

©Коллектив авторов

## МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ АМИЛОИДООБРАЗОВАНИЯ А $\beta$ ПЕПТИДОМ: ОБЗОР СОБСТВЕННЫХ РАБОТ

*О.М. Селиванова<sup>1</sup>, В.В. Розачевский<sup>2</sup>, А.К. Сурин<sup>1,3</sup>, О.В. Галзитская<sup>1\*</sup>*

<sup>1</sup>Институт белка,

142290, Пушкино Московской обл., ул. Институтская, 4; эл. почта: ogalzit@vega.protres.ru

<sup>2</sup>Институт биофизики клетки, 142290, Пушкино Московской обл.

<sup>3</sup>Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии,  
142279, пос. Оболенск, Московская обл., Серпуховский р-н

Характерной особенностью амилоидных структур является полиморфизм. Изучение амилоидных структур и процесса их формирования было проведено для синтетических и рекомбинантных препаратов А $\beta$ (1-40) и А $\beta$ (1-42) пептидов. При исследовании этих пептидов нами были получены фибриллы разной морфологии. Мы наблюдали фибриллярные образования в виде одиночных фибрилл, лент, жгутов, пучков и кластеров. Полиморфизм фибрилл наблюдается не только при изменении условий среды, но и в одних и тех же условиях, и является общей характерной особенностью всех амилоидных формирований. Фибриллы А $\beta$ (1-40) пептидов имеют тенденцию формировать агрегаты фибрилл в виде лент, в то время как А $\beta$ (1-42) пептид в тех же условиях полимеризуется в виде шероховатых фибрилл разного диаметра и имеет склонность к ветвлению. Мы предполагаем, что формирование фибрилл А $\beta$ (1-40) и А $\beta$ (1-42) пептидов происходит по упрощенной схеме: дестабилизированный мономер  $\rightarrow$  кольцевой олигомер  $\rightarrow$  зрелая фибрилла, состоящая из кольцевых олигомеров. Исходя из положения, что именно кольцевой олигомер является основной строительной единицей амилоидной фибриллы (аналогично клетке в организме), можно легко объяснить полиморфизм фибрилл, а также дробление зрелых фибрилл при различных внешних воздействиях, ветвление и неоднородность диаметра (шероховатость поверхности) фибрилл. Одним из аспектов изучения амилоидогенеза является определение участков полипептидной цепи, формирующих остов амилоидной фибриллы. Нами теоретически предсказаны амилоидогенные участки для двух изоформ А $\beta$  пептидов, способные формировать амилоидную структуру – аминокислотные остатки (а.о) 16-21 и 32-36. При помощи метода tandem mass-спектрометрии эти участки были определены экспериментально. Показано, что участки пептида А $\beta$ (1-40) с 16 по 22 и с 28 по 40 а.о. устойчивы к воздействию протеаз, то есть входят в остов амилоидной фибриллы. Для А $\beta$ (1-42) пептида показано, что вся последовательность недоступна действию протеаз, что свидетельствует о разном способе ассоциации кольцевых олигомеров при формировании фибрилл. На основании методов электронной микроскопии и масс-спектрометрических данных нами предложена молекулярная модель фибриллы, образованной А $\beta$ (1-40) и А $\beta$ (1-42) пептидами.

**Ключевые слова:** олигомер, ядро, полиморфизм, фибрилла, амилоидогенные участки, изоформа

**DOI:** 10.18097/PBMC20186401094

### ВВЕДЕНИЕ

С момента обнаружения связи амилоидов с различными тяжёлыми заболеваниями, такими, например, как болезнь Альцгеймера, Паркинсона, их исследованию уделяется всё большее внимание. Если в 60-х годах 20 века в основном исследовали амилоиды как таковые, например, амилоидные депозиты в мозге человека при болезни Альцгеймера, то после появления метода расшифровки аминокислотной последовательности (а.п.) белков/пептидов [1] и определения состава различных амилоидных образований, стали исследовать механизм формирования фибрилл конкретных белков. В случае болезни Альцгеймера это А $\beta$  пептид, фибриллы которого формируют агрегаты (бляшки) в мозге человека. В настоящее время установлено, что начало формирования фибрилл связано с дестабилизацией структуры молекулы мономерного белка, далее процесс формирования фибриллы по упрощенной схеме проходит по пути формирования из частично развернутых молекул белка олигомерных агрегатов и, наконец, формирования фибриллярных

структур до нескольких мкм длиной и диаметром около 10 нм. Данный процесс является общим для амилоидных белков/пептидов и, что особенно интересно, средние параметры по длине и диаметру фибрилл в основном сохраняются. Таким образом, можно предположить, что формирование фибрилл может проходить по общей схеме и механизм полимеризации дестабилизированных белков/пептидов является универсальным, природным способом агрегации частично развернутых белков/пептидов. В последнее время всё большее внимание стали уделять не только фибриллам, но и промежуточным образованиям в виде различных олигомеров по пути формирования зрелых фибрилл. Это связано с тем, что при проведении проверки на токсичность было установлено, что, уже начиная с димеров, проявляется токсичность белков/пептидов на клеточных культурах [2]. Появились работы, в которых на ранних этапах формирования фибрилл фиксировали с помощью электронной микроскопии (ЭМ) округлые кольцевые частицы, диаметр которых часто совпал с диаметром зрелых фибрилл [3, 4]. Кольцевые олигомеры наблюдали для многих амилоидогенных

белков. Такие олигомеры имели ряд признаков, характерных для фибриллярных образований, например, связывание с тиофлавином Т (ThT) и наличие кросс-β структуры [5]. Кроме того, фиксировалась их большая токсичность по сравнению со зрелыми фибриллами. В связи с этим высказывается предположение, что такая кольцевая структура может формировать на поверхности клеток поры и влиять на жизнеспособность клетки [6]. Отсюда возникает другое предположение, что не сами амилоиды представляют угрозу для организма в целом, а именно различные промежуточные олигомерные образцы, поскольку описаны случаи наличия, например, депозитов Аβ пептида и отсутствия при этом каких-либо признаков болезни Альцгеймера. Формирование фибрилл тогда может рассматриваться как один из защитных механизмов организма для уменьшения количества олигомеров [7, 8]. В связи с этим исследованию промежуточных состояний агрегации белков на пути формирования фибрилл уделяется внимание не только для расшифровки механизма фибриллообразования, но и для разработки различных подходов для борьбы с олигомеризацией, что поможет предложить эффективные методы профилактики и предотвращения тяжёлых амилоидогенных заболеваний. Отдельной частью исследований можно назвать использование различных амилоидных образований в виде фибрилл, нанопленок в развивающейся области молекулярной биологии – нанобиотехнологии. Различные супрамолекулярные комплексы, в частности, образованные на основе природных белков/пептидов являются биосовместимыми наноматериалами и являются наиболее перспективными для различного применения, прежде всего *in vivo*. В результате развития биоинформатических методов исследования стало возможным не только установление в различных природных белках/пептидах амилоидогенных фрагментов, но и предсказание влияния мутаций на поведение таких коротких пептидов, более того, появилась возможность конструировать пептиды с заранее заданными свойствами.

Таким образом, в настоящее время интерес к изучению амилоидных структур не только не уменьшается, но и в связи с появлением новых аспектов в этой области исследований только возрастает, о чём может свидетельствовать количество публикаций по изучению Аβ пептида и его фрагментов (более 70 тыс. на конец 2016 г.). Пожалуй, это одно из наиболее развивающихся направлений молекулярной биологии, особенно с учётом значимости влияния ряда амилоидогенных белков на здоровье человека. За последнее время можно отметить повышенное внимание к изучению токсичности всех компонентов процесса формирования фибрилл (мономеров, различных олигомерных образований, зрелых фибрилл), а соответственно, к разработке подходов, позволяющих влиять на все стадии этого процесса. Такие исследования приближают нас к пониманию механизма токсичности агрегатов и конструированию соответствующих терапевтических препаратов, способных влиять на процесс формирования фибрилл на всех его этапах.

Кроме того, всестороннее исследование морфологии зрелых амилоидных фибрилл при изменяющихся условиях их формирования (ионные условия, температура, pH, агитация), привело к пониманию, что данным процессом можно управлять.

## 1. ПОЛИМОРФИЗМ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ И ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ АМИЛОИДООБРАЗОВАНИЯ Аβ ПЕПТИДА

До последнего времени существовало представление, что утверждение об амилоидной природе белков/пептидов может базироваться на ряде методов исследования: двойное лучепреломление при окрашивании красителем конго красным, флуоресцентная спектроскопия (взаимодействие с ThT), микроскопические методы исследования (наличие фибриллярной морфологии), рентгеноструктурный анализ (присутствие рефлексов, характерных для кросс-β структуры). На основании всей совокупности данных делался вывод о том, что наблюдаемые с помощью микроскопических методов (ЭМ, крио-ЭМ, АСМ) фибриллы являются амилоидами [3, 5]. В настоящее время накопились данные, указывающие на то, что не со всеми фибриллами амилоидной природы происходит связывание ThT, и не все амилоидные фибриллы имеют чёткие рефлексы, характерные для кросс-β структуры [9]. Кроме того, при рентгеноструктурном анализе часто наблюдается большое количество иных рефлексов, на которые не всегда обращается должное внимание, что связано со сложностями в их расшифровке (см. раздел 2). Связано это в том числе и с тем, что существующие на настоящий момент модели формирования амилоидных фибрилл часто не позволяют однозначно ответить на вопрос, к какому элементу структуры относится тот или иной рефлекс. В настоящее время основными методами исследования процесса амилоидообразования остаются ЭМ и рентгеноструктурный анализ. В связи с накопившимся объемом экспериментальных данных возрастает роль биоинформатических методов анализа полученных результатов и предсказание возможной структурной организации амилоидных фибрилл. Однако без правильного представления о механизме/механизмах формирования амилоидных структур невозможно дать правильную интерпретацию организации амилоидных структур на молекулярном уровне.

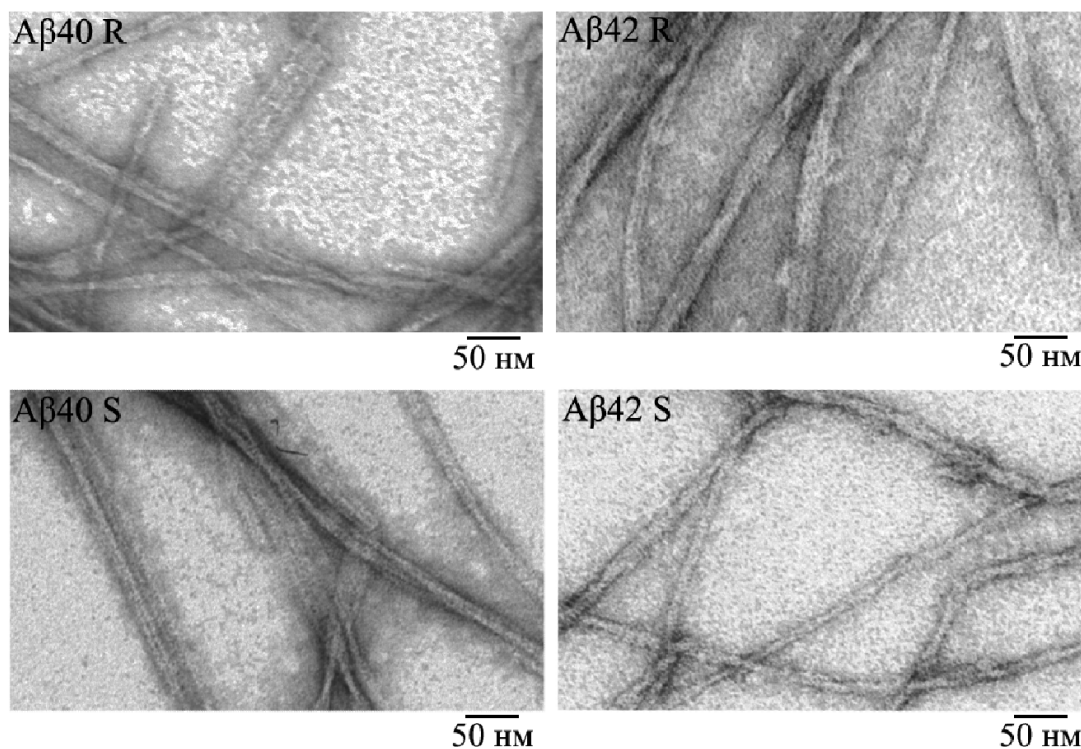
Существует представление, что амилоидные фибриллы построены из филаментов (от 2-х до 6-ти), которые могут взаимодействовать друг с другом либо латерально с образованием лент или пучков, либо перекручиваться друг относительно друга с разным периодом [5]. В обоих случаях из таких образований формируются пучки, жгуты и крупные кластеры агрегатов фибрилл на поздних временах их образования. Полиморфизм амилоидных фибрилл является их характерным свойством. На морфологию амилоидных фибрилл влияют условия их формирования (ионные условия, pH, температура, агитация), фирма производитель, способ получения (синтетические или рекомбинантные

препараты), а также различные модификации а.п. пептидов. Кроме того, полиморфизм наблюдается при одних и тех же условиях. Например, показано, что А $\beta$ (1-40) пептид образует фибриллы различной морфологии при одних и тех же ионных условиях, но полученных при перемешивании и без. При перемешивании образуются в основном перекрученные с разным периодом фибриллы, а без перемешивания фибриллы имеют склонность к латеральной ассоциации в ленты разной ширины. Кроме того, было показано, что фибриллы, полученные без активации, проявляют большую токсичность на культурах клеток [9, 10]. Поэтому важно изучить все возможные образования, включая олигомеры на ранних временах формирования фибрилл и зрелые фибриллы разной морфологии.

Для изучения процесса фибриллообразования нами исследованы как коммерческие препараты А $\beta$ (1-42) и А $\beta$ (1-40) пептидов от разных фирм [11], так и генно-инженерные препараты этих изоформ А $\beta$  пептида [12–15]. Для этого были получены штаммы-суперпродуценты соответствующих пептидов и отработаны методики их выделения и очистки [12, 13, 15]. Чистоту всех синтетических и рекомбинантных А $\beta$ (1-42) и А $\beta$ (1-40) пептидов проверяли с помощью масс-спектрометрического анализа. Для всех пептидов были подобраны условия формирования фибрилл и привлечены основные методы их исследования: ЭМ, рентгеноструктурный анализ, флуоресцентная спектроскопия (связывание с ThT) и масс-спектрометрия. Что касается

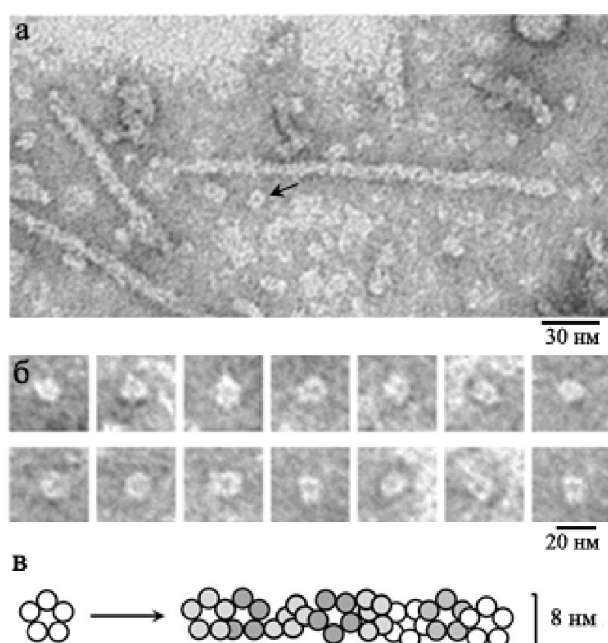
коммерческих препаратов А $\beta$ (1-42) пептидов, то мы впервые проверили и сравнили синтетические препараты пяти фирм производителей (“Anaspec”, “Invitrogene”, “Enzo”, и “Sigma Aldrich”, “SyntAssist”) на их пригодность для изучения процесса амилоидообразования и обнаружили, что имеет большое значение не только фирма производитель, но даже лот препарата [11]. Несмотря на то, что все препараты формируют фибриллы, их морфология, скорость формирования фибрилл несколько отличаются друг от друга. Основной нашей рекомендацией является обязательная проверка чистоты препарата А $\beta$  пептида (и даже его наличия в упаковке) с помощью масс-спектрометрического анализа. Проведя анализ опубликованных работ из PubMed (10 тысяч скачанных в общем доступе работ по изучению амилоидообразования А $\beta$  пептида) мы убедились, что лидером по продажам синтетического препарата является “Sigma Aldrich”. Однако это и самые дорогие препараты.

Поскольку коммерческие препараты А $\beta$  пептидов по стоимости очень дороги, нам пришлось получить рекомбинантные А $\beta$ (1-40) и А $\beta$ (1-42) пептиды и исследовать на них процесс амилоидообразования. Сравнение данных по синтетическим (“Sigma Aldrich”) и рекомбинантным А $\beta$ (1-40) и А $\beta$ (1-42) пептидам показало, что рекомбинантные и синтетические А $\beta$ (1-40) пептиды имеют сходную морфологию (между собой) и она отличается от морфологии рекомбинантных и синтетических А $\beta$ (1-42) пептидов (рис. 1) [12, 15].



**Рисунок 1.** ЭМ изображения препаратов рекомбинантных и синтетических А $\beta$ (1-40) и А $\beta$ (1-42) пептидов. Фибриллы А $\beta$ (1-40) пептида имеют склонность к латеральной ассоциации и ассоциируют в виде лент. Фибриллы А $\beta$ (1-42) пептида формируют фибриллы разного диаметра с шероховатой поверхностью. В дополнение к фибриллам диаметром до 8 нм для обоих пептидов также наблюдаются фибриллы большего диаметра: до 15 нм для А $\beta$ (1-40) и от 15 до 35 нм для А $\beta$ (1-42) пептида.

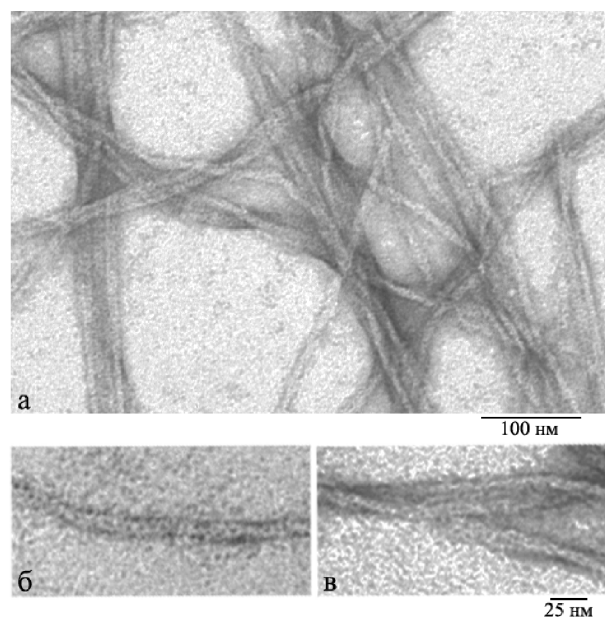
При использовании метода флуоресцентной спектроскопии для изучения кинетики фибриллообразования амилоидными белками/пептидами отмечается лаг-период, во время которого происходит подготовка к росту фибрилл и не наблюдается включение ThT, а также наблюдается период активного роста фибрилл, о котором судят по включению ThT. Нам не удалось получить выраженного и воспроизводимого лаг-периода для препаратов как синтетических, так и рекомбинантных A $\beta$ (1-40) и A $\beta$ (1-42) пептидов. Однако по данным ЭМ, уже в начальный период фибриллообразования можно наблюдать, как олигомерные округлые частицы с диаметром около 8 нм (часто в виде кольца или бублика), так и небольшие до 50-100 нм в длину, короткие фибриллы с аналогичным диаметром. К 8 ч инкубации количество кольцевых олигомеров уменьшается, а длина фибрилл увеличивается (рис. 2).



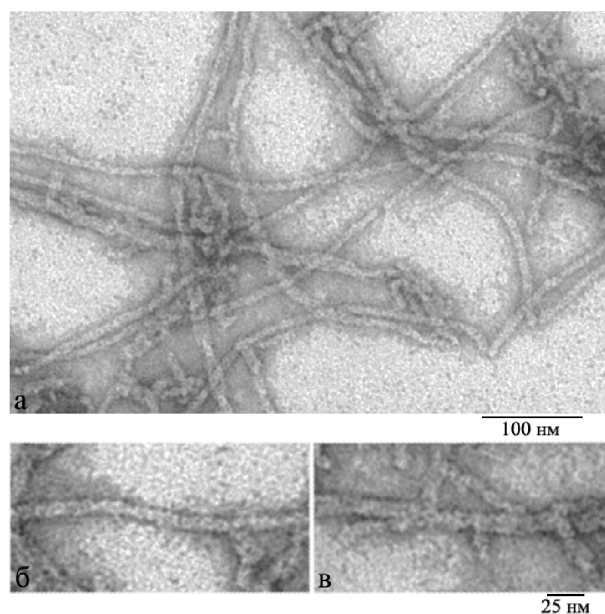
**Рисунок 2.** ЭМ изображения синтетического A $\beta$ (1-42) пептида: а - поле препарата, заметны как фибриллы, так и кольцевые олигомеры; б - подборка кольцевых олигомеров; в - схематическое изображение способа формирования фибрилл. Препарат фирмы "Invitrogen", вода (рекомендация фирмы), инкубация 8 ч при 37°C.

При дальнейшей инкубации препаратов кольцевые олигомеры исчезают и формируются фибриллы длиной до 5-10 мкм и диаметром около 8 нм (самые тонкие фибриллы). При этом наблюдается значительный полиморфизм фибрилл, характеризующий их различной формой и диаметром, склонностью к ветвлению. Морфология изоформ A $\beta$  пептидов различается (рис. 3, 4). Для A $\beta$ (1-40) пептида характерна латеральная ассоциация фибрилл с формированием лент разной ширины и перекрученности (рис. 3).

A $\beta$ (1-42) пептид чаще формирует жгуты, пучки разного диаметра, при этом отмечается шероховатая поверхность фибрилл и тенденция к их ветвлению (рис. 4).

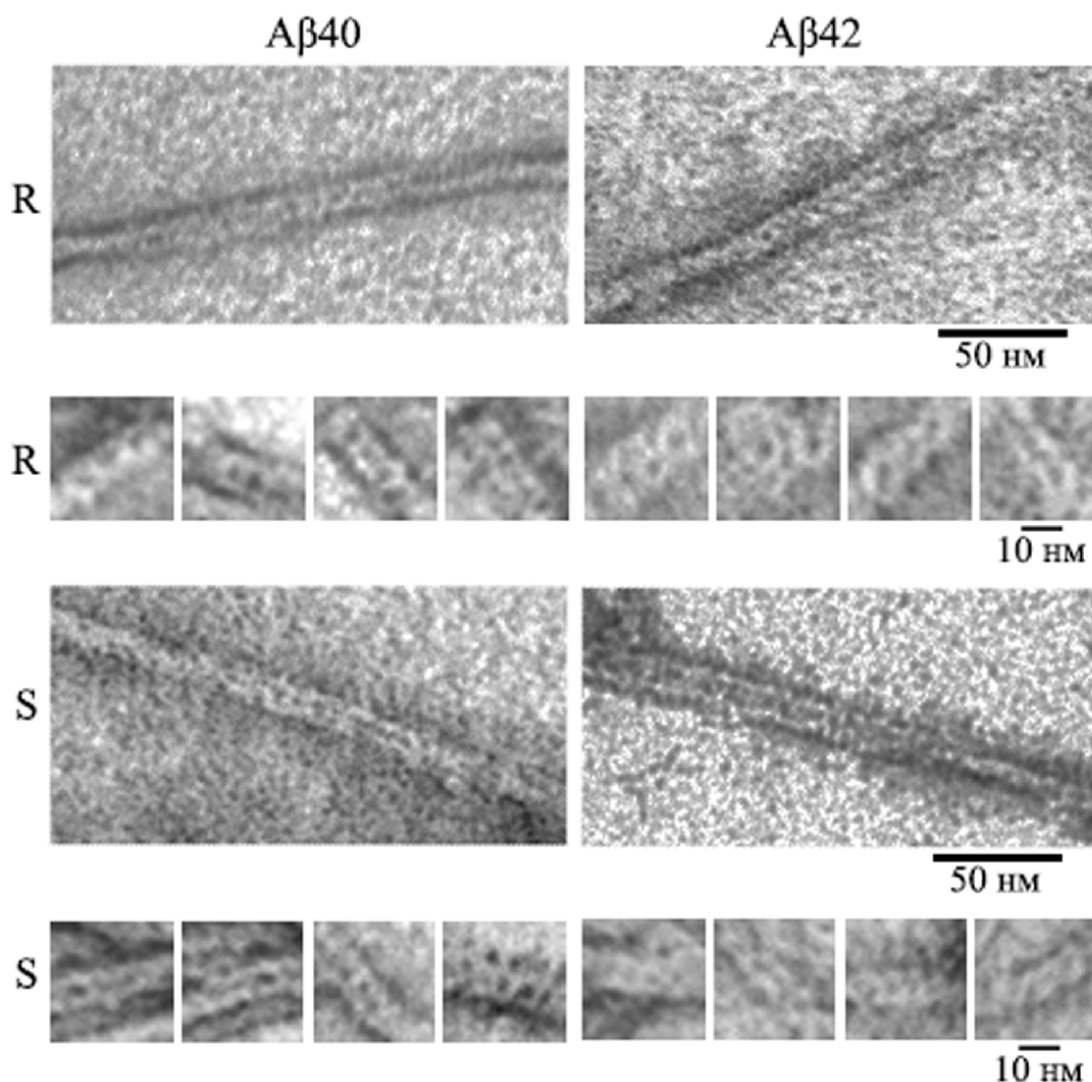


**Рисунок 3.** ЭМ изображения A $\beta$ (1-40) пептида: а - поле препарата, видна латеральная ассоциация фибрилл с формированием лент разной ширины; б - фрагмент одиночной фибриллы; в - фрагмент лент разной ширины.



**Рисунок 4.** ЭМ изображения A $\beta$ (1-42) пептида: а - поле препарата, видны фибриллы разного диаметра с шероховатой неровной поверхностью; б - фрагмент одиночной фибриллы; в - фрагмент шероховатой фибриллы и заметно ветвление фибрилл.

При анализе самых тонких фибрилл диаметром 8 нм создается впечатление, что они состоят из 2-х нитей (филаментов), которые могут перевиваться друг относительно друга с разным периодом. Однако при достаточном увеличении видно, что данные фибриллы (диаметром около 8 нм) построены из кольцевых олигомеров (рис. 5).



**Рисунок 5.** ЭМ изображения фрагментов одиночных фибрилл рекомбинантных и синтетических препаратов А $\beta$ (1-40) и А $\beta$ (1-42) пептидов (R и S, соответственно). Маленькие изображения представляют фрагменты фибрилл с большим увеличением.

При этом для А $\beta$ (1-40) пептида заметна довольно регулярная укладка олигомеров в самых тонких фибриллах (одиночных), а А $\beta$ (1-42) олигомеры ассоциируют хаотичным образом, так что уже одиночные фибриллы имеют шероховатую поверхность. Аналогичные олигомеры обычно наблюдаются в начальный период формирования фибрилл, что часто отмечено многими авторами, изучающими процесс амилоидобразования [3, 4, 16, 17]. Если рассмотреть представленные в ряде работ достаточно качественные ЭМ изображения зрелых фибрилл, то хорошо заметно, что фибриллы построены из кольцевых структур [4, 18], хотя авторы это не отмечают. Почему? Возможно, это происходит из-за устоявшегося представления, что фибриллы построены из ряда филаментов (от 2-х до 6-ти) [5]. Возникает вопрос, куда исчезают кольцевые олигомеры, отмечаемые на ЭМ изображениях в начальный период формирования фибрилл? По упрощённой схеме, процесс формирования фибрилл проходит по следующему пути:

дестабилизация мономеров, формирование из них олигомеров и, в конечном итоге, формирование зрелых фибрилл. Самым необъяснимым моментом в этой схеме является переход от олигомеров к зрелым фибриллам. Мы полагаем, что именно кольцевой олигомер является основным строительным блоком для формирования фибрилл. На рисунке 5 заметно, что кольцевые олигомеры в фибрилле взаимодействуют боковыми сторонами друг с другом либо кольцо-к-кольцу, либо слегка перекрывая друг друга своими торцевыми поверхностями (домино, лестница). Диаметр кольцевого олигомера около 8 нм, что соответствует диаметру одиночной фибриллы, а диаметр внутреннего отверстия кольца составляет около 2 нм. Приблизительная высота кольца (короткого полого цилиндра) оценивается по месту перегиба фибриллы и составляет около 3 нм. Представление о фибрилле, построенной из 2-х филаментов, можно объяснить тем, что при контрастировании препарата уранилацетатом контрастер покрывает не только всю фибриллу,

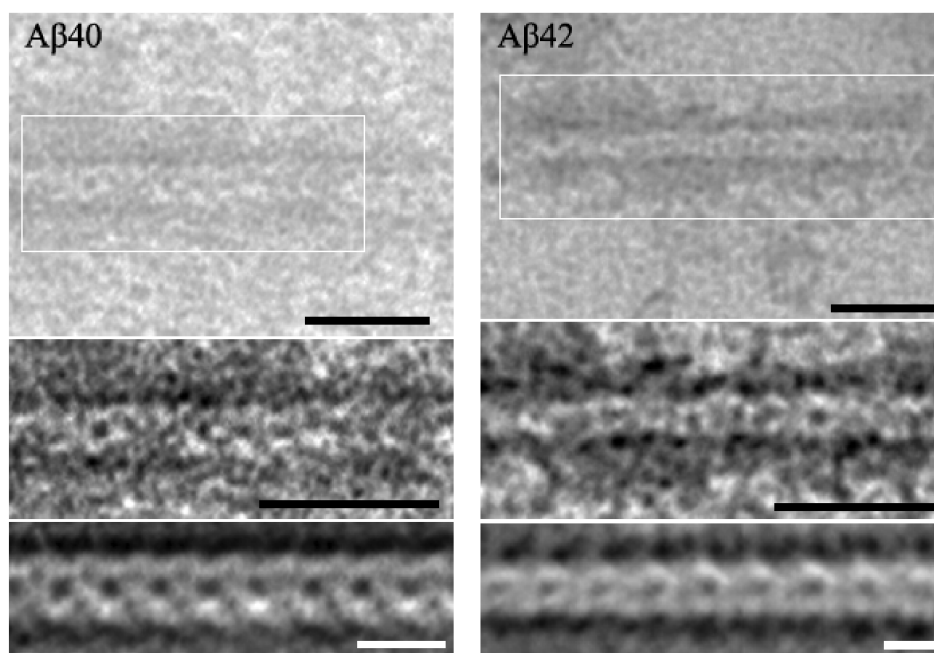
но и затекает во все её полости, что при небольшом увеличении создает видимый эффект построения фибриллы из 2-х филаментов. Тем не менее, в ряде работ встречается интерпретация построения фибрилл из округлых олигомеров. В работе Nielsen [3] при изучении процесса формирования фибрилл A $\beta$ (1-42) пептидом методом ЭМ было показано, что на ранних временах формирования наблюдаются округлые олигомерные частицы, которые при дальнейшей инкубации, ассоциируя друг с другом, формируют зрелые фибриллы. При изучении фибриллообразования  $\beta$ -синуклеина был предложен новый механизм формирования фибрилл, согласно которому фибрилла формируется посредством ассоциации образовавшихся олигомерных гранул, которые являются строительной единицей фибриллы (a double-concerted fibrillation model) [17]. Сборка фибрилл из олигомеров была продемонстрирована и для лизоцима [19]. И, наконец, в 2017 г. в работе Dean и соавт. при изучении интермедиатов по пути формирования фибрилл A $\beta$  пептидом делается вывод о том, что олигомерные частицы (додекамеры), взаимодействуя друг с другом, формируют зрелые фибриллы [20].

Для улучшения качества ЭМ изображений, способствующего большей доказательности формирования фибрилл из кольцевых олигомерных структур, нами был использован метод, вошедший в литературу как “метод вращения Маркхама” (Markham rotation techniques). Впервые он был предложен Markham с соавт. в 1963 г. [21] при ЭМ исследовании структуры негативно контрастированных вирусных частиц. Данный метод применим к объектам, обладающим осевой или линейной симметрией, с периодически

повторяющимися элементами структуры, слабо идентифицируемыми относительно фона. Улучшение изображения повторяющихся элементов структуры происходит в результате многократного наложения со сдвигом (вращением) полупрозрачной копии исходного изображения, в результате чего происходит усреднение изображения отдельного элемента со снижением фонового “шума”. Идея усреднения широко используется в настоящее время и в современном программном обеспечении для улучшения изображений для 3D реконструкций макромолекул и их комплексов на основе данных крио-ЭМ и ЭМ изображений негативно контрастированных объектов [22].

На рисунке 6 чётко проявляется периодичность перекрывающихся кольцевых структур, что подтверждает правильность нашего предположения о роли кольцевых олигомеров в качестве основных строительных блоков при формировании амилоидных структур. Согласно данным по улучшению изображения A $\beta$  пептидов средний диаметр кольцевого олигомера около 6-8 нм, а диаметр полости внутри кольца около 2 нм. Согласно данным, представленным на рисунке 5, диаметр кольцевого олигомера A $\beta$  составляет около 6-8 нм, а диаметр полости внутри кольца – около 2 нм.

Нам представляется, что присущий всем амилоидным фибриллам полиморфизм можно объяснить проще, если взять за основу построения фибриллы кольцевой олигомер. В зависимости от а.п. белка/пептида и условий формирования фибрилл можно легче представить формирование одиночных фибрилл, их ассоциацию в ленты, пучки, жгуты разного диаметра и перекрученности, ветвление фибрилл и их шероховатую поверхность.



**Рисунок 6.** ЭМ изображения фрагментов фибрилл A $\beta$ (1-40) и A $\beta$ (1-42) пептидов. Исходное изображение фрагмента одиночной фибриллы (сверху), увеличенная выделенная область фрагмента фибриллы с усиленным контрастом (середина), результат применения метода Маркхама для улучшения выявления морфологических особенностей амилоидных фибрилл (низ). Чёрные метки соответствуют 25 нм, белые - 10 нм.

## 2. РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ А $\beta$ ПЕПТИДА

Наиболее распространённым представлением о структурной организации амилоидных фибрилл в настоящее время является положение о том, что фибриллы состоят из филаментов [5]. Филаменты, в свою очередь, сформированы из пептидов, которые образуют  $\beta$ -листы, проходящие параллельно вдоль всей оси фибриллы на расстоянии около 10 Å друг от друга. Сами  $\beta$ -листы состоят из участков, уложенных в виде  $\beta$ -тяжей расположенных перпендикулярно оси фибриллы/филамента на расстоянии около 4,7 Å друг от друга [5]. Такая интерпретация устройства фибрилл исходит из данных рентгеноструктурного анализа препаратов амилоидных фибрилл и называется кросс- $\beta$  структурой. Эта модель структурной организации амилоидных фибрилл сложилась в 2000-е годы и по настоящее время продолжает уточняться. Основное влияние на предложенную модель организации амилоидных фибрилл из  $\beta$ -листов оказали работы (начиная с 1935 г.) по рентгеноструктурному анализу ряда фибриллярных белков (фиброин,  $\beta$ -кератин,  $\beta$ -миозин, фибрин), а также фибрилл из глобулярного денатурированного белка альбумина, в результате были получены сходные картины дифракции рентгеновских лучей [23]. Сам термин кросс- $\beta$  структура появился в 1968 г. [24], когда были проведены интенсивные исследования амилоидных образований из тканей печени, почек, селезёнки человека и экспериментальных животных. С помощью рентгеноструктурного анализа хорошо ориентированных образцов были получены характерные рефлексы: меридиональный 4,75 Å и экваториальный 9,8 Å, расположенные перпендикулярно друг другу (кросс-расположение). Такая интерпретация строения амилоидных фибрилл повлияла на интерпретацию данных ЭМ анализа. Несмотря на то, что на ЭМ изображениях срезов тканей в работах 1960-х годов заметны кольцевые олигомеры, диаметр которых совпадал с диаметром одиночной фибриллы, часто их интерпретировали как поперечные срезы фибрилл и делался вывод, что фибриллы построены из ряда филаментов. Даже тогда, когда стали исследовать изолированные препараты поврежденных амилоидозами тканей и ряд авторов интерпретировал ЭМ данные с точки зрения построения фибрилл из кольцевых структур в виде бублика [16], по-прежнему преобладала интерпретация филаментной организации фибрилл.

На картинах дифракции препаратов амилоидных фибрилл часто кроме основных рефлексов, которые относят к кросс- $\beta$  структуре, присутствует большое количество других рефлексов. Точной интерпретации для всех рефлексов при рентгеноструктурном анализе препаратов амилоидов пока не существует. Отмечается, однако, что на картину дифракции может влиять способ ориентации амилоидных фибрилл, концентрация препарата, чистота, источник и способ его получения. Есть данные, что хорошо ориентированный препарат имеет более сложную картину четких рефлексов и дает больше информации о структуре [25]. В литературе встречаются

разные объяснения наличия дополнительных рефлексов для амилоидных структур. При этом уделяется отдельное внимание как меридиональным, так и экваториальным рефлексам [26–28]. Для точной интерпретации рентгеноструктурных данных требуется не только качество получаемых картин дифракции, но и модель структуры фибриллы на молекулярном уровне.

Все препараты А $\beta$  пептидов были исследованы с помощью рентгеноструктурного анализа. Полученные картины дифракции рентгеновских лучей имеют в той или иной степени выраженные рефлексы, характерные для кросс- $\beta$  структуры, что свидетельствует об амилоидной природе фибрилл. Следует обратить внимание на то, что на рентгенограммах кроме основных, характерных для амилоидов рефлексов (в районе 4,7 Å –  $\beta$ -тяжи, и 11 Å –  $\beta$ -листы), наблюдается ряд дополнительных рефлексов. В 1990-е годы при анализе дифракционных картин также обращали внимание на дополнительные рефлексы. Так, в работе Kirshner [27] при анализе рентгеновских данных на малых углах для А $\beta$ (1–40) пептида обратили внимание на рефлекс 54 Å и интерпретировали его таким образом, что либо этот рефлекс отображает повтор объекта вдоль оси фибриллы, либо повтор при закрутке спирали (периодичность). Из-за сложности интерпретации рентгеновских данных, которые могут быть связаны, в том числе и с неверным представлением о структурной организации фибрилл (бесконечный  $\beta$ -лист вдоль всей оси фибриллы), в дальнейших работах по рентгеноструктурному анализу амилоидных фибрилл практически не обсуждается большинство рефлексов. Однако рефлекс 53 Å может свидетельствовать о повторе некоторых олигомерных частиц вдоль оси фибриллы. Следует упомянуть, что наш опыт работы с различными условиями подготовки препаратов (ионные условия) показал, что следует обращать внимание на раствор, в котором они готовятся. Так, мы установили, что, например, Tris-HCl, даёт сам по себе множество рефлексов, часть из которых совпадает с рефлексами для амилоидных структур.

Анализ литературных данных позволил нам найти очень важные рентгеноструктурные данные, которые были получены как для фрагментов А $\beta$  пептида, так и для самого А $\beta$ (1–40). Так, авторами были получены рефлексы, которые не могут быть объяснены той моделью, которая сложилась на сегодняшний день – наличие “бесконечных” бета-листов, образующихся вдоль оси амилоидной фибриллы. Это экваториальный рефлекс 49,2 Å, который соответствует расстоянию в 55–57 Å, которое меньше, чем ширина фибриллы (80–90 Å), что не может быть объяснено латеральным взаимодействием нескольких фибрилл. Был получен ещё один меридиональный рефлекс в 53 Å, который также не может быть объяснён существующими моделями. Сами авторы работы предположили, что это может иметь место в трёх случаях: а) если имеется периодическое размещение объекта вдоль оси фибриллы; б) ступенчатое расположение фибрилл;



с) закрутка фибрилл [27]. К сожалению, прибор, который мы использовали для измерения рентгеноструктурной дифракции, не даёт рефлексов на малых углах (то есть, не даёт больших расстояний).

### 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ УЧАСТКОВ, ВХОДЯЩИХ В ОСТОВ АМИЛОИДНОЙ ФИБРИЛЛЫ ДЛЯ A $\beta$ ПЕПТИДА

Полученные фибриллы из препаратов A $\beta$ (1-40) и A $\beta$ (1-42) исследовали методом ограниченного протеолиза в сочетании с tandemной масс-спектрометрией. Для протеолиза участков, не входящих в остов амилоидной фибриллы, были подобраны концентрации смеси протеаз (трипсин, химотрипсин и протеиназа К). Затем оставшиеся нерасщепленными пептиды, входящие в остов фибриллы, были идентифицированы методом tandemной масс-спектрометрии. Для идентификации и количественной оценки вклада каждого пептида использовалась программа PEAKS Studio 7.5 (Bioinformatics Solutions Inc.) В результате исследования было показано, что для A $\beta$ (1-40) защищёнными от действия протеаз являются в основном С-концевые участки [29], а для A $\beta$ (1-42) встречаются как С-концевые, так и более длинные фрагменты (рис. 7) [15].

А

DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGK IIGLMVGGVV



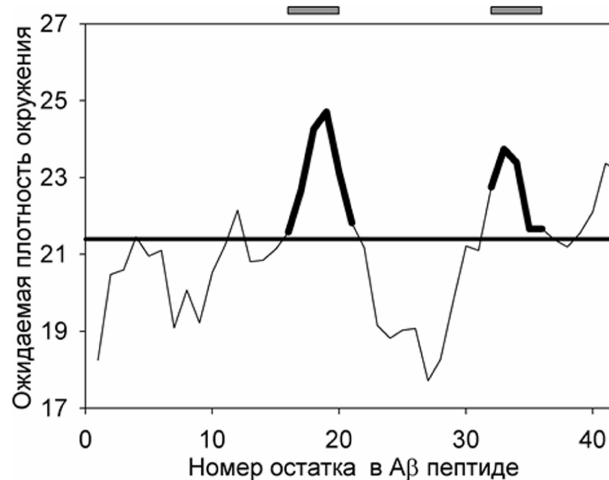
Б

DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGK IIGLMVGGVV IA



**Рисунок 7.** А. Фрагменты, накапливающиеся в наибольших количествах после ограниченного протеолиза A $\beta$ (1-40) пептида. Б. Фрагменты, накапливающиеся в наибольших количествах после ограниченного протеолиза A $\beta$ (1-42) пептида.

Полученные данные согласуются с результатами проведённого ранее теоретического предсказания амилоидогенных участков A $\beta$ (1-42) пептида, полученными при помощи программы FoldAmyloid [30]: участки 16–21 и 32–36 а.о. (рис. 8). Показано, что участки пептида A $\beta$ (1-40) с 16 по 22 и с 28 по 40-й а.о. устойчивы к воздействию протеаз, то есть входят в остов амилоидной фибриллы. Полученные нами результаты хорошо коррелируют с результатами теоретического предсказания. В случае A $\beta$ (1-42) пептида часть фрагментов, накопленных после протеолиза, соответствует амилоидогенным по предсказанию участкам последовательности, а частью являются более длинными и покрывают всю последовательность. Этому есть объяснение.



**Рисунок 8.** Профиль расчёта амилоидогенных участков для A $\beta$ (1-42) пептида программой FoldAmyloid (<http://bioinfo.protres.ru/fold-amyloid/>).

По данным ЭМ, амилоидные фибриллы, полученные для A $\beta$ (1-42), являются наиболее толстыми по ширине, которая варьирует от 8 нм до 35 нм. Из предложенной нами модели образования амилоидной фибриллы, которая образована за счёт стыковки олигомерных структур, амилоидные фибриллы для A $\beta$ (1-42) получают нерегулярным налипанием олигомерных структур (шероховатость поверхности), в отличие от фибрилл, образованных A $\beta$ (1-40), которые формируются посредством регулярной ассоциации кольцевых олигомеров. Налипание олигомеров приводит к утолщению амилоидной структуры, и, как следствие, к защите от действия протеаз.

### 4. РАЗМЕР ЯДЕР ПЕРВИЧНОЙ И ВТОРИЧНОЙ НУКЛЕАЦИИ ДЛЯ ОБРАЗОВАНИЯ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ A $\beta$ ПЕПТИДА

Из литературы и из наших данных следует, что механизм роста амилоидов, образованных A $\beta$ (1-40) и A $\beta$ (1-42) пептидами, является экспоненциальным (то есть рост фибрилл идёт много быстрее, чем можно было бы ожидать от простой нуклеационно-зависимой модели). Было выяснено, что причиной ускоренного роста амилоидов является процесс ветвления. Рост амилоидов также происходит по сценарию ветвления. Для расчёта размера ядер первичной и вторичной нуклеации были использованы литературные данные. В основном, это данные, полученные группой учёных, работающих под руководством Kelly [31] и Dobson [32, 33]. Согласно нашей теории, для того, чтобы определить размер зародыша для амилоидной фибриллы, необходимо иметь данные кинетических экспериментов по амилоидообразованию, где единственным изменяемым параметром является концентрация мономеров. После получения экспериментальных данных проводится их аппроксимация гладкой S-образной кривой и дальнейшие расчёты ведутся на её основе. Для каждой кривой, полученной в ходе эксперимента, рассчитываются характерные

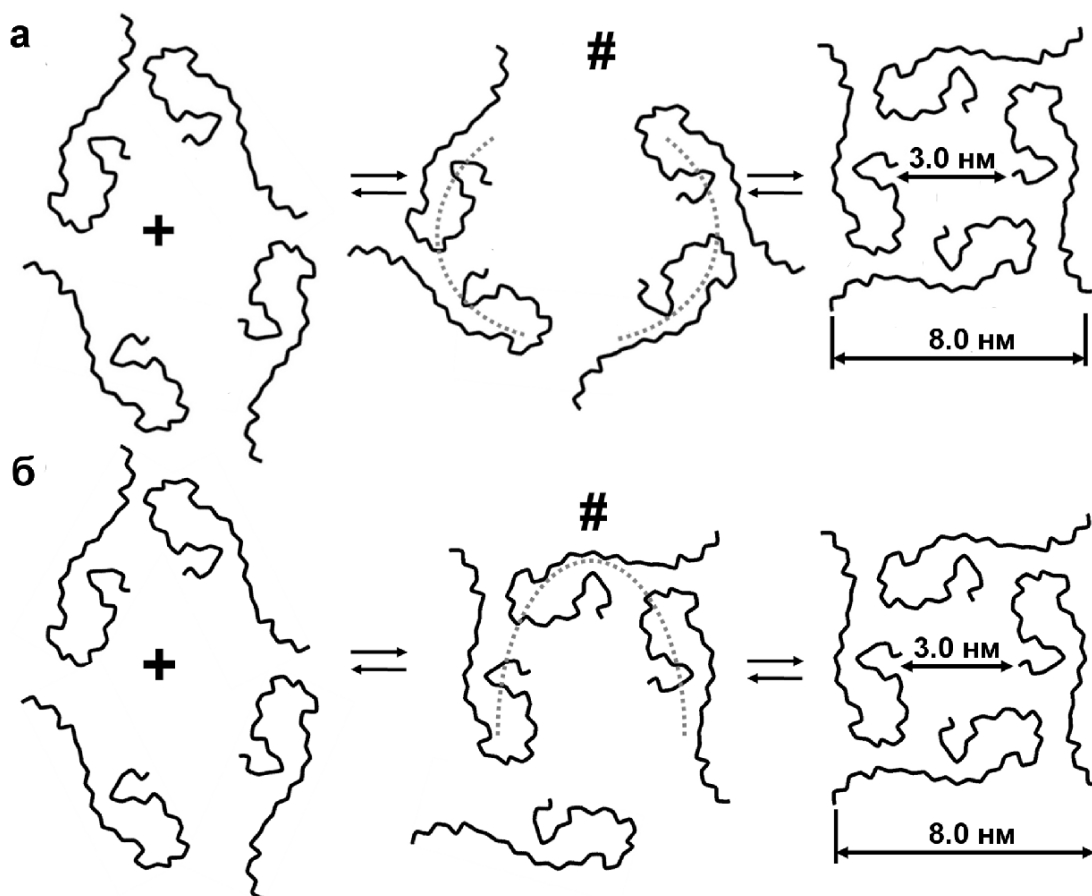


времена  $T_{lag}$  (время лаг-периода),  $T_2$  (время перехода всех мономеров в агрегат) и  $L_{rel}$  (относительный лаг-период), который определяется как отношение  $T_{lag}/T_2$ . Согласно данным [34], если величина  $L_{rel}$  не зависит от концентрации (в пределах ошибки) и её значение не превышает  $\sim 0,2$ , то в таком случае имеется линейный механизм роста. На основании литературных данных был проведён расчёт размера ядер первичной и вторичной нуклеации для амилоидных фибрилл А $\beta$ (1-40) и А $\beta$ (1-42). Оказалось, что для А $\beta$ (1-42) этот размер соответственно равен 3 и 2 мономерам. В то время как для А $\beta$ (1-40), этот размер соответственно равен 2 и 1 мономеру (рис. 9). Из полученных данных видно, что образование пептидом амилоидов идёт по сложной схеме, включающей в себя экспоненциальный рост с образованием вторичных ядер нуклеации на сформировавшихся фибриллах с последующим ветвлением, причём, это справедливо как для А $\beta$ (1-40), так и для А $\beta$ (1-42). Примечательно, что согласно полученным данным, размер ядра будущего амилоида для А $\beta$ (1-42) больше, чем для А $\beta$ (1-40), хотя сам механизм амилоидообразования должен быть схож. Из наших кинетических данных получается, что размер ядра вторичной нуклеации для А $\beta$ (1-40) пептида составил  $-0,42 \pm 0,28$ , а размер ядра первичной нуклеации для А $\beta$ (1-40) пептида составил  $0,72 \pm 0,61$  мономера [13]. Этот результат демонстрирует нам,

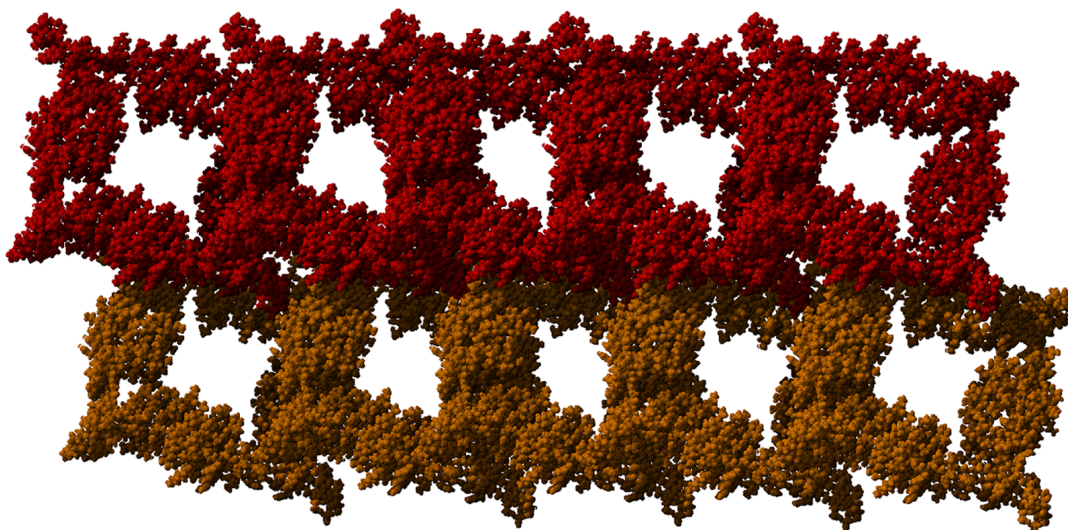
что в случае, если кинетика начинается не с мономерного состояния, то ядром нуклеации выступает уже олигомерная частица. Детали механизма формирования фибрилл оказались довольно необычными в выбранных нами экспериментальных условиях. Оказалось, что мономером фибриллы служит не одиночный пептид, а олигомер, состоящий из нескольких пептидов, уложенных в виде кольца. К тому же морфология фибрилл, по-видимому, представляет собой стопки колец, "склеенных" пересекающимися частями – феномен, ранее не описанный в литературе.

## 5. МОЛЕКУЛЯРНАЯ МОДЕЛЬ АМИЛОИДНОЙ ФИБРИЛЛЫ ДЛЯ А $\beta$ ПЕПТИДА

На основании ЭМ, масс-спектрометрических, теоретических и рентгеноструктурных данных мы предложили молекулярную структуру олигомера, являющегося основным строительным блоком амилоидных фибрилл для А $\beta$ (1-40) и А $\beta$ (1-42) пептидов (рис. 10). Для моделирования была взята структура, полученная методом твёрдофазного ЯМР в лаборатории Туско [35]. В основе этой модели лежит треугольная структура. В наших исследованиях мы не наблюдали такую треугольно-подобную форму амилоидных фибрилл, больше это напоминало квадрато-подобную или кольцевую. Нами была разработана теория для расчёта ядер сворачивания



**Рисунок 9.** Демонстрация образования олигомерных структур через образование ядер сворачивания (#) для (а) А $\beta$ (1-40) и (б) А $\beta$ (1-42).



**Рисунок 10.** Трёхмерная модель амилоидной фибриллы для A $\beta$ (1-40) и A $\beta$ (1-42), построенная с помощью программы YASARA. Для построения была использована структура 2m4j из банка белковых структур (PDB).

на основе экспериментальных данных по кинетике изменения включения мономеров в амилоидную фибриллу, например, на основе данных по изменению интенсивности тиюфлавиновой флуоресценции (см. выше). Для расчёта ядер сворачивания в амилоидную фибриллу мы использовали данные, полученные в лаборатории Dobson [32, 33]. Ядро первичной нуклеации для фибриллы A $\beta$ (1-42) равно 3 мономерам, в то время как для фибрилл A $\beta$ (1-40) размер первичного ядра нуклеации равен 2 мономерам. На основании рассчитанных ядер сворачивания для амилоидных фибрилл и экспериментальных данных, нами были предложены соответствующие структуры олигомерных частиц – додекамеров, состоящих из трёх слоёв тетрамеров. Такой додекамер соответствует по массе 56 кДа. Интересно, что в такой структуре присутствуют два солевых мостика: Arg5-Glu22 образуется между структурами, и Asp23-Lys28 внутри одной структуры. Размер данного олигомера соответствует всем параметрам, наблюдаемым в электронной микроскопии, и рентгеноструктурным данным. Используя такую модель, можно объяснить меридиональный рефлекс в 53 Å и экваториальный рефлекс в 55 Å.

Средняя высота кольца около 3-4 нм. Само кольцо составлено из 12 мономерных частиц, а высота кольца (вид сбоку, глубина цилиндра) указывает, что она образована из 3-4 слоев мономерных частиц. В итоге кольцо содержит до 12 мономеров пептида. Таким образом, такое количество  $\beta$ -структуры вполне достаточно, чтобы на дифракционных картинах присутствовали рефлексы, характерные для кросс- $\beta$  структуры.

Принимая во внимание такой молекулярный механизм образования амилоидных фибрилл A $\beta$ (1-40) и A $\beta$ (1-42) пептидами легко объяснить следующие процессы: 1) сильный полиморфизм зрелых фибрилл; 2) взаимодействие антител с фибриллами и олигомерами; 3) расхождение экспериментальных данных, полученных с помощью дейтеро-водородного обмена и твёрдофазного ЯМР; 4) незначительная

интенсивность флуоресценции для тиюфлавина Т; 5) фрагментация, сборка и разборка фибрилл; 6) додекамер является последним олигомером, наблюдаемым в масс-спектрометрических экспериментах с приставкой для измерения мобильности ионов; 7) наличие воды в полости кольцевых олигомеров.

## 6. ПРЕДЛАГАЕМЫЕ СТРУКТУРНЫЕ МОДЕЛИ ДЛЯ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ A $\beta$ ПЕПТИДА

На сегодняшний момент предложено много моделей структурной организации амилоидных фибрилл, образованных A $\beta$  пептидом. В основном, все они были построены на данных ЯМР твёрдого тела и редко на данных крио-ЭМ (см. таблицу). Следует отметить, что метод ЯМР твёрдого тела не является прямым, а основан на полученных экспериментальным путём расстояниях при использовании специальных программ: производится математическая обработка данных и выводится структура, которая удовлетворяла бы всем полученным параметрам. Чем больше таких параметров будет рассмотрено, тем менее вырожденная структура должна получиться. Так как амилоидные фибриллы невозможно кристаллизовать, то их структуру можно как раз получить с помощью данного метода. Существует, однако, серьёзная проблема в структурных исследованиях амилоидных фибрилл, которая заключается в получении однородных препаратов. Поскольку амилоидные фибриллы сильно полиморфны и их молекулярная структура существенно зависит от условий формирования фибрилл, то получение структурно-однородных популяций фибрилл в достаточных для метода количествах является препятствием для однозначной интерпретации полученных результатов. Этим можно объяснить большое количество существующих моделей структурной организации A $\beta$  пептидов, что отражено в таблице.

## МЕХАНИЗМ АМИЛОИДООБРАЗОВАНИЯ A $\beta$ ПЕПТИДОМ

Таблица. Модельные структуры организации мономерного A $\beta$  пептида в фибриллах, представленных в банке белковых структур

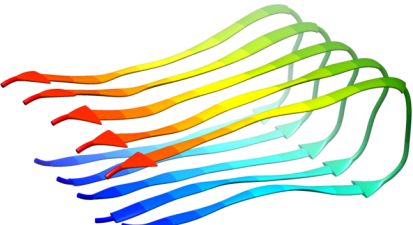
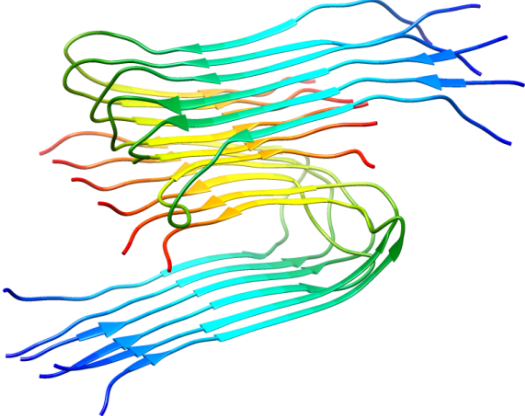
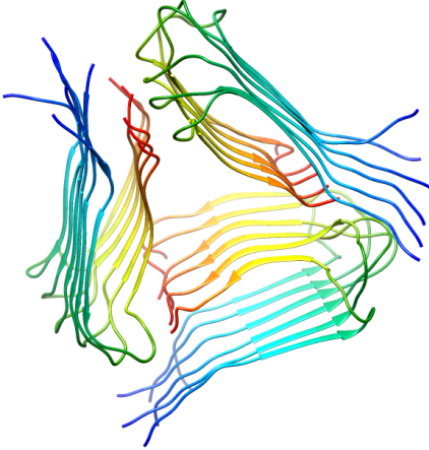
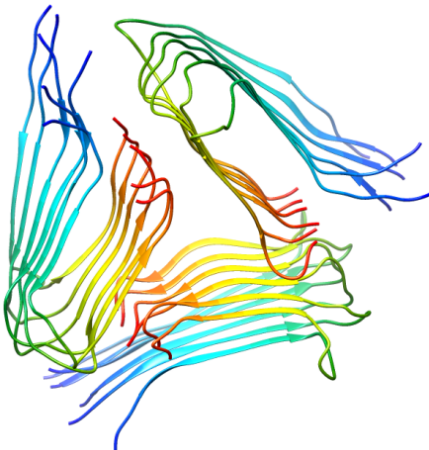
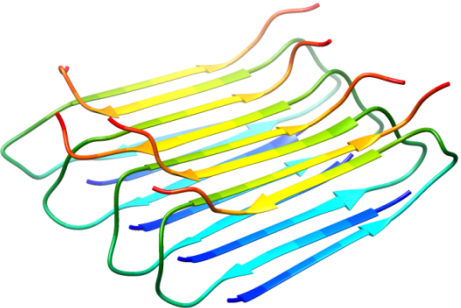
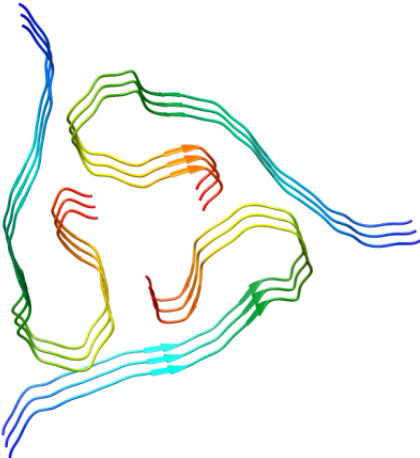
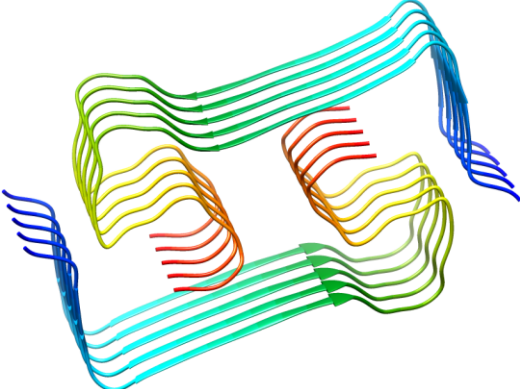
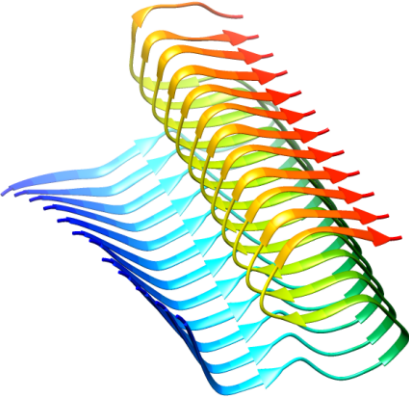
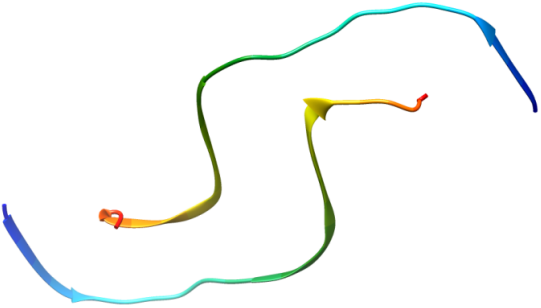
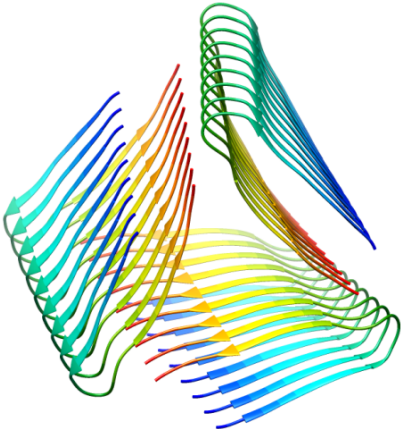
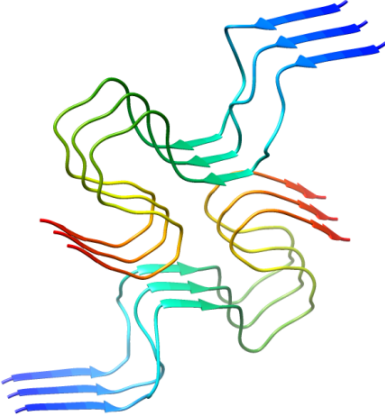
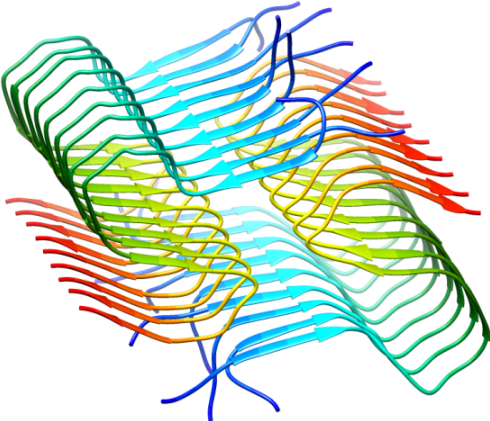
PDB, диапазон представленной структуры в банке белковых структур	Ссылка, метод, диапазон исследуемой структуры	Пространственная структура (1 модель)
2beg, WT, 17-42	[42], ЯМР твёрдого состояния, 1-42	
2lmn, WT, 9-40	[43], ЯМР твёрдого состояния, 1-40	
2lmp, WT, 9-40	[44], ЯМР твёрдого состояния, 1-40	
2lmq, WT, 9-40	[44], ЯМР твёрдого состояния, 1-40	

Таблица. Модельные структуры организации мономерного Аβ пептида в фибриллах, представленных в банке белковых структур (продолжение)

PDB, диапазон представленной структуры в банке белковых структур	Ссылка, метод, диапазон исследуемой структуры	Пространственная структура (1 модель)
2lnq, Iowa мутант: D23N, 15-40	[45], ЯМР твёрдого состояния, 1-40	
2m4j, WT, 1-40	[35], ЯМР твёрдого состояния, 1-40	
2mvx, Osaka мутант: делеция остатка E22, 1-40	[46], ЯМР твёрдого состояния, 1-40	
2mxu, WT, 11-42	[39], ЯМР твёрдого состояния, 1-42	

## МЕХАНИЗМ АМИЛОИДООБРАЗОВАНИЯ А $\beta$ ПЕПТИДОМ

Таблица. Модельные структуры организации мономерного А $\beta$  пептида в фибриллах, представленных в банке белковых структур (продолжение)

PDB, диапазон представленной структуры в банке белковых структур	Ссылка, метод, диапазон исследуемой структуры	Пространственная структура (1 модель)
5aef, WT, 17-42	[47], Крио-ЭМ, 1-42	
2mpz, D23N Iowa мутант, 15-40	[48], ЯМР твёрдого состояния, 1-40	
2nao, WT, 1-42	[36], ЯМР твёрдого состояния, 1-42	
5kk3, WT, 11-42	[37], ЯМР твёрдого состояния, 1-42	



В 2016 году две независимые группы учёных [36, 37] на основе данных ЯМР твёрдого тела предложили молекулярную структуру для фибрилл, образованных A $\beta$ (1-42). Несмотря на различия в условиях подготовки образцов, структуры фибрилл A $\beta$ (1-42), определенные двумя группами, почти идентичны. Как считают авторы этих работ, данная структура A $\beta$ (1-42) термодинамически стабильна и эффективно формируется при соблюдении ряда условий. На наш взгляд, причина одинаковой структуры – это использование одной и той же программы для получения молекулярной структуры на основе полученных расстояний в измерениях ЯМР. Обе группы предлагают модель, в которой молекулы A $\beta$ (1-42) принимают примерно S-образную конформацию, состоящую из коротких сегментов  $\beta$ -участков, которые связаны между собой петлями. Молекулы складываются непосредственно друг над другом вдоль направления, в котором растут фибриллы, образуя в регистре тяжи параллельных кросс- $\beta$  структур. Подобно структуре A $\beta$ (1-42) пептида, этим же методом была определена структура фибрилл A $\beta$ (1-40) пептида. Но согласно полученным данным, многие детали молекулярной конформации и взаимодействий внутри и между молекулами в фибриллах A $\beta$ (1-40) и A $\beta$ (1-42) сильно различаются (таблица). Авторы работ считают, что эти структурные различия обусловлены остатками 41 и 42, и это делает невозможным образование стабильных фибрилл для A $\beta$ (1-40) пептидов.

Основное различие между предложенными моделями состоит в том, что C-концевой участок пептида находится на поверхности в фибриллах A $\beta$ (1-42) пептида, а в фибриллах A $\beta$ (1-40) пептида этот участок спрятан внутри фибриллы. Как считают авторы работ, такое различие в структуре может приводить к отличающимся свойствам амилоидных фибрилл: различиям во взаимодействиях с мембранами нейронов, мембранно-связанными рецепторными белками, различным способностям стимулировать воспаление и различным свойствам при распознавании антител. Однако эти данные не согласуются с нашими данными по доступности участков фибрилл для действия трёх протеаз. По данным масс-спектрометрического анализа, для обоих пептидов C-концевой участок спрятан и недоступен для связывания с протеазами. Предложенные разные модели структурной организации фибрилл A $\beta$  пептидов не согласуются и с работой, опубликованной в 2017 году [38], где было показано, что зародыши A $\beta$ (1-42) пептида могут ускорять рост фибрилл A $\beta$ (1-40) пептида и наоборот, что может свидетельствовать о схожести основного структурного блока (олигомера) для обоих изоформ A $\beta$  пептида, а не различаться, как это предполагалось ранее [39–41].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на большое количество противоречивых теоретических и экспериментальных данных по механизму формирования амилоидных структур,

тем не менее, должны существовать общие ключевые моменты процесса их формирования, которые свойственны всем белкам и пептидам. Внимательное изучение морфологии олигомерных частиц и фибрилл исследуемых препаратов пептидов и теоретические данные по возможному механизму формирования фибрилл позволили нам предположить один из возможных механизмов полимеризации белков/пептидов в фибриллярные образования. Согласно данным ЭМ, в начальный период формирования фибрилл наблюдаются олигомерные частицы, имеющие кольцевую структуру. Многие работы по изучению механизма формирования амилоидных фибрилл содержат схемы их формирования, на которых неизменно присутствуют олигомеры разной морфологии, и, тем не менее, очень редко олигомеры рассматриваются как элементы структуры фибрилл. В упрощённой схеме формирования амилоидных фибрилл – дестабилизированный мономер, олигомер, фибрилла – самым загадочным и необъяснимым моментом является переход от олигомеров к зрелым фибриллам. Детальный анализ ЭМ изображений зрелых фибрилл A $\beta$ (1-40) и A $\beta$ (1-42) пептидов дал нам основание предположить один из возможных механизмов амилоидообразования. Дестабилизированные мономеры формируют кольцевые олигомеры, которые можно назвать протофибриллами или основными строительными блоками будущих фибрилл. Кольцевые олигомеры имеют наружный диаметр, сходный с диаметром одиночных фибрилл. При взаимодействии готовых строительных блоков (олигомеров) формируются фибриллы. Кольцевые олигомеры в фибриллах взаимодействуют друг с другом боковыми сторонами, либо, чаще, слегка накладываются друг на друга торцевыми поверхностями, напоминая домино или “лестницу”. При адсорбции на формваровую подложку фибриллы могут перегибаться и адсорбироваться на ней боковыми поверхностями. Это даёт возможность в местах перегиба оценить высоту кольцевого олигомера и получить все его параметры. Средний размер олигомеров несколько варьирует для каждого исследуемого белка/пептида, но в среднем мы получаем наружный диаметр кольца около 6-8 нм, внутренний около 2-3 нм (дырка в кольце), и высоту кольцевого олигомера (измеряется в месте перегиба фибриллы) около 3-4 нм.

Собственные данные по рентгеноструктурному анализу препаратов A $\beta$  пептидов и анализ литературных данных заставили нас более детально проанализировать возможность построения амилоидных фибрилл из  $\beta$ -листов, проходящих вдоль всей оси фибриллы. Использование теоретических подходов (молекулярное моделирование) позволило предложить механизм формирования и молекулярную структуру кольцевого олигомера. На основании всей совокупности данных, в том числе данных по протеолитической обработке фибрилл с последующим масс-спектрометрическим анализом, мы предлагаем новый механизм формирования амилоидных фибрилл, в основе которого лежит



предположение, что основным строительным элементом фибриллы является кольцевой олигомер. При этом структурная (молекулярная) организация (количество молекул, их укладка, параметры) кольцевых олигомеров различных белков/пептидов может различаться. Формирование амилоидных фибрилл из кольцевых олигомеров позволяет легче объяснить полиморфизм фибрилл, дробление, ветвление, неровность поверхности.

Правильное представление о структурной организации амилоидных фибрилл является необходимым условием для выработки стратегических подходов при разработке способов борьбы с амилоидогенными заболеваниями. Предложенный нами механизм формирования фибрилл из кольцевых олигомеров предполагает, что необходим поиск способов предотвращения формирования не фибрилл, а олигомерных образований, то есть, поиск причин, приводящих к дестабилизации молекул амилоидогенных белков/пептидов. В связи с этим важны исследования метаболизма Аβ пептида и поиск его природных партнеров, влияющих на его стабильность, а также поиск условий и лигандов, приводящих к его дестабилизации.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Данный обзор написан по работам, выполненным в рамках уже закончившегося гранта РНФ 14-14-00536. Авторы благодарны Н.В. Довидченко, С.А. Гарбузинскому и А.В. Глякиной за помощь в оформлении статьи и рисунков.

## ЛИТЕРАТУРА

- Glenner G.G., Terry W., Harada M., Isersky C., Page D. (1971) *Science*, **172**(3988), 1150-1151.
- Finder V.H., Glockshuber R. (2007) *Neurodegener. Dis.*, **4**(1), 13-27.
- Nielsen E.H., Nybo M., Svehaug S.E. (1999) *Methods Enzymol.*, **309**, 491-496.
- Lashuel H.A., Hartley D.M., Petre B.M., Wall J.S., Simon M.N., Walz T. et al. (2003) *J. Mol. Biol.*, **332**(4), 795-808.
- Dobson C.M. (2004) *Semin. Cell Dev. Biol.*, **15**(1), 3-16.
- Quist A., Doudevski I., Lin H., Azimova R., Ng D., Frangione B. et al. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**(30), 10427-10432.
- Мальцев А.В., Галзитская О. (2010) *Биомед. химия*, **56**, 624-638. DOI: 10.18097/pbmc20105606624
- Maltsev A.V., Bystryak S., Galzitskaya O.V. (2011) *Ageing Res. Rev.*, **10**(4), 440-452.
- Petkova A.T., Leapman R.D., Guo Z., Yau W.-M., Mattson M.P., Tycko R. (2005) *Science*, **307**(5707), 262-265.
- Petkova A.T., Ishii Y., Balbach J.J., Antzutkin O.N., Leapman R.D., Delaglio F. et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**(26), 16742-16747.
- Suvorina M.Y., Selivanova O.M., Grigorashvili E.I., Nikulin A.D., Marchenkov V.V., Surin A.K. et al. (2015) *J. Alzheimers Dis.*, **47**(3), 583-593.
- Dovidchenko N.V., Glyakina A.V., Selivanova O.M., Grigorashvili E.I., Suvorina M.Y., Dzhus U.F. et al. (2016) *J. Struct. Biol.*, **194**(3), 404-414.
- Григорашвили Е.И., Селиванова О.М., Довидченко Н.В., Джус У.Ф., Михайлина А.О., Суворина М.Ю., Марченков В.В., Сурин А.К., Галзитская О.В. (2016) *Биохимия*, **81**, 710-720.
- Selivanova O.M., Grigorashvili E.I., Suvorina M.Y., Dzhus U.F., Nikulin A.D., Marchenkov V.V. et al. (2016) *Data Brief*, **8**, 108-113.
- Selivanova O.M., Surin A.K., Marchenkov V.V., Dzhus U.F., Grigorashvili E.I., Suvorina M.Y. et al. (2016) *J. Alzheimers Dis.*, **54**(2), 821-830.
- Benditt E.P., Eriksen N. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **55**(2), 308-316.
- Bhak G., Lee J.-H., Hahn J.-S., Paik S.R. (2009) *PloS One*, **4**(1), e4177. DOI:10.1371/journal.pone.0004177.
- Paravastu A.K., Qahwash I., Leapman R.D., Meredith S.C., Tycko R. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**(18), 7443-7448.
- Hill S.E., Robinson J., Matthews G., Muschol M. (2009) *Biophys. J.*, **96**(9), 3781-3790.
- Dean D.N., Das P.K., Rana P., Burg F., Levites Y., Morgan S.E. et al. (2017) *Sci. Rep.*, **7**, 40787. DOI:10.1038/srep40787.
- Markham R., Frey S., Hills G.J. (1963) *Virology*, **20**(1), 88-102.
- Ryazantsev S., Tischenko V., Nguyen C., Abramov V., Zav'yalov V. (2013) *PLoS One*, **8**(6), e64076. DOI:10.1371/journal.pone.0064076.
- Astbury W.T., Dickinson S., Bailey K. (1935) *Biochem. J.*, **29**(10), 2351-2360.
- Eanes E.D., Glenner G.G. (1968) *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.*, **16**(11), 673-677.
- Makin O.S., Serpell L.C. (2005) *Methods Mol. Biol. Clifton N.J.*, **299**, 67-80.
- Sunde M., Serpell L.C., Bartlam M., Fraser P.E., Pepys M.B., Blake C.C. (1997) *J. Mol. Biol.*, **273**(3), 729-739.
- Inouye H., Fraser P.E., Kirschner D.A. (1993) *Biophys. J.*, **64**(2), 502-519.
- Malinchik S.B., Inouye H., Szumowski K.E., Kirschner D.A. (1998) *Biophys. J.*, **74**(1), 537-545.
- Сурин А.К., Григорашвили Е.И., Суворина М.Ю., Селиванова О.М., Галзитская О.В. (2016) *Биохимия*, **81**, 999-1007.
- Garbuzynskiy S.O., Lobanov M.Y., Galzitskaya O.V. (2010) *Bioinformatics*, **26**(3), 326-332.
- Bieschke J., Zhang Q., Powers E.T., Lerner R.A., Kelly J.W. (2005) *Biochemistry*, **44**(13), 4977-4983.
- Cohen S.I.A., Linse S., Luhesi L.M., Hellstrand E., White D.A., Rajah L. et al. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**(24), 9758-9763.
- Meisl G., Yang X., Hellstrand E., Frohm B., Kirkegaard J.B., Cohen S.I.A. et al. (2014) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**(26), 9384-9389.
- Dovidchenko N.V., Finkelstein A.V., Galzitskaya O.V. (2014) *J. Phys. Chem. B*, **118**(5), 1189-1197.
- Lu J.-X., Qiang W., Yau W.-M., Schwieters C.D., Meredith S.C., Tycko R. (2013) *Cell*, **154**(6), 1257-1268.
- Wälti M.A., Ravotti F., Arai H., Glabe C.G., Wall J.S., Böckmann A. et al. (2016) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, DOI:10.1073/pnas.1600749113.
- Colvin M.T., Silvers R., Ni Q.Z., Can T.V., Sergeyev I., Rosay M. et al. (2016) *J. Am. Chem. Soc.*, **138**(30), 9663-9674.
- Tran J., Chang D., Hsu F., Wang H., Guo Z. (2017) *FEBS Letts.*, **591**(1), 177-185.
- Xiao Y., Ma B., McElheny D., Parthasarathy S., Long F., Hoshi M. et al. (2015) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**(6), 499-505.

40. Pauwels K., Williams T.L., Morris K.L., Jonckheere W., Vandersteen A., Kelly G. et al. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**(8), 5650-5660.
41. Cukalevski R., Yang X., Meisl G., Weininger U., Bernfur K., Frohm B. et al. (2015) *Chem. Sci.*, **6**(7), 4215-4233.
42. Lühns T., Ritter C., Adrian M., Riek-Loher D., Bohrmann B., Döbeli H. et al. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**(48), 17342-17347.
43. Petkova A.T., Yau W.-M., Tycko R. (2006) *Biochemistry*, **45**(2), 498-512.
44. Paravastu A.K., Leapman R.D., Yau W.-M., Tycko R. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**(47), 18349-18354.
45. Qiang W., Yau W.-M., Luo Y., Mattson M.P., Tycko R. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**(12), 4443-4448.
46. Schütz A.K., Vagt T., Huber M., Ovchinnikova O.Y., Cadalbert R., Wall J. et al. (2015) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **54**(1), 331-335.
47. Schmidt M., Rohou A., Lasker K., Yadav J.K., Schiene-Fischer C., Fändrich M. et al. (2015) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**(38), 11858-11863.
48. Sgourakis N.G., Yau W.-M., Qiang W. (2015) *Struct. Lond. Engl.*, **23**(1), 216-227.

Поступила: 11. 10. 2017.  
Принята к печати: 26. 10. 2017.

## MOLECULAR MECHANISM OF AMYLOID FORMATION BY A $\beta$ PEPTIDE: REVIEW OF OWN WORKS

*O.M. Selivanova<sup>1</sup>, V.V. Rogachevsky<sup>2</sup>, A.K. Syrin<sup>1,3</sup>, O.V. Galzitskaya<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Protein Research,

4 Institutskaya str., Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia; e-mail: ogalzit@vega.protres.ru

<sup>2</sup>Institute of Cell Biophysics, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

<sup>3</sup>State Scientific Center of Applied Microbiology and biotechnology,  
Village Obolensk, Moscow Region, Serpukhov District, 142279 Russia

TA characteristic feature of amyloid structures is polymorphism. The study of amyloid structures and their formation process was carried out for synthetic and recombinant A $\beta$ (1-40) and A $\beta$ (1-42) peptide preparations. In the study of these peptides, we recognized fibrils of different morphologies. We observed fibrillar formations in the form of single fibrils, ribbons, bundles, bunches, and clusters. Polymorphism of fibrils was observed not only when the environmental conditions changed, but under the same conditions and this was a common characteristics of all amyloid formations. Fibrils of A $\beta$ (1-40) peptides tended to form aggregates of fibrils in the form of ribbons, while A $\beta$ (1-42) peptide under the same conditions polymerized in the form of rough fibrils of different diameters and tends to branch. We assume that the formation of fibrils of A $\beta$ (1-40) and A $\beta$ (1-42) peptides occurs according to a simplified scheme: a destabilized monomer  $\rightarrow$  a ring oligomer  $\rightarrow$  a mature fibril consisting of ring oligomers. Proceeding from the proposition that the ring oligomer is the main building block of amyloid fibril (similar to the cell in the body), it is easy to explain fibril polymorphism, as well as fragmentation of mature fibrils under various external influences, branching and irregularity of diameter (surface roughness) of fibrils. One aspect of the study of amyloidogenesis is the determination of the regions of the protein chain forming the core of the amyloid fibril. We theoretically predicted amyloidogenic regions for two isoforms of A $\beta$  peptides capable of forming an amyloid structure: 16-21 and 32-36 residues. Using the method of tandem mass spectrometry, these regions were determined experimentally. It was shown that the regions of A $\beta$ (1-40) peptide from 16 to 22 and from 28 to 40 residues were resistant to the action of proteases, i.e. its formed the core of the amyloid fibril. For A $\beta$ (1-42) peptide the whole sequence is not available for the action of proteases, which indicates a different way of associating ring oligomers in the formation of fibrils. Based on electron microscopy and mass spectrometry data we proposed a molecular model of the fibril formed by A $\beta$ (1-40) and A $\beta$ (1-42) peptides.

**Key words:** oligomer, nucleus, polymorphism, fibril, amyloidogenic regions, isoform