
16. Bobylev A.G., Galzitskaya O.V., Fadeev R.S., Bobyleva L.G., Yurshenas D.A., Molochkov N.V., Dovidchenko N.V., Selivanova O.M., Penkov N.V., Podlubnaya Z.A., Vikhlyantsev I.M. (2016) Smooth muscle titin forms in vitro amyloid aggregates. *Biosci. Repts.*

- 36(3), pii: e00334.
<https://doi.org/10.1042/BSR20160066>
17. Yakupova E.I., Vikhlyantsev I.M., Bobyleva L.G., Penkov N.V., Timchenko A.A., Timchenko M.A., Enin G.A., Khutzian S.S., Selivanova O.M., Bobylev A.G. (2018) Different amyloid aggregation of smooth muscles titin *in vitro*. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **36**(9), 2237–2248.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1348988>
 18. Kim K., Keller T.C. 3rd (2002) Smitin, a novel smooth muscle titin-like protein, interacts with myosin filaments *in vivo* and *in vitro*. *J. Cell. Biol.* **156**(1), 101–112.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200107037>
 19. Fritz J.D., Swartz D.R., Greaser M.L. (1989). Factors affecting polyacrylamide gel electrophoresis and electroblotting of high-molecular-weight myofibrillar proteins. *Anal. Biochem.* **180**(2), 205–210.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90116-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90116-4)
 20. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**(5259), 680–685.
<https://doi.org/10.1038/227680a0>
 21. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1989) Immunoblotting in the clinical laboratory. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **27**(8), 495–501.
 22. Kumar S., Walter J. (2011) Phosphorylation of amyloid beta (A β) peptides – a trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer’s disease. *Aging.* **3**(8), 803–812
<https://doi.org/10.18632/aging.100362>
 23. Sunde M., Serpell L.C., Bartlam M., Fraser P.E., Pepys M.B., Blake C.C. (1997) Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J. Mol. Biol.* **273**(3), 729–739.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1348>
 24. Nelson R., Eisenberg D. (2006) Recent atomic models of amyloid fibril structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**(2), 260–265.
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.03.007>
 25. Makin O.S., Serpell L.C. (2005) Structures for amyloid fibrils. *FEBS J.* **272**(23), 5950–5961.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.05025.x>
 26. Astbury W.T., Dickinson S., Bailey K. (1935) The X-ray diffraction interpretation of denaturation and the structure of seed globulins. *Biochem. J.* **29**(10), 2351–2360.
<https://doi.org/10.1042/bj0292351>
 27. Eanes E.D., Glenner G.G. (1968) X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J. Histochem. Cytochem.* **16**(11), 673–677.
<https://doi.org/10.1177/16.11.673>
 28. Jahn T.R., Makin O.S., Morris K.L., Marshall K.E., Tian P., Sikorski P., Serpell L.C. (2010) The common architecture of cross-beta amyloid. *J. Mol. Biol.* **395**(4), 717–727.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.09.039>
 29. Eisenberg D., Jucker M. (2012) The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell.* **148**(6), 1188–1203.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.022>
 30. Wille H., Bian W., McDonald M., Kendall A., Colby D.W., Bloch L., Ollesch J., Borovinskiy A.L., Cohen F.E., Prusiner S.B., Stubbs G. (2009) Natural and synthetic prion structure from X-ray fiber diffraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**(40), 16990–16995.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0909006106>
 31. Pauling L., Corey R. (1953) Two rippled-sheet configurations of polypeptide chains, and a note about the pleated sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **39**(4), 253–256.
<https://doi.org/10.1073/pnas.39.4.253>
 32. Morris K.L., Serpell L.C. (2012) X-ray fibre diffraction studies of amyloid fibrils. *Methods Mol. Biol.* **849**, 121–135.
https://doi.org/10.1007/978-1-61779-551-0_9
 33. Inouye H., Fraser P., Kirchner D. (1993) Structure of beta-crystallite assemblies formed by Alzheimer beta-amyloid protein analogues: analysis by X-ray diffraction. *Biophys. J.* **64**(2), 502–519.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81393-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81393-6)
 34. Selivanova O.M., Grigorashvili E.I., Suvorina M.Y., Dzhus U.F., Nikulin A.D., Marchenkov V.V., Surin A.K., Galzitskaya O.V. (2016) X-ray diffraction and electron microscopy data for amyloid formation of A β 40 and A β 42. *Data Brief.* **8**, 108–113.
<https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.05.020>
 35. Clarke J., Cota E., Fowler S.B., Hamill S.J. (1999) Folding studies of immunoglobulin-like beta-sandwich proteins suggest that they share a common folding pathway. *Structure.* **7**(9), 1145–1153
[https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(99\)80181-6](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(99)80181-6)
 36. Erickson H.P. (1994) Reversible unfolding of fibronectin type III and immunoglobulin domains provides the structural basis for stretch and elasticity of titin and fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**(21), 10114–10118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.21.10114>
 37. Borgia A., Kemplen K.R., Borgia M.B., Soranno A., Shammas S., Wunderlich B., Nettels D., Best R.B., Clarke J., Schuler B. (2015) Transient misfolding dominates multidomain protein folding. *Nat. Commun.* **6**, 8861.
<https://doi.org/10.1038/ncomms9861>
 38. Bianco P., Martonfalvi Z., Naftz K., Koszegi D., Kellermayer M. (2015) Titin domains progressively unfolded by force are homogeneously distributed along the molecule. *Biophys. J.* **109**(2), 340–345.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.06.002>
 39. Martonfalvi Z., Bianco P., Naftz K., Ferenczy G.G., Kellermayer M. (2017) Force generation by titin folding. *Protein Sci.* **26**(7), 1380–1390.
<https://doi.org/10.1002/pro.3117>
 40. Rivas-Pardo J.A., Eckels E.C., Popa I., Kosuri P., Linke W.A., Fernandez J.M. (2016) Work done by titin protein folding assists muscle contraction. *Cell Reports.* **14**(6), 1339–1347.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.025>
 41. Eckels E.C., Haldar Sh., Tapia-Rojo R., Rivas-Pardo J.A., Fernandez J.M. (2019) The mechanical power of titin folding. *Cell Reports.* **27**(6), 1836–1847.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.046>

ALTERATIONS IN THE STRUCTURE OF TITIN DURING ITS AGGREGATION

**A. G. Bobylev^{1,*}, E. I. Yakupova¹, L. G. Bobyleva¹, O. V. Galzitskaya^{1,2}, A. D. Nikulin²,
S. A. Shumeyko¹, D. A. Yurshenas¹, and I. M. Vikhlyantsev^{1,**}**

¹*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

²*Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia*

**e-mail: bobylev1982@gmail.com*

***e-mail: ivanvikhlyantsev@gmail.com*

In this paper, the property of the muscle protein titin to form *in vitro* specific amyloid-like aggregates is discussed. Their main difference from the known amyloid aggregates is the formation of quaternary structure that resembles cross- β , with no changes in the secondary structure. Based on the results obtained earlier, as well as the results of this study, we make assumptions about changes in titin structure that occur during the formation of amyloid-like aggregates. In particular, the results of our X-ray diffraction studies of the titin aggregates suggest that β -strands in the aggregates of this protein are not located perpendicular to the fibril axis, as described for other amyloid proteins, but in parallel. The distance between the β -sheets in the aggregates may vary, and the β -sheets themselves are not strictly oriented along one of the axes, which can lead to the appearance of a diffuse ring reflex of $\sim 8\text{--}12$ Å. In this regard, the titin aggregates should not be called amyloid, but amyloid-like, with a quaternary structure that resembles cross- β . It cannot be excluded that formation of such a quaternary structure can also occur due to the partial unfolding of titin domains, followed by the interaction of open β -strands between neighboring domains and/or domains of neighboring molecules.

Keywords: titin, amyloid-like aggregates, functional amyloids, X-ray diffraction, cross- β structure