

К ВОПРОСУ О ПУТИ АМИЛОИДНОЙ АГРЕГАЦИИ ТИТИНА

© 2023 г. Л.Г. Бобылёва*, Т.А. Урюпина*, М.А. Тимченко*, С.Н. Удальцов**,
И.М. Вихлянцев*, ***, А.Г. Бобылёв*.*

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

#E-mail: bobilev1982@gmail.com

**Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения – обособленное подразделение ФИЦ
«Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»,
Институтская ул., 2, Пущино Московской области, 142290, Россия

***Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета,
Казань, 420012, Россия

Поступила в редакцию 24.10.2023 г.

После доработки 10.11.2023 г.

Принята к публикации 16.11.2023 г.

Процесс амилоидной агрегации достаточно сложный и малоизученный. В данной работе, обобщив полученные ранее результаты по агрегации мультидоменного гладкомышечного белка титина, мы постарались дополнить представление о его амилоидной агрегации, представив новый, на наш взгляд, возможный механизм. Основной вывод заключается в том, что способность титина формировать аморфные агрегаты представляется единственным возможным путем агрегации этого белка. В образовании амилоидной структуры у аморфных агрегатов гладкомышечного титина участвуют, по всей видимости, лишь отдельные участки молекул, а не весь белок. Эта особенность, учитывая большие размеры молекулы белка, отличает титин от остальных амилоидных или амилоидо-подобных белков. Обсуждается возможный энергетический ландшафт, лежащий в основе образования амилоидных агрегатов титина.

Ключевые слова: титин, агрегация, олигомеры, амилоидные агрегаты, аморфные агрегаты, энергетический ландшафт

DOI: 10.31857/S0006302923060212, EDN: PSSSND

Амилоидная агрегация – это частный случай агрегации белков. Известно, что основное свойство всех амилоидных агрегатов – это наличие преобладающей четвертичной кросс- β -структуры, с отдельными слоями, ориентированными параллельно главной оси роста фибрилл (рис. 1а) [1–5]. Именно особенностью структуры определяются свойства амилоидных фибрилл, такие как высокая прочность, устойчивость к ферментативному расщеплению и низкая растворимость в большинстве растворителей. Наличие кросс- β -структуры определяется методом рентгеновской дифракции (рис 1).

Наличие общих свойств, характерных для всех амилоидов, вместе с доказательством того, что амилоидные фибриллы могут быть образованы из разных полипептидных последовательностей, привели к предположению, что амилоидные фибриллы представляют собой общую широкую группу белков и пептидов, имеющих определенную, характерную только для них структуру. Это

противоречит представлению о том, что нативная структура белка напрямую зависит от его аминокислотной последовательности. Таким образом, возникает вопрос о природе взаимодействий, которые стабилизируют амилоидные фибриллы. Экспериментально было показано, что наиболее важными параметрами, определяющими внутреннюю механическую прочность амилоидных фибрилл, являются межмолекулярные силы между β -листами и β -стрендами [6]. В то же время теоретическая работа [7] показала, что ключевым моментом для механических свойств амилоидных фибрилл является сильное упорядочение водородных связей между β -стрендами, при котором данные водородные связи действуют как химический клей, в результате чего увеличивается механическая прочность фибрилл. Действительно, измерение механических свойств отдельных структур, формирующихся в процессе образования фибрилл, таких как олигомеры, протофибриллы и зрелые фибриллы, выявило как для α -си-

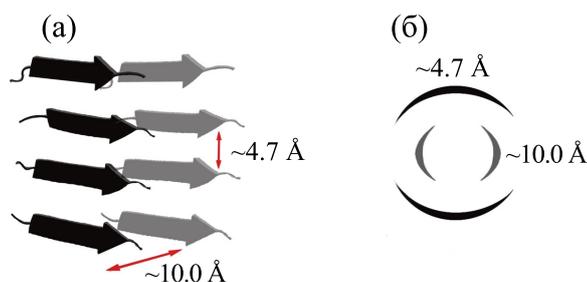


Рис. 1. Схематические изображения амилоидной кросс- β -структуры (а) и картина дифракции рентгеновских лучей на типичных амилоидных фибриллах (б). Рефлексы, расположенные по вертикали (меридиональное направление), соответствуют периодическим структурам с характерным размером 4.7–4.8 Å, т.е. участкам β -структуры, расположенным перпендикулярно оси фибриллы на расстоянии 4.7–4.8 Å друг от друга. Рефлексы, расположенные по горизонтали дифракционной картины (экваториальное направление), соответствуют периодическим структурам с характерным размером 10–11 Å, т.е. β -листам, расположенным на расстоянии 10–11 Å друг от друга [4, 5].

нуклеина, вовлеченного в патогенез болезни Паркинсона, так и для пептида $A\beta(1-42)$, вовлеченного в патогенез болезни Альцгеймера, постепенное увеличение модуля Юнга по мере того, как увеличивается содержание β -складчатой структуры [8].

Известно, что помимо амилоидных фибрилл белки могут образовывать другие типы агрегатов, например, растворимые олигомеры и аморфные агрегаты. Аморфные агрегаты обычно образуются за более короткие промежутки времени, чем фибриллы. Для их образования не требуется какой-то особой укладки (конформации) белковой молекулы. Многие белки с неупорядоченной структурой, а также частично развернутые белки формируют аморфные агрегаты. Для образования упорядоченных фибрилл, напротив, необходимы особые условия (определенные значения pH, определенный денатурант, разные значения ионной силы, температуры, времени инкубации), способствующие формированию специфической укладки в амилоидную структуру. Данная специфическая укладка может появляться уже на стадии формирования растворимых олигомеров [9].

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ЛАНДШАФТ СВОРАЧИВАНИЯ БЕЛКОВ

Способность белков сворачиваться *de novo* в свои функциональные состояния — одно из наиболее фундаментальных свойств полипептидов в природе. С момента появления первых работ, описывающих процесс сворачивания белков [10], были проведены многочисленные исследования процесса сворачивания белков и получены важные данные о механизмах данного процесса, включая структурный, кинетический и термодинамический анализ промежуточных и переходных состояний. Эти данные были получены с помощью разных подходов — экспериментального, теоретического, а также математического моде-

лирования [11]. В настоящее время процесс превращения полностью развернутого полипептида в нативную структуру белка или в какие-то другие состояния, включая амилоидные структуры, принято иллюстрировать движением по условному двумерному энергетическому ландшафту (рис. 2). Структура этого ландшафта уникальна для каждой полипептидной последовательности, зависит от условий среды и определяется как термодинамическими, так и кинетическими свойствами сворачивающейся полипептидной цепи.

Исторически сворачивание белка рассматривалось как серия последовательных шагов между более близких к нативному белку формами, до момента формирования окончательной нативной структуры. Основываясь на понимании того, что развернутое и частично свернутое состояния конформационно неоднородны и что не существует единого пути к нативному состоянию, модели сворачивания теперь превратились в ландшафтный взгляд на сворачивание белка [12], в котором развернутое состояние — полипептидная цепь — ищет нативную конформацию на чаще всего неровной энергетической поверхности или «ландшафте» до тех пор, пока не сформируется уникальная нативная структура. Предполагается, что нативные взаимодействия между аминокислотными остатками более стабильны, чем ненативные контакты, и по мере формирования более стабильных нативных контактов количество доступных конформаций уменьшается, перемещая полипептидную цепь в сторону нативной структуры.

Небольшие однодоменные белки (например, <100 аминокислот в длину), как правило, сворачивающиеся в нативное состояние за доли секунды, были в центре внимания многих экспериментальных и теоретических исследований сворачивания белков [15]. Ландшафт сворачивания этих белков обычно не имеет сильных неровностей, в результате чего во время реакции сворачивания

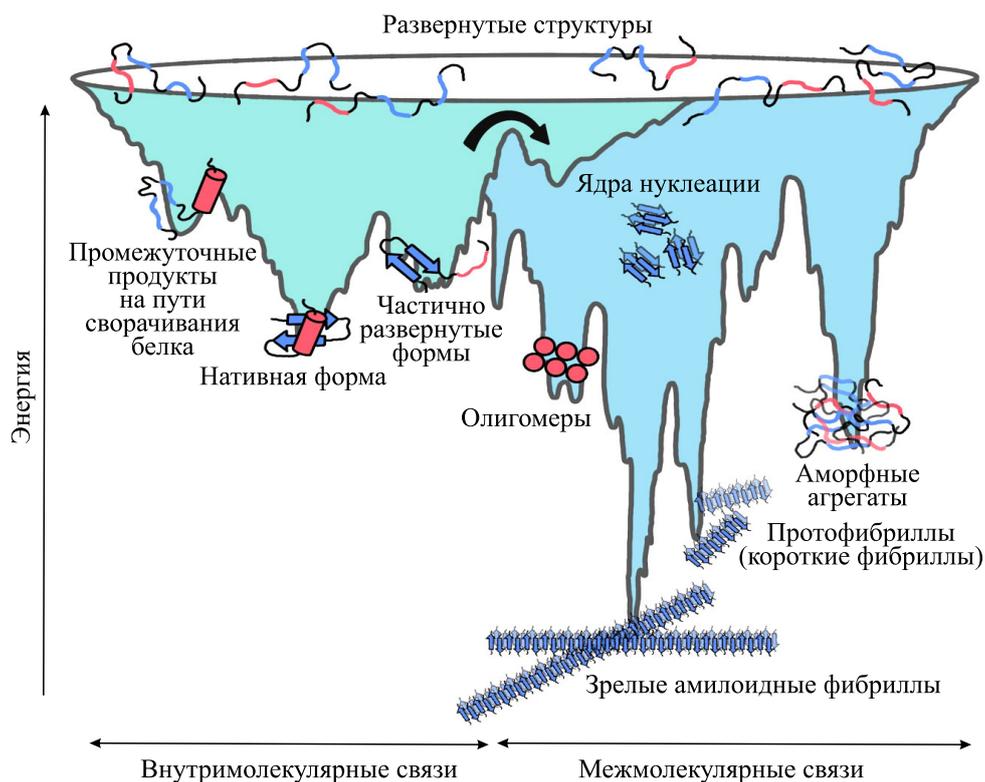


Рис. 2. Условный двумерный энергетический ландшафт сворачивания (фолдинга) и агрегации белка. Показаны возможные, уже известные промежуточные состояния на пути к нативному состоянию белка, а также на пути к образованию амилоидных фибрилл [11, 13]. Черной стрелкой показан энергетический барьер, который должны преодолеть структуры белка перед тем, как начнут формироваться агрегаты (для глобулярных белков это может произойти под действием высоких температур, низких значений pH, добавления денатуранта). Воспроизведено из работы [14].

стабильно присутствуют только ансамбль развернутых структур и нативный белок (механизм двух состояний) [16].

Белки длиной более 100 аминокислотных остатков складываются на гораздо более шероховатой энергетической поверхности, на которой обычно находятся промежуточные продукты сворачивания на пути к нативному состоянию. Причина этого, по-видимому, заключается в том, что из-за гидрофобного эффекта в водном растворителе более крупные полипептидные цепи имеют высокую склонность к образованию компактных состояний, которые могут содержать значительное количество элементов нативной структуры. Реорганизация контактов между аминокислотными остатками (включая как нативные, так и ненативные взаимодействия) в этих компактных состояниях может включать высокий барьер свободной энергии, что приводит к переходному появлению частично свернутых или «промежуточных» состояний (рис. 2). В больших мультидоменных белках происходит параллельное сворачивание различных областей, а в заключи-

тельный этап сворачивания формируются все нативные внутри и междоменные контакты, которые определяют окончательную функциональную форму [17], возможно, отображая последовательные события сворачивания белка на рибосоме *in vivo* [18].

Частично свернутые состояния на этом ландшафте могут быть по своей природе склонны к агрегации, а межмолекулярные контакты могут привести к их ассоциации/агрегации [10, 11]. Механизмы, лежащие в основе этих специфических событий агрегации, в последние годы вызвали сильный интерес в сообществе специалистов по сворачиванию белков. Фокус внимания исследователей сместился на центральную проблему, связанную с агрегацией, для того чтобы лучше понимать механизмы развития амилоидозов и образования функциональных амилоидных агрегатов в клетках. При этом амилоидозы являются наиболее часто исследуемым нарушением белковой агрегации.

Амилоидные фибриллы образуются зависимым от нуклеации способом, при котором моно-

мерная форма белка переходит в фибриллярную форму через формирование временной структуры — ядра нуклеации [13, 19]. Также известно, что в случае глобулярных белков, фибриллы обычно образуются в условиях, в которых нативное состояние дестабилизировано (добавлением денатурирующего агента, низким рН, высокой температурой или заменами аминокислот) [20]. Все эти условия, необходимые для перехода в агрегированную форму, указаны на энергетическом ландшафте (рис. 2) как барьер, для перехода которого нужна энергия.

Здесь следует отметить, что большинство исследований путей агрегации белков проводились в основном на белках с относительно небольшой молекулярной массой. В случае с гигантскими полипептидами, способными формировать амилоидные или амилоидо-подобные агрегаты, исследований практически нет. Одним из таких белков является титин, различные изоформы которого имеют молекулярные массы от 500 кДа до 3800 кДа [21–23]. Далее речь пойдет именно об этом белке, агрегация которого нами была достаточно подробно изучена.

ОСОБЕННОСТИ АМИЛОИДНЫХ АГРЕГАТОВ ТИТИНА

В наших предыдущих исследованиях мы показали, что различные изоформы гладкомышечного титина формируют аморфные агрегаты, которые имеют амилоидную природу [24–27]. Амилоидная природа аморфных агрегатов гладкомышечного титина была подтверждена с помощью красителей тιοфлавина Т и Конго красного, а также методом рентгеновской дифракции, выявившей наличие специфической для всех амилоидных агрегатов четвертичной кросс- β -структуры. Этот результат расходится с общепринятой научной точкой зрения, заключающейся в том, что амилоидными могут быть только высокоупорядоченные фибриллы. Тем не менее, в литературе описаны другие белки, аморфные агрегаты которых также проявляют амилоидные свойства [28–30]. В указанных работах исследуемые белки могли формировать как аморфные агрегаты, так и фибриллы в зависимости от условий. Однако гладкомышечный титин по нашим данным способен формировать только аморфные агрегаты. В литературе также существуют исследования, проведенные для Ig-подобного домена I27 титина, в которых показано, что данный домен тоже формирует амилоидные аморфные агрегаты [31]. При этом, как утверждают авторы цитируемой работы, агрегаты данного домена титина остаются аморфными в течение длительного времени и не проявляют никаких признаков перестройки в зрелые фибриллы даже

через четыре месяца инкубации в растворе, содержащем 28% трифторэтанола [31].

Обнаруженная особенность к формированию стабильных амилоидных аморфных агрегатов, формируемых как из одного Ig-подобного домена I27 титина [31], так и из целых его молекул [24–27], поднимает вопрос об изменениях, происходящих на структурном уровне при агрегации этого белка. Мы показали, что при формировании амилоидных агрегатов гладкомышечного титина не происходит изменений во вторичной структуре [25, 27], в то время как для большинства исследуемых белков при формировании амилоидных агрегатов наблюдается увеличение процента содержания β -структуры [34]. Формирование межмолекулярных связей между молекулами гладкомышечного титина, по нашему предположению, происходит за счет частичного раскрытия доменов белка и последующего взаимодействия между аминокислотными цепями открытых участков доменов разных молекул. Это предположение основывается на данных, в которых описывается частичное раскрытие отдельных доменов титина [35, 36], причем это раскрытие происходит при низких затратах энергии [36]. Кроме того, проведенные нами ранее исследования показали, что среди аморфных агрегатов гладкомышечного титина встречаются отдельные нити, которые по параметрам являются молекулами этого белка [27]. Это может свидетельствовать о том, что при агрегации гладкомышечного титина часть молекулы белка остается стабильной, а часть участвует в формировании межмолекулярной связи по типу амилоидной. Косвенно на это указывает наличие способности к обратимой агрегации гладкомышечного титина [25, 27], отсутствие увеличения содержания во вторичной структуре β -складчатости [25, 27], а также выявленная методом дифференциально-сканирующей калориметрии относительно низкая стабильность амилоидных агрегатов титина, не сильно отличающаяся от таковой у неагрегированной формы этого белка [27].

Принимая во внимание данные о возможном частичном раскрытии отдельных доменов титина, а также наши данные об олигомеризации отдельных молекул гладкомышечного титина в растворе с высокой ионной силой (более 0.6, см. рис. 3а), формирование водородной связи между этими открытыми участками теоретически возможно, как это показано схематически на рис. 3б. При изменении условий, в частности, при снижении ионной силы, данный процесс ускоряется. Таким образом, агрегация титина может происходить очень быстро, поскольку уже присутствуют олигомеры этого белка, которые, как известно, дополнительно ускоряют процесс агрегации [37]. Учитывая наши данные, можно заключить, что титин является уникальным объектом, кото-

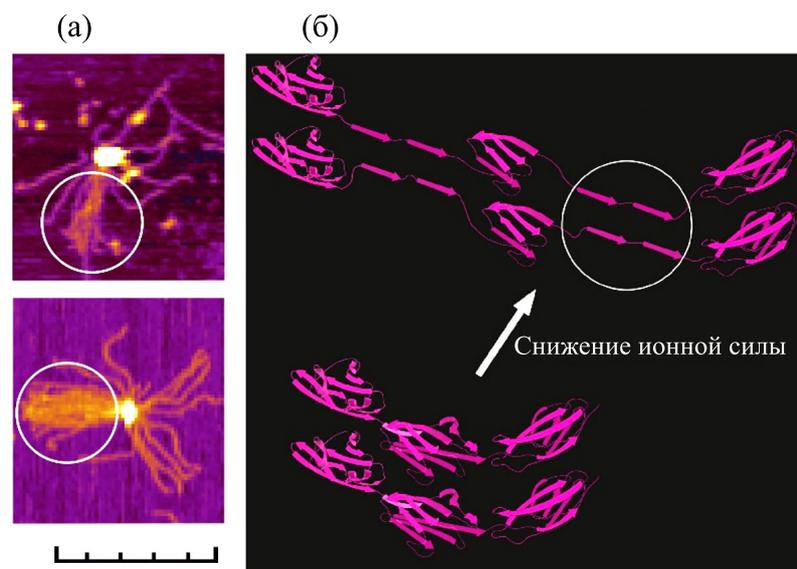


Рис. 3. (а) — Атомно-силовая микроскопия олигомера гладкомышечного титина в растворе с высокой ионной силой (более 0.6); опубликовано ранее в работе [27]. Внутри белого круга показаны молекулы титина, которые наиболее близко прилегают друг к другу. Шкала 500 нм. (б) — Схематичное представление возможного формирования межмолекулярных связей между частично развернутыми доменами двух расположенных рядом молекул титина. На схеме частичный анфолдинг представлен для среднего домена. Внутри белого круга схематично показана вероятная структура, напоминающая кросс- β -структуру, которая возможна для агрегатов гладкомышечного титина. Формирование амилоидо-подобных структур, наподобие представленных на схеме, ранее было предложено для доменов титина I27–I28, формирующих промежуточные структуры неправильной укладки, получившие название «внутримолекулярный амилоид» [32]. Схема представлена на примере трех доменов титина (двух иммуноглобулин-подобных и одного фибронектин III-подобного), расположенных в А-диске саркомера. Источник: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q8WZ42>. Частичное раскрытие домена на схеме показано на основании данных работы [33].

рый может одновременно формировать внутри и межмолекулярные связи, причем последние — амилоидной природы. И это без преувеличения указывает на новый механизм агрегации, включая особые структурные, кинетические и термодинамические характеристики промежуточных продуктов агрегации титина и почти полное отсутствие переходных состояний. Далее рассмотрим агрегацию гладкомышечного титина с точки зрения теории энергетического ландшафта.

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ЛАНДШАФТ ОБРАЗОВАНИЯ АМИЛОИДНЫХ АГРЕГАТОВ ТИТИНА

Прежде чем приступить к описанию особенности энергетического ландшафта титина, следует дать краткое обозрение следующей информации. В случае сворачивания белка «вне пути» (*англ.* «off pathway») форма графика энергетического ландшафта схожа с формой графика сворачивания «на пути» (*англ.* «on pathway»), напоминающей «воронку», но из-за появления межмолекулярных взаимодействий и их конкуренции с внутримолекулярными взаимодействиями, повышается изрезанность (неровность) графика ландшафта агрегации [38] (рис. 2). В случае сво-

рачивания «вне пути» амилоидные фибриллы, как считается, находятся в наиболее стабильном термодинамическом состоянии, присутствующим в энергетическом ландшафте [39–43]. Считается, что энергетический ландшафт амилоидных фибрилл может характеризоваться множеством пиков из-за различных морфологических конформаций амилоидных фибрилл.

Во время процесса сворачивания «на пути» и «вне пути» конкуренция между межмолекулярными и внутримолекулярными взаимодействиями играет ключевую роль. Чтобы предотвратить сворачивание «вне пути» эволюция предоставила живым системам стратегии уменьшения взаимодействий между различными молекулами на всем пути сворачивания белка до завершения процесса его сворачивания.

Молекула титина имеет огромные (по отношению к другим белкам) размеры и с трудом представляется его способность полного или значительного разворачивания при формировании межмолекулярных связей «вне пути». Тем не менее, мы попытались изобразить возможный энергетический ландшафт агрегации данного белка на основе полученных нами экспериментальных данных.

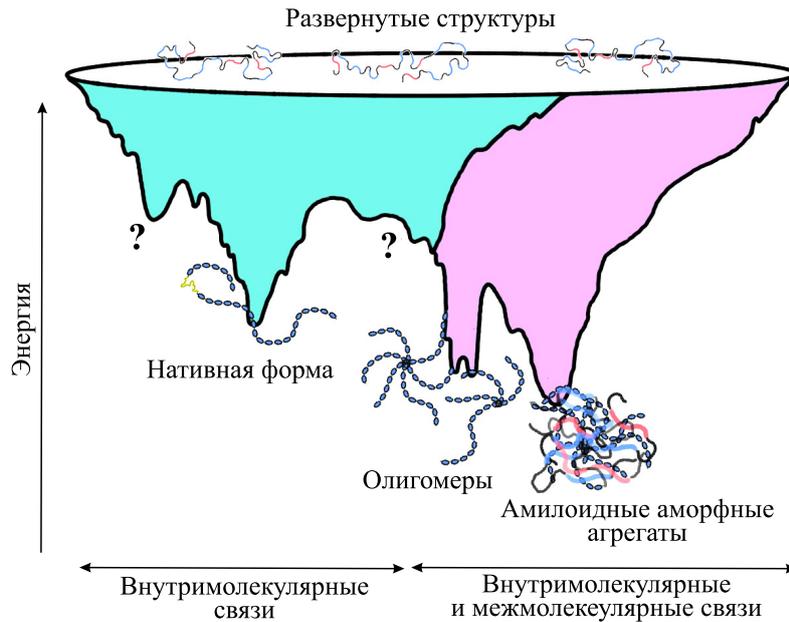


Рис. 4. Условный двумерный энергетический ландшафт сворачивания (фолдинга) и агрегации гладкомышечного титина. Поскольку мы не имеем достаточной информации о наличии частично свернутых и частично развернутых состояниях белка, то на схеме данные состояния отмечены знаком вопроса. Также на схеме отсутствует предполагаемый для большинства белков высокий энергетический барьер, необходимый для перехода от мономеров белка к олигомерам и агрегатам. Отсутствуют также ядра нуклеации.

На рис. 4 представлены три основные формы титина — это нативный белок, его олигомеры и аморфные амилоидные агрегаты. Между этими формами практически отсутствуют энергетические барьеры и не имеется промежуточных форм. Это связано с тем, что олигомеры титина уже формируются в условиях высокой ионной силы, при которых большинство молекул этого белка находится в мономерной форме. Олигомеризация ускоряет процесс агрегации титина. Амилоидные аморфные агрегаты гладкомышечного титина на рисунке в энергетическом ландшафте представляют собой наиболее стабильное термодинамическое состояние (рис. 4), однако менее стабильное, чем, например, амилоидные фибриллы других белков (рис. 2).

Предположение о минимальных различиях в стабильности различных структур на энергетическом ландшафте титина было сделано на основе полученных нами температур плавления молекулярной формы белка (где присутствуют и его олигомеры), а также его агрегатов [27]. Мы показали, что стабильность неагрегированной формы гладкомышечного титина была ниже (T_m составляла 317.7 К), чем стабильность его агрегатов (T_m составляла 321.7 К). Однако разница максимальной температуры пика теплопоглощения между агрегированной и неагрегированной формами белка не была столь существенна как в случае с истинными амилоидными белками. Также практиче-

ски не наблюдалось разницы между значениями калориметрической энтальпии перехода.

Другой особенностью агрегации титина, которую мы учли и постарались отобразить в энергетическом ландшафте, является наличие как внутримолекулярных, так и межмолекулярных связей при сворачивании «вне пути». На это указывают прямые экспериментальные данные электронной микроскопии, показывающие частичную агрегацию его молекул [27], а также отсутствие изменений во вторичной структуре титина в процессе его агрегации [25, 27].

Таким образом, наши данные показывают, что при агрегации титина могут одновременно формироваться и внутри, и межмолекулярные связи, причем последние — амилоидной природы. Эти данные указывают на новый механизм белковой агрегации. Предложенный энергетический ландшафт отображает этот механизм агрегации гладкомышечного титина и расширяет наши представления о процессе агрегации белков.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00805).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит экспериментов с использованием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- C. Li, J. Adamcik, and R. Mezzenga, *Nat. Nanotechnol.*, **7** (7), 421 (2012). DOI: 10.1038/nnano.2012.62
- R. Nelson, M. R. Sawaya, M. Balbirnie, et al., *Nature*, **435** (7043), 773 (2005).
- M. R. Sawaya, S. Sambashivan, R. Nelson, et al., *Nature*, **447** (7143), 453 (2007). DOI: 10.1038/nature05695
- D. Eisenberg and M. Jucker, *Cell*, **148** (6), 1188 (2012). DOI: 10.1016/j.cell.2012.02.022
- H. Wille, W. Bian, M. McDonald, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106** (40), 16990 (2009). DOI: 10.1073/pnas.0909006106
- T. P. Knowles, A. W. Fitzpatrick, S. Meehan, et al., *Science*, **318** (5858), 1900 (2007). DOI: 10.1126/science.1150057
- S. Ketten and M. J. Buehler, *Nano Lett.*, **8** (2), 743 (2008). DOI: 10.1021/nl0731670
- F. S. Ruggeri, J. Adamcik, J. S. Jeong, et al., *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* **54** (8), 2462 (2015). DOI: 10.1002/anie.201409050
- V. N. Uversky, *FEBS J.*, **277**, 2940 (2010).
- C. B. Anfinsen, *Science*, **181**, 223 (1973).
- M. Vendruscolo and C. M. Dobson, *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.*, **363**, 433 (2005).
- P. G. Wolynes, *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.*, **363**, 453 (2005).
- J. C. Rochet and P. T. Lansbury Jr, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 60 (2000).
- T. R. Jahn, S. E. Radford, *FEBS J.*, **272** (23), 5962 (2005). DOI: 10.1111/j.1742-4658.2005.05021.x
- V. Daggett and A. R. Fersht, *Trends Biochem. Sci.*, **28**, 18 (2003).
- A. R. Fersht, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 1525 (2000).
- S. E. Radford, C. M. Dobson, and P. A. Evans, *Nature*, **358**, 302 (1992),
- D. Baram and A. Yonath, *FEBS Lett.*, **579**, 948 (2005).
- T. M. Phan and J. D. Schmit, *Biophys. J.*, **121** (15), 2931 (2022). DOI: 10.1016/j.bpj.2022.06.031
- V. N. Uversky and A. L. Fink, *Biochim. Biophys. Acta*, **1698**, 131 (2004).
- J. K. Freundt and W. A. Linke, *J. Appl. Physiol.*, **126** (5), 1474 (2019). DOI: 10.1152/jappphysiol.00865.2018.
- I. M. Vikhlyantsev and Z. A. Podlubnaya, *Biophys. Rev.*, **9** (3), 189 (2017). DOI: 10.1007/s12551-017-0266-6
- K. Kim and T. C. Keller 3rd, *J. Cell Biol.*, **156** (1), 101 (2002). DOI: 10.1083/jcb.200107037
- A. G. Bobylev, O. V. Galzitskaya, R. S. Fadeev, et al., *Biosci. Rep. Biosci. Rep.*, **36** (3), e00334 (2016). DOI: 10.1042/BSR20160066
- E. I. Yakupova, I. M. Vikhlyantsev, L. G. Bobyleva, et al., *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **36** (9), 2237 (2018). DOI: 10.1080/07391102.2017.1348988
- A. G. Bobylev, E. I. Yakupova, L. G. Bobyleva, et al., *Mol. Biol. (Moscow)*, **54** (4), 643 (2020). DOI: 10.31857/S0026898420040047
- A. G. Bobylev, E. I. Yakupova, L. G. Bobyleva, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **24** (2), 1056 (2023). DOI: 10.3390/ijms24021056
- M. R. Krebs, G. L. Devlin, and A. M. Donald, *Biophys. J.*, **96** (12), 5013 (2009).
- H. H. J. de Jongh, T. Gröneveld, and J. de Groot, *J. Dairy Sci.*, **84**, 562 (2001).
- M. R. H. Krebs, E. H. C. Bromley, S. S. Rogers, and A. M. Donald, *Biophys. J.*, **88**, 2013 (2005).
- M. B. Borgia, A. A. Nickson, J. Clarke, M. J. Hounslow, *J. Am. Chem. Soc.*, **135** (17), 6456 (2013). DOI: 10.1021/ja308852b
- A. Borgia, K. R. Kemplen, M. B. Borgia, et al., *Nat. Commun.*, **6**, 8861 (2015).
- H. Lu, B. Isralewitz, A. Krammer, et al., *Biophys. J.*, **75** (2), 662 (1998). DOI: 10.1016/S0006-3495(98)77556-3
- J. Waeytens, J. Mathurin, A. Deniset-Besseau, et al., *Analyst*, **146** (1), 132 (2021). DOI: 10.1039/d0an01545h
- E. C. Eckels, S. Haldar, R. Tapia-Rojo, et al., *Cell Rep.*, **27**, 1836 (2019).
- J. A. Rivas-Pardo, E. C. Eckels, I. Popa, et al., *Cell Rep.*, **14**, 1339 (2016).
- S. Kumar and J. Walter, *Aging (NY)*, **3** (8), 803 (2011). DOI: 10.18632/aging.100362
- J. Gsponer and M. Vendruscolo, *Prot. Pept. Lett.*, **13** (3), 287 (2006). DOI: 10.2174/092986606775338407
- T. Eichner and S. E. Radford, *Mol. Cell.*, **43** (1), 8 (2011). DOI: 10.1016/j.molcel.2011.05.012
- K. W. Tipping, P. van Oosten-Hawle, E. W. Hewitt, and S. E. Radford, *Trends Biochem. Sci.*, **40** (12), 719 (2015). DOI: 10.1016/j.tibs.2015.10.002
- A. K. Buell, A. Dhulesia, D. A. White, et al., *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, **51** (21), 5247 (2012). DOI: 10.1002/anie.201108040
- A. J. Baldwin, T. P. Knowles, G. G. Tartaglia, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **133** (36), 14160 (2011). DOI: 10.1021/ja2017703
- E. Gazit, *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, **41** (2), 257 (2002). DOI: 10.1002/1521-3773(20020118)41:2<257::aid-anie257>3.0.co;2-m

About the Pathway of Amyloid Aggregation of Titin

L.G. Bobyleva*, T.A. Uryupina*, M.A. Timchenko*, S.N. Udaltsov**,
I.M. Vikhlyantsev*, ***, and A.G. Bobylev*

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

***Institute of Physicochemical and Biological Problems of Soil Science, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul. 2, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

****Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, ul. Karla Marksa 76, Kazan, 420012 Russia*

The process of amyloid aggregation is quite complex and poorly understood. In this work, having summarized previously obtained results on the aggregation of the multidomain smooth muscle protein titin, an attempt has been made to expand understanding of this process, and a new possible mechanism by which amyloid aggregation of titin may occur is delineated. Our main conclusion is that the ability of titin to form amorphous aggregates seems to be the only possible way of aggregation of this protein. Most likely, only separate parts of the molecules, but not the whole protein, are involved in the formation of the amyloid structure in amorphous aggregates of smooth muscle titin. This feature, given the large size of the protein molecule, distinguishes titin from other amyloid or amyloid-like proteins. The paper discusses the potential energy landscape underlying the formation of titin amyloid aggregates.

Keywords: titin, aggregation, oligomers, amyloid aggregates, amorphous aggregates, energy landscape