

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА АМИЛОИДООБРАЗОВАНИЯ А β ПЕПТИДА

©2018 г. О. В. ГАЛЗИТСКАЯ*,
Е. И. ГАЛУШКО, О. М. СЕЛИВАНОВА

Институт белка РАН, Пущино, Московская область

I. Введение. II. Белок-предшественник А β пептида: пути процессинга, функции. III. Структурные особенности и фибриллогенез А β пептидов. IV. Токсичность фибрилл и олигомеров, образованных А β пептидом. V. Взаимодействие А β пептида с другими молекулами. VI. Возможные ошибки при интерпретации экспериментальных данных для различных амилоидогенных белков. VII. Данные прошлых лет, на которые следует обратить внимание. VIII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Нарушение сворачивания белков приводит к развитию целого ряда системных и нейродегенеративных заболеваний, получивших название протеинопатии [1, 2]. При таких патологиях белки приобретают неправильную структуру (конформацию, отличную от нативной), становятся функционально неактивными, токсичными, склонными к агрегации и отложению в различных органах и тканях. На данный момент широко распространена гипотеза, подтверждаемая результатами целого ряда исследований, согласно которой первичными цитотоксическими агентами при развитии протеинопатий являются олигомеры белков, склонных к агрегации [3–7].

К группе протеинопатий относятся болезнь Паркинсона, болезнь Крейтцфельдта-Якоба, сахарный диабет 2-го типа и многие другие.

Принятые сокращения: БА – болезнь Альцгеймера; АМП – антимикробный пептид; ЭМ – электронная микроскопия; а.п. – аминокислотная последовательность; а.о. – аминокислотный остаток; NMDA-рецепторы (НМДА-рецептор) – ионотропный рецептор глутамата, селективно связывающий N-метил-D-аспартат; ШАСБ – шапероноподобные амилоидо-связывающие белки; NUCB1 – нуклеобиндин-1; АСМ – атомно силовая микроскопия; криоЭМ – криоэлектронная микроскопия; ThT – тиофлавинТ; APP (Amyloid precursor protein) – белок-предшественник А β пептида; APPs α – растворимые внеклеточные фрагменты; HN (humanin) – хуманин; ГАМК – гамма-аминомасляная кислота.

*Адрес для корреспонденции: ogalzit@vega.protres.ru.

Работа выполнена при поддержке программы РНФ (14-14-00536) и МКБ (01201353567).

Однако самым известным заболеванием является сенильная деменция альцгеймеровского типа, или болезнь Альцгеймера (БА).

БА является одним из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний и источником 50–70 % случаев приобретенного слабоумия [8]. Болезнь обычно проявляется после 65 лет, однако встречаются и редкие ранние наследственные формы БА, когда обнаруживаются точечные мутации в гене, кодирующем белок – предшественник Аβ пептида (APP) [9]. Кроме того, отмечается, что развитие БА может быть спровоцировано различными нейровоспалениями, нарушениями регуляции иммунной системы [10], травмами и другими факторами. Этиопатологические механизмы развития БА изучены недостаточно. Ключевыми особенностями болезни является накопление в тканях мозга агрегатов Аβ пептидов в виде амилоидных бляшек, а также нейрофибриллярных клубков, состоящих из гиперфосфорилированного тау-белка [11]. В течение последних двух десятилетий была разработана рабочая гипотеза, известная как «амилоидно-каскадная», предполагающая, что прогрессирующая аккумуляция/олигомеризация/агрегация Аβ пептидов в областях мозга, отвечающих за способность к обучению и память, является основной причиной нейродегенерации и гибели клеток мозга при БА.

В настоящее время патогенез БА является областью активных исследований. Это связано, в том числе и с тем, что увеличивается продолжительность жизни, а следовательно, и частота встречаемости этого заболевания. По прогнозу на 2050 г. количество людей, страдающих БА, превысит 100 млн. человек [12]. К тому же БА требует больших финансовых вложений для диагностики и разработки лекарственных препаратов, препятствующих прогрессированию данного заболевания.

Существует ряд признаков, указывающих на то, что исследуемые фибриллы являются амилоидами. Во-первых, способность взаимодействовать с гидрофобными красителями для окрашивания срезов тканей: конго красным (двойное лучепреломление) и тиофлавином Т и S (флуоресцентная спектроскопия). Во-вторых, наличие кросс-β структуры. При рентгеноструктурном анализе выявляются два характерных рефлекса: меридиональный 4,5–4,8 Å и экваториальный 8–12 Å [13–18]. В-третьих, при прямой визуализации препаратов микроскопическими методами (ЭМ, АСМ, крио-ЭМ) наблюдаются фибриллы с диаметром около 10 нм и длиной до 10–15 мкм [19]. В-четвертых, при формировании фибрилл наблюдается т. н. лаг-период, во время которого формируются зародыши фибрилл (стадия нуклеации, имеющая концентрационную зависимость) и период быстрого роста [20–24].

Исследование процесса амилоидообразования/фибриллообразования Аβ пептида, а также структуры его агрегатов, может внести

свой вклад в понимание патофизиологических механизмов развития БА и способствовать поиску эффективных лекарственных средств, направленных против агрегации изоформ A β пептида.

II. БЕЛОК ПРЕДШЕСТВЕННИК A β ПЕПТИДА: ПУТИ ПРОЦЕССИНГА, ФУНКЦИИ

Предшественником основного составляющего амилоидных бляшек, обнаруживающихся при БА – A β пептида, является трансмембранный белок APP (Amyloid precursor protein). Ген APP локализован в 21 хромосоме и содержит не менее 19 экзонов, что может приводить к появлению изоформ APP различной длины с молекулярной массой от 100 до 140 кДа [25, 26].

Белки семейства APP (695–770 а.о.) состоят из гидрофильного N-концевого внеклеточного домена, гидрофобного трансмембранного домена и C-концевого цитоплазматического домена [27] (рис. 1). Сравнение ДНК человека и других млекопитающих показывает высокую степень консервативности гена APP: установлена 100%

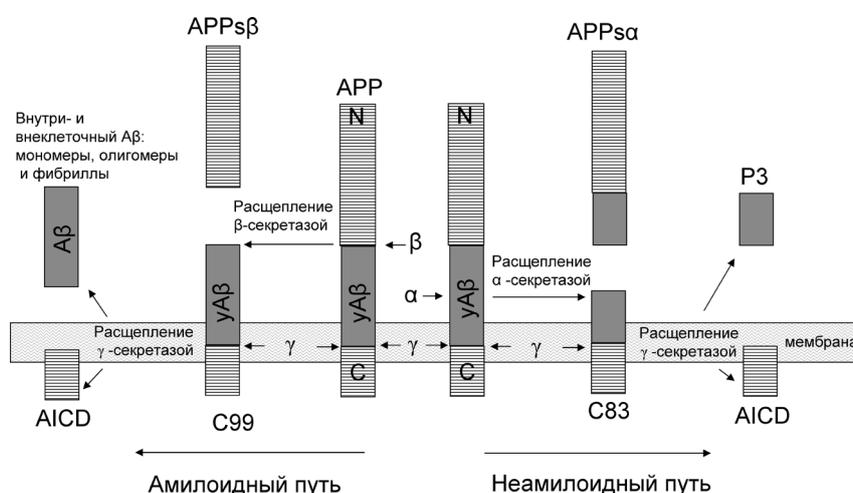


Рис. 1. Пути процессинга APP [11]. Белок предшественник A β пептида предпочтительно расщепляется по неамилоидогенному пути с помощью фермента α -секретазы с образованием большого эктодомена, APPs α , и C-концевого домена, от которого затем γ -секретазой отщепляется пептид P3. APP может быть расщеплен по амилоидогенному пути с помощью фермента β -секретазы с образованием эктодомена APPs β и более длинного C-концевого фрагмента. Этот фрагмент расщепляется γ -секретазой, в результате чего генерируются A β пептиды (672–713 соответствует A β (1–42) и 672–711 соответствует A β (1–40)). уA β – обозначает участки будущих молекул A β пептидов в белке предшественнике APP.

идентичность APP-695 из мозга человека и обезьян. В нейронах центральной нервной системы доминирует изоформа APP-695, а формы APP-770 и APP-751 присутствуют в следовых количествах [28, 29]. APP синтезируется и гликозилируется в эндоплазматическом ретикулуме, затем переносится в комплекс Гольджи для созревания перед транспортом к клеточной поверхности [30].

Мутации в некоторых регионах гена APP являются причиной наследственной предрасположенности к БА. Несколько мутаций A β пептида (фламандская (A21G), итальянская (E22K), арктическая (E22G), голландская (E22Q) и айова (D23N) [31]) ускоряют его олигомеризацию (E22Q и E22G [32]) и фибриллогенез (E22Q и D23N [31]). Точный механизм, с помощью которого эти мутации вносят свой вклад в патогенез БА, неизвестен.

APP участвует в адгезии, миграции, пролиферации клеток, обеспечивает гомеостаз холестерина и меди [33]. В головном мозге APP участвует в развитии нейронов, образовании и репарации синапсов, обеспечении синаптической пластичности. Однако детальные механизмы этих эффектов до конца не изучены [34].

Все больше данных указывают на нейропротекторную роль этого мембранного белка в ситуациях метаболического стресса. APP сам по себе или его растворимые внеклеточные фрагменты (APPs α) могут способствовать выживанию нейронов. Действительно, различные модели острой гипоксии-ишемии животных, черепно-мозговой травмы и эксайтотоксичности демонстрируют защитные эффекты APP или APPs α . Основные механизмы включают APP-опосредованную регуляцию гомеостаза кальция через NMDA-рецепторы, кальциевые потенциал-активируемые каналы или внутреннее депо кальция. Кроме того, APP влияет на экспрессию генов, связанных с выживанием или апоптозом [35].

АМИЛОИДОГЕННЫЙ И НЕАМИЛОИДОГЕННЫЙ ПУТИ ПРОЦЕССИНГА APP

Посттрансляционные модификации APP включают в себя гликозилирование, фосфорилирование, сиалирование, а также ограниченный протеолиз. При неамилоидогенном пути белок расщепляется протеазами семейства секретаз (α -секретазы и γ -секретазы), которые удаляют почти весь внеклеточный домен с высвобождением закрепленных на мембране C-концевых фрагментов и могут быть связаны с апоптозом (рис. 1). При амилоидогенном пути после расщепления β -секретазой APP дальнейшее его расщепление γ -секретазой в районе мембраносвязывающего домена приводит к появлению пептидных

фрагментов A β пептида различной длины (39–43 аминокислотных остатка), причем, две основные формы пептидов представляют собой варианты A β (1–40) и A β (1–42) (из 40 и 42 остатков аминокислот, соответственно). Хотя вариант пептида A β (1–42) составляет лишь 10% от общего количества A β пептида, секретируемого из клеток, он является основным белковым компонентом амилоидных бляшек. При этом *in vitro* данная форма A β пептида образует агрегаты намного быстрее, чем пептид A β (1–40) [21].

Как при амилоидном так и неамилоидном процессинге APP действие γ -секретазы ведет к образованию внутриклеточного концевоего фрагмента (AICD) (рис. 1), который является фактором транскрипции и, вероятно, регулирует уровень экспрессии как самого APP по принципу обратной связи, так и амилоид-деградирующего фермента неприлизина [36, 37].

Гамма-секретаза представляет собой крупный мультисубъединичный комплекс, состоящий из 4 индивидуальных белков, в том числе, пресенилина-1 или 2, гены которых были идентифицированы как основные генетические факторы риска развития БА [38]. Мутации генов пресенилина-1 и пресенилина-2 сопровождаются повышением уровня A β (1–42) по сравнению с A β (1–40), хотя общее количество образующегося A β пептида остаётся постоянным [39]. Недавно было проанализировано 138 мутаций, зарегистрированных для человеческого пресенилина-1 [40]. Около 90% этих мутаций приводят к сокращению уровня A β (1–42) и A β (1–40). Примечательно, что 10% этих мутаций приводят к уменьшению отношения A β (1–42)/A β (1–40). При этом нет статистически значимой корреляции между отношением A β (1–42)/A β (1–40), которое связано с вариантом γ -секретазы, содержащей специфическую мутацию гена пресенилина-1, и средним возрастом пациентов на момент, когда была выявлена данная мутация.

Амилоидогенный процессинг APP связан с его присутствием на липидных кластерах/плотиках (*англ. raft*). Когда молекулы APP занимают область липидного рафта мембраны, они становятся более доступными для расщепления β -секретазой, тогда как молекулы APP вне рафта дифференцированно расщепляются α -секретазой. Активность γ -секретазы также связана с липидными рафтами. Так как холестерин участвует в организации липидного рафта, то его высокий уровень, а также генотип аполипопротеина E4, могут считаться факторами риска развития БА [41].

Недавно был обнаружен альтернативный путь процессинга APP с помощью внутримембранной ромбовидной протеазы млекопитающих (RHBDL4). Ромбовидная протеаза несколько раз расщепляет APP в области эктодомена, в результате образуется несколько

N- и C-концевых фрагментов, которые не деградируют с помощью классических секретаз. Таким образом, APP не участвует в амилоидогенном пути процессинга, что приводит к снижению уровня A β пептида [42]. Также существует η -секретаза, при воздействии которой образуются фрагменты амилоида- η , ингибирующие функции нейронов [43].

III. СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И ФИБРИЛЛОГЕНЕЗ ИЗОФОРМ A β ПЕПТИДОВ

Основными изоформами A β пептида являются пептид из 40 аминокислотных остатков A β (1–40) и пептид из 42 аминокислотных остатков A β (1–42). Аминокислотная последовательность A β (1–42) пептида имеет следующий вид:

(NH₂)–DAEFRHDSGYEFHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA–(COOH).

Функция изоформ A β пептида в организме человека остаётся до конца неизученной. В мозге пациента, страдающего БА, этот пептид может образовывать так называемые амилоидные бляшки, сформированные из фибриллярных отложений. Оба пептида могут формировать амилоиды и оба на начальных этапах фибриллообразования агрегируют (ассоциируют) с образованием олигомерных структур [44]. Различные модификации A β пептида, такие как окисление, фосфорилирование, нитрование, рацемизация, изомеризация, пироглутамилирование и гликозилирование, приводят к появлению пептидов с различными физиологическими и патологическими свойствами, которые могут влиять на течение заболевания [45–47].

В процессе фибриллообразования выделяют две стадии: лаг-период, в котором происходит подготовка к росту фибрилл (формирование зародышей и олигомеров разного размера) и сам рост фибрилл. Особое внимание уделяется изучению олигомерных образований, как начальному этапу формирования фибрилл. Этот момент важен для понимания механизма фибриллообразования. Олигомеры представляют собой небольшие мультимеры, еще не обладающие способностью удлиняться с той же скоростью, что и фибриллы. Олигомеры разного размера, начиная с димеров, являются наиболее токсичными промежуточными компонентами на пути формирования фибрилл по сравнению со зрелыми фибриллами [6].

Структурные особенности олигомеров и фибрилл активно изучаются. На скорость формирования как олигомеров, так и фибрилл и их морфологию влияют ионный состав, pH, температура, активация процесса за счет перемешивания препарата и т.д. Так, для A β (1–42) пептида при низкой температуре (4 °C) и ионной силе образуются

пентамерные и гексамерные дисковидные олигомеры 10–15 нм в диаметре, почти не имеющие β -структуры, из которых при дальнейшей инкубации формируются зрелые фибриллы, состоящие из β -листов [48]. Напротив, растворимые глобулярные олигомеры, образующиеся в присутствии алифатических детергентов, содержат смешанные параллельные и антипараллельные β -листовые структуры, отличные от фибрилл [49].

Известно, что образованию фибрилл предшествует возникновение метастабильных олигомеров различного размера [50, 51], в то же время не совсем понятно, какой из образующихся олигомеров может служить ядром для последующего роста фибриллы. Не исключено, что разная морфология фибрилл является следствием сходных, но не идентичных путей формирования зрелых фибрилл. Отличия могут закладываться в начале пути формирования фибрилл, в том числе и на стадии нуклеации. В недавно опубликованной работе [52], посвященной изучению процесса амилоидообразования A β пептида, было показано, что ядром может выступать олигомер, размер которого варьирует от 2 до 3 мономеров. Авторы также продемонстрировали сильную зависимость формы кинетической кривой от условий эксперимента (в частности pH). При этом был определен энергетический барьер для перехода мономер/олигомер в 5 ккал/моль, в то время как для перехода мономер/фибрилла высота барьера составила 12.1 ккал/моль.

Обе изоформы A β пептида способны формировать фибриллы, отличающиеся по морфологии. A β (1–40) пептид в основном формирует фибриллы с параллельной укладкой в виде лент разного диаметра и перекрученности с разным периодом, а также пучки разного диаметра, а A β (1–42) пептид в тех же условиях формирует обычно фибриллы с шероховатой поверхностью, разного диаметра и часто демонстрирует ветвление фибрилл [24, 53, 54]. Показано, что в начальный период формирования фибрилл образуются промежуточные агрегаты пептидов, которые часто имеют округлую форму и диаметр, схожий с диаметром одиночной фибриллы. При большом увеличении на ЭМ изображениях видно, что такие олигомерные комплексы имеют кольцевую структуру. При удлинении времени инкубации препаратов пептидов олигомерные комплексы исчезают и остаются зрелые фибриллы. Их длина увеличивается, а полиморфизм усиливается. Появляются крупные кластеры фибрилл разного диаметра [54–56].

Амилоидным фибриллам свойственен полиморфизм, когда фибриллы приобретают разную морфологию (ленты, жгуты, плёнки, кластеры фибрилл). Полиморфизм амилоидных фибрилл является

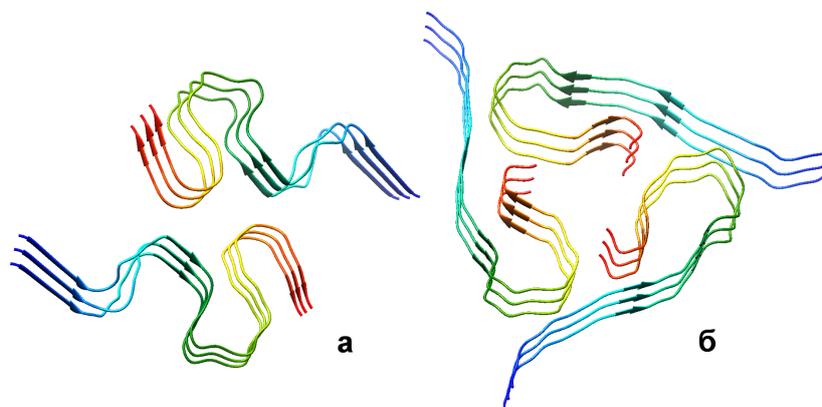


Рис. 2. 3D-структурные модели амилоидных фибрилл, разработанные на основе данных спектроскопии ЯМР твёрдого тела: а) трехмерная структура $A\beta(1-42)$ пептида состоит из двух молекул пептида на слой фибриллы и образует двойную подковообразную структуру из кросс- β листа с погруженными вглубь фибриллы гидрофобными боковыми группами, PDB, 2NAO [57]; б) структура фибриллы $A\beta(1-40)$ пептида, полученная путем инкубации экстракта из головного мозга пациента, страдающего БА, PDB, 2M4J [58].

препятствием для их кристаллизации, в связи с чем, для изучения их структуры применяют другие биофизические методы исследования. Большинство информации о структурной организации фибрилл получено с помощью ЯМР твердого тела, ЭМ, АСМ, крио-ЭМ, рентгеноструктурного анализа, а также с применением теоретических методов исследования, например, таких как молекулярная динамика и молекулярное моделирование. В частности, с помощью метода ЯМР твердого тела получены модели фибриллярных структур $A\beta(1-40)$ и $A\beta(1-42)$ пептидов. Показано, что структура $A\beta(1-42)$ (рис. 2а) [57], имеет значительные отличия от структуры $A\beta(1-40)$ (рис. 2б) [58] поскольку, как считают авторы, удлинение С-конца на два аминокислотных остатка приводит к ускорению процесса фибриллообразования [59].

Вопрос о размере зародышей фибрилл различных белков и пептидов до настоящего времени оставался открытым. При нуклеационном механизме образование фибриллы начинается с термодинамически невыгодных шагов, в результате которых образуется «критический зародыш», состоящий из определенного числа мономеров. Нами предложена кинетическая модель процесса амилоидообразования, позволяющая рассчитывать размер зародыша по полученным кинетическим данным [22–24, 55]. В дополнение к

стадии первичной нуклеации, которая, как полагают, характерна для процесса амилоидообразования, рассмотренные модели включают различные режимы роста агрегата. Режимы роста, следующие за стадией нуклеации, можно разделить на два типа: «линейный» режим роста протофибрилл, где возможное число точек роста (место, куда могут прикрепляться мономеры) пропорционально количеству зародышей, и «экспоненциальный» режим роста, где возможное число точек роста в ходе агрегации может много превышать количество зародышей. Анализ кинетических кривых амилоидообразования показал, что чаще в экспериментах реализуется именно режим экспоненциального роста. Реализация экспоненциального роста в эксперименте может быть различной, но в общем случае все можно свести к трем сценариям – фрагментации, росту с поверхности и бифуркации. В случае фрагментации, количество точек роста увеличивается из-за появления дополнительных концов фибрилл. В случае бифуркации, деформации на поверхности фибриллы могут служить новыми точками роста или же на поверхности растущего агрегата могут образовываться ядра вторичной нуклеации, также служащие новыми точками роста. Случай роста с поверхности является необычным – при таком росте вся поверхность является точкой роста и форма агрегата не будет фибриллярной [22, 23]. Такой рост агрегатов характерен для приона человека [60].

Разработанная нами теория амилоидообразования при наличии соответствующих экспериментальных данных может быть применена для расчета размера ядра (самого нестабильного состояния на пути мономер \rightarrow фибрилла), с которого начинается рост фибриллы [22]. Чтобы оценить размер ядер фибрилл и возможный сценарий, по которому образуются агрегаты, необходимо выполнить ряд кинетических экспериментов, где единственным меняющимся параметром является концентрация мономеров. 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 . Для определения, в каком случае можно говорить о реализации режима линейного роста в эксперименте, а в каком экспоненциального, была введена новая величина – L_{rel}^p относительный лаг-период. Как оказалось, L_{rel} может быть также использован для вычисления размеров ядер первичной и вторичной нуклеации. В работе [22] показано, что зависимости $\ln T_2$ и L_{rel} относительно $\ln[M\Sigma]$ – логарифма исходной концентрации мономеров – носят линейный характер, при этом значения соответствующих коэффициентов наклона для каждой из зависимостей могут быть

использованы для расчета размера ядер фибрилл (в том числе и не амилоидного типа) и определения механизма, по которому образуется агрегат. В то же время проведенный анализ показал, что не все результаты кинетических экспериментов могут быть однозначно интерпретированы для определения механизма агрегации. В таких случаях следует использовать прямые экспериментальные методы (ЭМ, рентгеноструктурный анализ), с помощью которых можно однозначно определить механизм фибриллообразования. В то же время характер изменения величин L_{rel} , T_{lag} , T_2 позволяет сузить круг возможных механизмов в таких неопределенных случаях.

Изучение амилоидных структур в процессе их формирования было проведено как для синтетических, так и рекомбинантных препаратов Аβ(1–40) и Аβ(1–42) [20, 21, 54, 61, 62]. Используя кинетические данные, полученные в лаборатории Добсона [20, 21], нами впервые были определены размеры ядер нуклеации амилоидных фибрилл для Аβ(1–40) и Аβ(1–42) [24]. Стоит отметить, что размеры ядер (как первичной, так и вторичной нуклеации) для агрегатов Аβ(1–42) пептида оказались больше, чем для агрегатов Аβ(1–40) пептида. Было показано, что размер первичного ядра нуклеации для фибрилл Аβ(1–42) соответствует 3 мономерам, а размер вторичного ядра для этого пептида составляет 2 мономера. Аналогичным образом определено, что размер первичного ядра Аβ(1–40) составляет 2 мономера, а размер вторичного ядра – один мономер. Знание размера зародыша для процесса фибриллообразования необходимо для приостановления дальнейшего роста фибриллы и поиска нового типа препаратов для предотвращения появления неправильно свернутых форм белков [63].

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ АМИЛОИДООБРАЗОВАНИЯ Аβ ПЕПТИДОМ

С 1960-х годов начались интенсивные исследования с помощью электронной микроскопии различных амилоидных отложений, локализованных в различных органах (печени, селезенке, сердце, коже и мозге) [64–73]. Постепенно из совокупности данных электронно-микроскопического (ЭМ) анализа и рентгеноструктурного анализа сложилось представление о структурной организации амилоидных фибрилл. Согласно данным Кити и Добсона [19], амилоидные фибриллы имеют средний диаметр около 10 нм, а их длина может достигать до 15 мкм. Фибрилла может состоять из 2–6 филаментов и иметь разную морфологию. Фибриллы могут ассоциировать латерально в ленты, пучки, перекручиваться с разным периодом. Амилоидные структуры при рентгеноструктурном анализе показывают наличие кросс-β структуры, для которой характерно построение фибрилл

из β -листов, проходящих параллельно вдоль всей оси фибриллы. Сам β -лист построен из β -тяжей, проходящих перпендикулярно оси фибриллы [17, 18, 74]. Такая интерпретация структурной организации фибрилл господствует в литературе. До сегодняшнего дня происходит уточнение такой интерпретации молекулярного строения амилоидных фибрилл для различных белков/пептидов [57, 58]. Однако, существуют и другие представления о структурной организации амилоидных фибрилл. В работе [75] на основании рентгеноструктурного анализа на малых углах предполагается, что фибрилла может быть построена из тубулярных цилиндров.

Олигомеры являются неизменным участником процесса фибриллообразования. Во многих работах, где применяется для анализа амилоидообразования метод ЭМ, на изображениях можно заметить (даже если о них не идет речь в статьях) присутствие кольцевых олигомерных частиц диаметром около 10 нм [76, 77]. Но если авторы и обращают на них внимание, то редко описывают способ формирования фибрилл посредством ассоциации именно олигомерных частиц в протяженные полимеры. В работе [78] приведен пример использования метода ЭМ для исследования процесса фибрилlogenеза на примере A β (1–42) пептида где показано, что процесс формирования фибрилл происходит через ассоциацию олигомерных частиц, имеющих диаметр зрелой фибриллы. В работе [79] даже предложен новый механизм формирования фибрилл α -синуклеина, согласно которому фибрилла формируется посредством ассоциации образовавшихся олигомерных гранул, которые являются строительной единицей фибриллы (a double-concerted fibrillation model). Сборка фибрилл из олигомеров была продемонстрирована и для лизоцима [80]. На ЭМ и АСМ изображениях из работ различных авторов можно заметить округлые олигомеры приблизительно одного диаметра с тонкими одиночными фибриллами, при этом олигомерные частицы часто имеют полость внутри, т.е. являются кольцевыми [77, 81]. Предложен ряд схем сборки амилоидных фибрилл для амилоидных белков, в которых формирование фибрилл происходит за счет взаимодействия разным способом олигомерных частиц [82–85]. Наш опыт работы с различными амилоидогенными белками (инсулин, A β пептиды и их фрагменты, амилоидогенные фрагменты белка Bgl2) показывает, что в начале формирования фибрилл наблюдается большое количество олигомерных кольцевых структур и незначительное количество коротких тонких фибрилл с диаметром, сопоставимым с диаметром олигомеров [24, 54, 56, 86–88]. С увеличением времени инкубации происходит уменьшение количества олигомерных частиц, удлинение фибрилл до нескольких мкм и появление фибрилл различной мор-

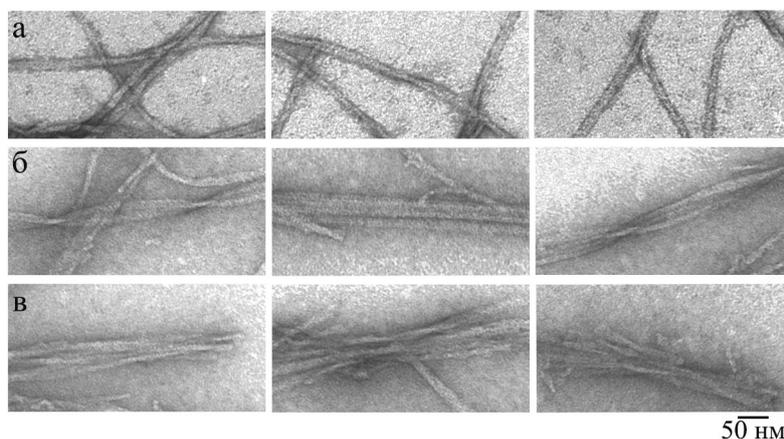


Рис. 3. ЭМ изображения полиморфных форм фибрилл рекомбинантного A β (1–40) пептида (0,2 мг/мл, 27 часов инкубация при 25 °С, 50 мМ Tris-HCl, рН 7,5). (а) – одиночные фибриллы; (б) – фибриллы в виде лент; (в) – фибриллы в виде пучков.

фологии. При достаточном увеличении на ЭМ изображениях можно заметить, что фибриллы построены из кольцевых олигомеров, которые ассоциированы различным образом, что и является причиной полиморфизма фибрилл в одних и тех же условиях (рис. 3). Несмотря на разный аминокислотный состав пептидов, средний диаметр кольцевого олигомера около 10 нм (сходный с диаметром зрелых фибрилл). При этом, нам представляется, что у каждого пептида есть особенности при формировании олигомера. Могут изменяться наружный и внутренний диаметры кольца, его высота, а также количество и способ укладки молекул пептида в олигомерах [54, 56, 62, 87, 88]. Для правильной интерпретации полученных экспериментальных данных, кроме ЭМ методов, становится очевидным усиление роли метода рентгеноструктурного анализа (способ приготовления препаратов и правильная интерпретация полученных картин дифракции), ЯМР твердого состояния, а для окончательной интерпретации результатов привлечение биоинформатических методов исследования.

Суммирование теоретических и экспериментальных результатов позволило нам предложить новую модель структурной организации амилоидных фибрилл и механизм фибриллообразования. Модель предполагает, что формирование фибрилл происходит по следующей упрощенной схеме: мономер \rightarrow кольцевой олигомер \rightarrow зрелая фибрилла, построенная из кольцевых олигомеров, как основных строительных блоков (рис. 4) [24, 54, 56, 86].

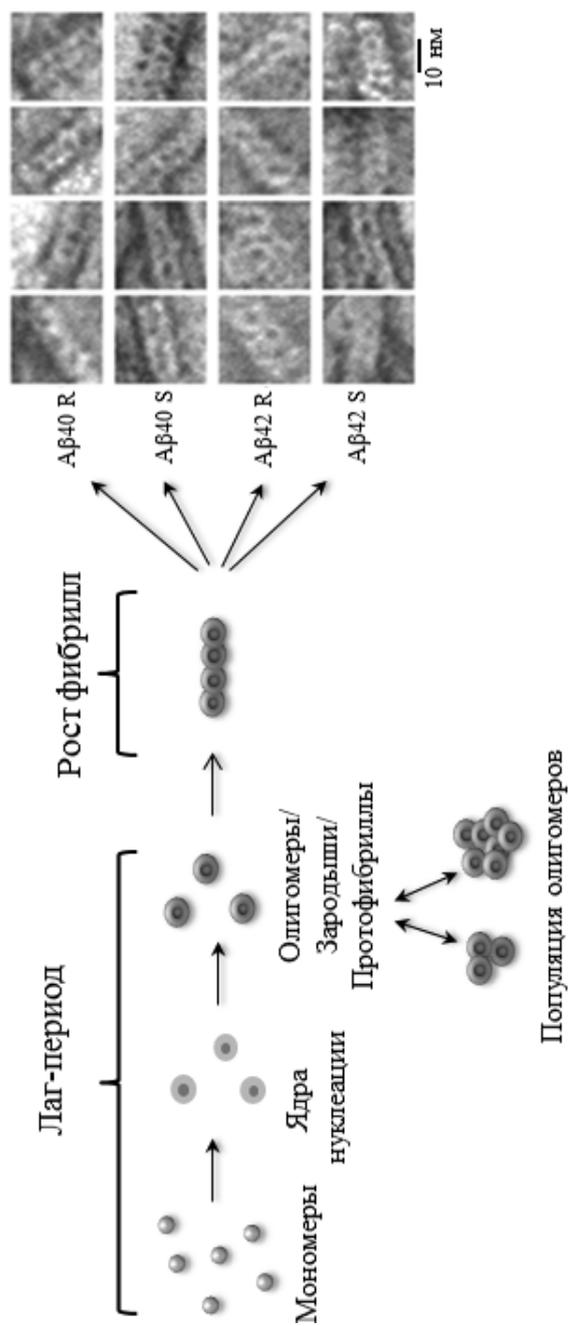


Рис. 4. Схематическое изображение процесса фибриллообразования.

Строительным блоком для сборки фибрилл является кольцевой олигомер. Кольцевые олигомеры взаимодействуют друг с другом бок-о-бок, слегка перекрывая друг друга. Процесс формирования фибрилл одинаков для Aβ(1–40) и Aβ(1–42) пептидов. (R – рекомбинантные, S – синтетические пептиды) [54, 143].

IV. ТОКСИЧНОСТЬ ФИБРИЛЛ И ОЛИГОМЕРОВ, ОБРАЗОВАННЫХ Аβ ПЕПТИДОМ

Считается, что нерастворимые фибриллярные агрегаты Аβ пептида, обнаруженные в сенильных бляшках, вызывают нейродегенеративные процессы при БА. Однако, не наблюдается четкой корреляции между количеством, размером амилоидных бляшек и тяжестью нарушения памяти или клеточной дисфункцией [89]. Накопленные данные свидетельствуют о том, что предфибриллярные растворимые олигомеры Аβ пептида индуцируют синаптическую дисфункцию [90, 91]. В литературе встречаются данные о том, что размер олигомеров Аβ пептида распределен в широком диапазоне молекулярных масс (от 10 кДа до 100 кДа), а также отмечается структурный полиморфизм олигомеров Аβ пептидов [92]. Исследования показали, что Аβ пептид может накапливаться как внутри клетки, так и вне её [93, 94]. Однако, не смотря на многочисленные опубликованные данные, подтверждающие критическую роль олигомеров Аβ в синаптической дисфункции и гибели клеток, точные механизмы токсического действия амилоидных олигомеров все еще остаются неясными [95].

Аβ пептиды могут оказывать негативное воздействие на нейроны и другие типы клеток головного мозга. Известно, что Аβ пептид в процессе самоагрегации способствует выработке реактивных форм кислорода. Агрегация Аβ пептидов на мембране нейронов вызывает перекисное окисление липидов и образование токсичного альдегида, называемого 4-гидроксинонenal, который, в свою очередь, ослабляет функцию АТФ-зависимых ионных каналов, транспортеров глюкозы и глутамата. В результате, Аβ пептид способствует деполяризации синаптической мембраны, избыточному притоку кальция и нарушению структуры митохондрий [96].

Как высокотоксичный пептид, олигомерный Аβ пептид непосредственно стимулирует апоптоз нейронов путем взаимодействия с рецепторами клеточной поверхности. Более того, длительное накопление токсичных видов Аβ пептида в паренхиме также приводит к окислительному повреждению ДНК и белков, к физическому повреждению клеточных органелл и нарушению уровня внутриклеточного кальция. Каждый из этих факторов может спровоцировать гибель клеток [97].

Недостаточность аутофагии и других путей контроля качества белков способствует дисфункции нейронов и клеток глии. Активация и пролиферация глиальных клеток способствуют воспалению. Несколько процессов могут влиять на ГАМК-ергическую сигнализацию и способствовать потере тормозного тонуса [95].

Ранее высказывалось предположение, что растворимые олигомеры A β пептида являются основной причиной синаптической дисфункции и потери памяти при БА. Для уточнения этого вопроса была проанализирована нейротоксичность различных изоформ A β пептида на культуре клеток РС12 [98]. Результаты показали, что A β (1–42) пептид может образовывать олигомеры значительно быстрее, чем A β (1–40) пептид, а A β (1–42) и A β (1–43) изоформы пептида проявляют наибольший уровень нейротоксичности. В целом, эти данные демонстрируют высокую патогенность A β (1–42) пептида среди трех изоформ A β пептида и подтверждают идею о том, что олигомеры A β (1–42) пептида участвуют в патологических процессах, ведущих к нейродегенерации при БА.

Кроме того, на основании данных ЭМ и АСМ делается предположение, что олигомерные частицы, имеющие кольцевую морфологию, могут формировать поро-подобные структуры (annular pores) на поверхности клеток (membrane pores). Это может приводить к перфорации клеточной мембраны и нарушению клеточного метаболизма, влекущего гибель клеток [81, 99].

ВОЗМОЖНАЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ A β ПЕПТИДА

A β пептид чаще всего характеризуют как продукт процессинга APP, точная функциональная роль которого до конца не изучена. Однако было показано, что A β пептид является специфическим лигандом для ряда различных рецепторов и молекул, активирующихся в ответ на экзогенные стрессовые факторы и способным индуцировать воспалительные процессы. Было обнаружено, что A β пептиды обладают поразительным сходством с пептидом LL-37 семейства кателицидинов. Данный пептид склонен к образованию цитотоксических растворимых олигомеров и нерастворимых фибрилл, а также к окрашиванию конго красным, что принято считать признаком, свойственным амилоидным фибриллам. Пептид LL-37 является антимикробным пептидом (АМП) – компонентом врожденной иммунной системы человека. В связи со сходством A β и LL-37 пептидов была исследована потенциальная противомикробная активность A β (1–42) и A β (1–40) пептидов. Оказалось, что эти пептиды подавляют рост восьми из 12 исследованных и клинически значимых микроорганизмов, таких как *C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus* и др. Минимальная ингибирующая концентрация A β пептидов сравнима, а в некоторых случаях превышает таковую для LL-37 пептида. Гомогенаты тканей лобных долей головного мозга больных БА также подавляли рост микроорганизмов. Антимикробная активность образцов тканей может быть снижена при

инактивации пептидов анти-Аβ-антителами, что также соответствует предположению об Аβ-опосредованной антимикробной активности [100]. Можно предположить, что Аβ пептиды являются АМП и играют важную роль в неспецифическом иммунном ответе в тканях головного мозга. При этом болезнь Альцгеймера может быть следствием нарушения регуляции процессинга APP, продуцированием Аβ пептида и увеличением соотношения Аβ(1–40)/Аβ(1–42).

V. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ Аβ ПЕПТИДА С ДРУГИМИ МОЛЕКУЛАМИ

ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ШАПЕРОНОВ НА АМИЛОИДОГЕНЕЗ Аβ ПЕПТИДА

Шапероны – ремоделирующие белки, которые участвуют во множестве внутриклеточных процессов и вовлечены в коррекцию структуры белков, предотвращение их агрегации, разрушение белковых агрегатов, а также разворачивание нативных белков-мишеней для транслокации их через мембрану. Кроме того, шапероны участвуют как в разборке активных олигомерных структур до состояния неактивных развернутых мономеров для их последующей протеолитической деградации, так и в формировании специфических комплексов и белковых ансамблей. Шапероны относятся к семейству белков теплового шока (heat shock proteins (hsp)), синтез которых в клетке значительно увеличивается в ответ на тепловой шок или другие виды клеточных стрессов. Вместе с тем и в отсутствии стрессовых воздействий большинство белков этого семейства синтезируется довольно интенсивно.

Различные молекулярные шапероны взаимодействуют с белками, склонными к агрегации, и частично контролируют или предотвращают накопление белковых агрегатов в клетках. Молекулярные шапероны бактериального происхождения также способны взаимодействовать с фибриллогенными белками.

GroEL *E. coli* является наиболее изученным представителем семейства шаперонинов, обеспечивающих правильное сворачивание частично развернутых белков. GroEL функционирует в комплексе с кошаперонином GroES. GroEL состоит из двух кольцевых структур, каждая из которых построена из 7-ми мономерных субъединиц. Каждая субъединица гептамерного «кольца» GroEL (57 кДа) состоит из трех доменов: апикального («верхушечного», Ap), содержащего общий центр связывания с ненативными белками и кошаперонином GroES; шарнирного промежуточного домена (In) и C-концевого экваториального домена (Eq), несущего АТФ-азный

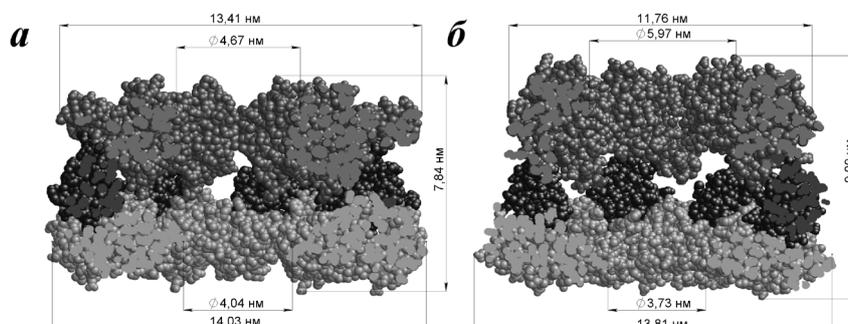


Рис. 5. Модель и линейные размеры гептамерного комплекса GroEL (вертикальный срез).

а – открытая конформация (без GroES), PDB 4AAQ [101];

б – закрытая конформация (ассоциирован с GroES), PDB 3WVL [102].

На рисунках обозначены экваториальный домен (1–136, 410–525 а.о., светло-серый), апикальный (191–370 а.о., темно-серый) и промежуточный домен (137–190, 371–409 а.о., чёрный).

центр (рис. 5). Экваториальные домены обеспечивают основную часть межсубъединичных контактов как внутри гептамерного кольца, так и между кольцами шаперона. Взаимодействие экваториальных доменов двух колец GroEL приводит к образованию зеркально симметричного тороида с двумя изолированными гидрофобными полостями (транс-состояние колец), входные отверстия которых сформированы апикальными доменами (диаметр полости – около 45 Å) [101]. Субъединицы кошаперонина GroES (10 кДа) также образуют циклический гептамерный куполообразный комплекс, способный прикрывать один из торцов тороида GroEL. Взаимодействие шаперонина GroEL с GroES приводит к значительным конформационным изменениям шаперонина, увеличению размеров полости до 60 Å и ее гидрофилизации (цис-состояние кольца) (рис. 5) [102]. Существует два представления о работе комплекса GroEL: 1) заходя в полость, пептид/белок не может агрегировать и приобретает нативную конформацию [103]; 2) пептид/белок не заходит в полость, а взаимодействует с внешней частью комплекса [104].

Исследования взаимодействия субстрата GroEL с A β пептидом в качестве модельного лиганда методом ЯМР показали, что GroEL может подавлять образование амилоида A β (1–40), взаимодействуя с его двумя гидрофобными сегментами Leu17–Ala21 и Ala30–Val36, которые содержат ключевые для фибриллогенеза остатки аминокислот. Также методом ЯМР был идентифицирован на молекуле минишаперона GroEL (апикальный домен с 193 по 375 а.о.) сайт

связывания с A β (1–40) пептидом. Он включает две α -спирали, H и I, расположенные в апикальном домене [105].

Обнаружено, что изолированный апикальный домен субъединицы комплекса GroEL *E. coli* также демонстрирует способность подавлять необратимую фибрилляцию многочисленных амилоидообразующих полипептидов, в том числе A β (1–40) пептида и α -синуклеина. Было показано, что аффинность GroEL в отношении фибриллогенных полипептидов растёт в соответствии с увеличением поверхности для Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий заместителя боковой цепи [106]. Наиболее эффективным супрессором фибриллообразования по сравнению с GroEL дикого фенотипа оказался мутантный белок с заменой Gly192Trp, то есть с наиболее объёмным заместителем. Объясняется это тем, что присутствие боковых цепей более громоздкой аминокислоты приводит к наклону апикального домена, в результате чего гидрофобные участки открываются для взаимодействия с развернутым полипептидом [106]. Эти данные косвенно свидетельствуют о том, что взаимодействие с лигандами может происходить на поверхности комплекса и ставят под сомнение необходимость попадания пептида во внутреннюю полость GroEL комплекса.

Кристаллины – белки, формирующие структуру хрусталика глаза. α A-кристаллин (α A) и α B-кристаллин (α B) являются малыми молекулярными шаперонами, необходимыми для поддержания квазикристаллической структуры и прозрачности хрусталика [107]. В хрусталике глаза они существуют в виде α AB-комплекса при соотношении α A/ α B – 3/1. При БА обнаруживается повышенный уровень α -кристаллинов в олигодендроцитах, астроцитах лобной и височных долях головного мозга больных БА.

Уровень α B-кристаллина повышается в ответ на множество стрессовых стимулов, его удаётся идентифицировать совместно с β -амилоидными фибриллами во внеклеточных бляшках, характерных для БА. Проводились исследования способности α B-кристаллина взаимодействовать с амилоидными фибриллами *in vitro*. Обнаружено, что α B-кристаллин связывается с фибриллами A β (1–42) пептида дикого типа с микромолярной аффинностью, а также он связывается с фибриллами, образованными из мутантного A β (1–42), с заменой E22G. Иммуноэлектронная микроскопия подтверждает, что связывание происходит по всей длине. Исследования влияния α B-кристаллина на затравки растущих фибрилл A β пептида в растворе показали, что связывание α B-кристаллина с затравочными фибриллами сильно ингибирует их элонгацию [108].

Также проводились исследования на клеточных культурах PC12. Делалась попытка ответить на вопрос, ингибирует ли α V-кристаллин образование фибрилл A β (1–40) пептида и, влияет ли это на токсичность A β пептида. С этой целью индуцировали фибриллообразование A β (1–40) пептида и обработали таким препаратом клетки PC12 для оценки их жизнеспособности. Как и ожидалось, зрелые фибриллы и более мелкие олигомеры были более токсичны для клеток культуры по сравнению с неиндуцированным A β (1–40) пептидом. В то же время α V-кристаллин полностью ингибировал образование фибрилл A β (1–40) пептида при молярном соотношении 1 : 100 (α V-кристаллин/A β (1–40)), что доказано ослаблением флуоресценции ThT и отсутствием фибрилл на изображениях, полученных методом ЭМ. Когда образцы A β (1–40) пептида, инкубированные с α V-кристаллином, добавляли к клеткам PC12, наблюдалось значимое повышение выживаемости клеток [109].

Недавно был обнаружен новый класс шапероноподобных амилоидо-связывающих белков (ШАСБ), который препятствует агрегации белков и пептидов. Было обнаружено, что один из таких белков – кальций-связывающий белок нуклеобиндин-1 (NUCB1) является новым ШАСБ. Было показано, что NUCB1 ингибирует агрегацию амилина, ассоциированного с сахарным диабетом 2 типа, альфа-синуклеина, связанного с болезнью Паркинсона, мутанта транстиретина Val30Met, связанного с наследственной амилоидной полинейропатией, и A β (1–42) пептида, посредством стабилизации их соответствующих промежуточных продуктов (протофибрилл). Было сделано предположение, что NUCB1 связывается с кросс- β структурой агрегатов протофибрилл и стабилизирует растворимые макромолекулярные комплексы через их «кэпирование». Интересно, что NUCB1 предотвращал токсичность протофибрилл A β (1–42) пептида на клеточных культурах. Авторы считают, что NUCB1-стабилизированные амилоидные протофибриллы могут быть использованы в качестве иммуногенов для получения конформационно-специфических антител и в качестве новых инструментов для создания анти-протофибрилльной диагностики и терапии [110].

Ранее была охарактеризована структура комплекса A β (1–40) пептида и нейропептидом лейцин-энкефалином. Было показано, что лейцин-энкефалин может быть потенциальной основой для разработки пептид-связывающих биотерапевтических средств лечения болезни Альцгеймера [111]. Для анализа комплексообразования *in vitro* были проведены замены аминокислотных остатков. Для A β пептида это остатки Asp1, Glu3, Phe4, Arg5, His6, Tyr10, Glu11, His13, His14, Gln15,

K16, Glu22, Lys28 и Val40. Масс-спектрометрические измерения ионной подвижности и моделирование с помощью молекулярной динамики показали, что гидрофобный С-конец лейцин-энкефалина (Phe–Leu) имеет решающее значение для формирования пептидных комплексов. Авторы считают, что Phe–Leu преимущественно связывается с олигомерами Аβ пептида и прикрепляется к Аβ пептиду наиболее специфично по остаткам Tyr10 и Gln15 в области между N-концом и его гидрофобным ядром. Кроме того, было показано, что гидрофобный С-конец лейцин-энкефалина способен предотвратить образование фибрилл [111].

Также стоит отметить 24-аминокислотный пептид хуманин (humanin (HN)), который был предложен в качестве ингибитора на основе пептидов, способных взаимодействовать непосредственно с олигомерами Аβ пептида и мешать формированию токсичных образцов Аβ пептида. Исследования *in vivo* показали, что как HN, так и его мутант HNG (пептид с заменой Ser14Gly) уменьшали относительное количество предфибриллярных олигомеров и тем самым понижали уровень токсичности сходным образом. Эти результаты дают информацию о механизмах, лежащих в основе антиолигомерных эффектов HN и HNG [112].

ДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ
(ДОФАМИН, L-ДОФА, НОРАДРЕНАЛИН, АДРЕНАЛИН)
НА ФИБРИЛЛОГЕНЕЗ Аβ ПЕПТИДА

Катехоламины (дофамин, L-допа, адреналин) ингибируют образование фибрилл Аβ пептидом. Используя анализ данных флуоресцентной спектроскопии, ЭМ и АСМ, были получены следующие данные: микромолярные концентрации дофамина, L-ДОФА, норадреналина и адреналина *in vitro* ингибируют в зависимости от дозы образование амилоидных фибрилл Аβ пептидом и α-синуклеином, а также дезагрегируют уже сформированные фибриллы. Для подтверждения индуцированной дофамином разборки фибрилл использовался метод светорассеяния. Присутствие дофамина вызывало значительное уменьшение рассеяния. Аналогичным образом наблюдалось ослабление флуоресценции ThT. Прямое подтверждение дезагрегирования фибрилл было получено с помощью методов АСМ и ЭМ, которые показали отсутствие на изображениях фибрилл в присутствии катехоламинов [113].

VI. ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ ПРИ ИНТЕРПРЕТАЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ ДЛЯ РАЗЛИЧНЫХ АМИЛОИДОГЕННЫХ БЕЛКОВ

Интерпретация полученных экспериментальных данных – это большая ответственность, и от того, как эти данные будут первоначально интерпретированы, зависят многие последующие заключения.

Впервые, с помощью рентгеноструктурного анализа, кросс- β структура амилоидных образований («pleated-sheet») была выявлена при исследовании поврежденных амилоидозами тканей печени и селезенки в 1968 г. [114]. С этого времени метод рентгеноструктурного анализа наряду с прямой визуализацией амилоидов с помощью ЭМ, взаимодействием с ThT, двойным лучепреломлением при взаимодействии с конго красным, становится одним из основных при исследовании амилоидных структур. С помощью рентгеноструктурного анализа было показано, что наличие кросс- β структуры является общей характеристикой амилоидов [17, 18, 74]. Кросс- β структура предполагает, что фибриллы представляют собой структуры, в которых происходит организация полипептидной цепи таким образом, что формируются β -слои, идущие параллельно длинной оси фибриллы на расстоянии около 10 Å друг от друга. Такие β -слои сформированы из β -участков, расположенных друг относительно друга на расстоянии около 4,7 Å и идущих перпендикулярно длинной оси фибриллы. С момента расшифровки аминокислотной последовательности (а.п.) первых амилоидогенных пептидов и белков [115, 116] начинается определение индивидуальных амилоидогенных белков, их интенсивное исследование и поиск механизмов формирования фибрилл. Это привело к появлению ряда моделей укладки β -листов в фибрилле, а также к появлению множества моделей формирования фибрилл (рис. 2) [57, 117–123]. При этом для каждого объекта исследований (инсулина, A β пептида и его различных фрагментов, и т.д.) можно найти различные модели формирования фибрилл. Есть представление о том, что фибриллы могут формироваться из разного количества филаментов (от 2-х до 6-ти), могут ассоциировать друг с другом латерально с формированием лент разной ширины, могут перекручиваться и формировать жгуты разного диаметра и периода или ассоциировать с формированием пучков. Склонность амилоидных фибрилл к полиморфизму является общей для всех изученных амилоидов. При этом полиморфизм наблюдается не только при изменении условий формирования фибрилл (рН, ионная сила, температура), но и при одних и тех же условиях. Для всех амилоидных фибрилл отмечается то, что средний диаметр самых тонких полимеров

составляет около 10 нм, а длина может доходить до нескольких мкм [19]. Возникает вопрос, как при разной а.п. и предложенных разных способах формирования третичной структуры в амилоидах сохраняется общая для них кросс- β структура и сохраняются в среднем одинаковые параметры фибрилл? Кроме того, принимая во внимание, что по упрощенной схеме формирование фибрилл происходит следующим образом: дестабилизированный мономер – олигомер – зрелая фибрилла, – основным непонятным моментом во всех схемах является переход от олигомеров, часто имеющих кольцевую структуру, к фибриллам.

После того, как в области исследования амилоидных белков закрепилась модель вытянутых протофибрилл, закрученных вдоль оси фибриллы, большая часть моделей следовала именно такой интерпретации структурной организации фибрилл. Однако накопившиеся экспериментальные данные указывали и на другие возможные варианты.

Изучая процесс полимеризации инсулина ещё в 1940-е годы, Вог (Waugh) обнаружил, что данный процесс может быть обратимым, так как при разборке инсулиновых фибрилл сохранялась биологическая активность и возможность получения кристаллов инсулина [124]. Принимая во внимание обратимость процесса, он предположил, что фибриллы строятся из глобулярных, и лишь слегка деформированных молекул инсулина [125].

Однако, на основе измерений инфракрасного дихроизма, Эллиотт и соавторы (1951 г.) пришли к выводу, что фибриллы инсулина состоят из полипептидных цепей в β -структурной конформации и располагаются поперек оси фибрилл [126].

Тем не менее, Колтун и др. (1954 г.) на основе анализа рентгеновской дифракции подтвердили предположение о присутствии в фибриллах инсулина почти не измененных структурно мономеров этого белка, т.е., инсулина в глобулярной конформации [127]. Данный анализ был поддержан также Рейтелем (1963 г.) в обзоре об ассоциации белков [128] и затем рядом других авторов [129].

Далее, изучая фибриллообразование инсулина, Бурке и Ружви в 1972 году посчитали, что Колтун и др. (1954 г.) при дифракции на малых углах получили для инсулина ошибочный 48 Å-ый меридиональный рефлекс [130]. Однако, позже, близкий меридиональный рефлекс (53 Å) был получен в работе Киршнера (1993 г.) для $A\beta(1-40)$ пептида [14]. Киршнер с соавторами дали разъяснение этому рефлексу: либо этот рефлекс отображает повтор объекта вдоль оси фибриллы, либо повтор при закрутке спирали (периодичность). Следует отметить,

что в последующих работах этому рефлексу не уделялось должного внимания, хотя данный рефлекс может свидетельствовать о повторе каких-то олигомерных частиц вдоль оси фибриллы.

Стоит ещё раз отметить, что в ряде работ по исследованию инсулина предполагается, что способ формирования фибрилл данного белка/пептида на молекулярном уровне может значительно отличаться от структуры амилоидных фибрилл ряда других фибриллярных [131] и синтетических полипептидов [13]. Например, полипептидные цепи могут быть уложены в плоскостях, параллельных оси фибрилл и формируют бета-листы, которые располагаются перпендикулярно оси фибриллы. Тогда рефлекс 9.6 Å может быть как меридиональным, так и экваториальным. Из этого следует, что рентгеноструктурные данные могут быть неоднозначными и требуется более точная их интерпретация. Недавно были получены данные о том, что в амилоидных фибриллах белок транстеритин упакован в нативной конформации [132].

Ещё в 1980-е годы метод рентгеноструктурного анализа широко использовался для изучения амилоидных фибрилл. Были получены рентгенограммы для ряда белков и пептидов, на которых кроме основных рефлексов наблюдалось большое количество дополнительных. Были предприняты попытки интерпретировать все наблюдаемые рефлексы. Однако, при построении модели амилоидных фибрилл интерпретация проводилась с учётом общепринятого представления о структуре фибрилл, построенных из длинных закрученных филаментов, а не с точки зрения другой возможной модели.

Долгое время шла дискуссия вокруг возможности A β (1–40) пептида служить затравкой для роста фибрилл A β (1–42) пептида и наоборот [133]. Ранее было опубликовано много экспериментальных работ, но только в 2017 году в этом вопросе была поставлена точка [134]. Авторы работы показали, что в роли затравки могут выступать как A β (1–40), так и A β (1–42) пептид. Это говорит в пользу того, что строительный блок для построения фибрилл этих изоформ A β пептида структурно похож, а не различается, как это было отмечено в ряде работ [122, 135, 136].

VIII. ДАННЫЕ ПРОШЛЫХ ЛЕТ, НА КОТОРЫЕ СЛЕДУЕТ ОБРАТИТЬ ВНИМАНИЕ

В данном разделе мы посмотрим на ряд уже исторических данных и противоречий, которые возникали при исследовании амилоидных структур и которые в настоящее время все еще до конца не имеют однозначной интерпретации. Еще в 1935 году при рентгеноструктурном анализе фибриллярных белков, таких как фиброин, β -кератин, β -миозин, фибрин, а также фибрилл из глобулярного денатурированного белка альбумина, были получены сходные картины дифракции рентгеновских лучей [13]. Авторами был сделан вывод о едином принципе организации этих белков в фибриллах на молекулярном уровне. Согласно данным рентгеноструктурного анализа для фибриллярных белков и глобулярного денатурированного белка (яичного альбумина) наблюдались характерные два рефлекса 9,8 и 4,65 Å. Однако отмечалось, что если для фибриллярных белков рефлекс 9,8 Å («side-chain spacing») является меридиональным, а 4,65 Å («backbone spacing») экваториальным, то для альбумина, наоборот. И, соответственно, даются две интерпретации формирования фибрилл на молекулярном уровне. В современных терминах для денатурированного альбумина в фибрилле расстояние между цепями 4,65 Å (β -тяжами) и расстояние между слоями – 9,8 Å (между β -листами). Именно последняя интерпретация в настоящий момент является общепринятой для объяснения структуры фибрилл амилоидных белков/пептидов. До появления термина «кросс- β структура» существовало понятие «pleated sheet» («складчатый лист») и «rippled sheet» («рифленый лист»). В таких терминах описывалась конфигурация полипептидных цепей в фибриллярной структуре [137]. Для амилоидных структур сохранился только термин «pleated sheet». Впервые термин «кросс- β структура» появляется в 1968 г. [114]. При исследовании амилоидных структур из тканей печени и селезенки человека и экспериментальных животных с помощью рентгеноструктурного анализа хорошо ориентированных образцов были получены характерные рефлексы меридиональный 4,75 Å и экваториальный 9,8 Å, которые расположены перпендикулярно друг другу (кросс-расположение).

Изобретение электронного микроскопа и его совершенствование дало возможность проводить электронно-микроскопические исследования амилоидных образований в различных тканях. Начиная с конца 1950-х и начала 1960-х годов были проведены сначала исследования срезов тканей различных органов (селезенки, печени, почек, кожи) [64–67], а затем и экстрактов амилоидов из этих же органов [68–73,

138]. Уже в 1959 г был сделан вывод, что морфология амилоидов из разных органов сходна. Длина фибрилл составляет около 1,2–1,6 мкм, а диаметр 50–120 Å [64]. В 1963 г. Гуетт (Guept) и Жидони (Ghidoni) по данным ЭМ анализа тканей заключили, что фибриллы состоят из двух филаментов шириной около 2,5 нм и расстоянием между филаментами около 2,5 нм [65]. Общая ширина фибриллы, т.о., составляла 7,5 нм. Далее появляется одна из первых работ, где кроме исследования с помощью ЭМ-пии срезов тканей, проводились исследования изолированных амилоидов с применением метода негативного контрастирования [69]. Делается вывод о схожести структуры амилоидов в тканях и препаратах изолированных амилоидов. При этом хорошо видно, что фибриллы построены из структур, которые авторы интерпретировали как пончиково-подобные («doughnut») или кольцевые. Диаметр таких структур около 10 нм. Причем такой диаметр совпадает с диаметром «нативных» (в тканях) фибрилл. При большем увеличении видно, что кольцевая структура состоит из 5 субъединиц, такие кольца объединяются попарно (высота пары 40 Å) и, укладываясь друг на друга в стопки, формируют стержне-подобные фибриллы. То есть, из этих данных следует, что основным элементом фибриллы является кольцевая структура.

Аналогичные работы в это же время проводили Ширахама и Коган [71]. Авторы применили другой, чем Бендигт и Эриксен [69] способ изоляции фибрилл из амилоидных образований печени и селезенки. В работе изучалась морфология как срезов тканей, так и изолированных из них фибрилл. Согласно их данным, фибриллы в поврежденных амилоидозами тканях состоят из двух и более филаментов. Филамент имеет диаметр около 75–80 Å в диаметре и длину до 1,5 мкм. На срезах тканей заметны олигомерные структуры того же диаметра, которые интерпретируются как продольные срезы филаментов. При этом замечено, что на срезе филамент выглядит как кольцевая структура, состоящая из 5-ти глобулярных частиц (пентагон), диаметром около 25–35 Å, а центральная полость кольца также имеет диаметр около 25–35 Å. Фибриллы со схожей морфологией и параметрами наблюдаются и при исследовании негативно окрашенных препаратов изолированных фибрилл. При этом делается одна из первых попыток описать морфологию (структуру) фибрилл на уровне филаментов и протофибрилл. Филамент (самые тонкие фибриллярные образования) формируется из 5-ти протофибрилл, ассоциированных друг с другом латерально вдоль длинной оси филамента, так что на срезе формируется пентагональная структура с пустой серединой. То есть, структура амилоидных фибрилл сильно отличается от таковой в

статье [69]. При этом авторы высказывают сомнения в интерпретации построения фибрилл из кольцевых пончиково-подобных структур («doughnut») [69], поскольку они не наблюдали такие структуры на своих снимках. Было выдвинуто предположение, что применение разных способов выделения фибрилл из амилоидогенных тканей может привести к получению различных препаратов. Тем не менее, при внимательном рассмотрении изображений негативно контрастированных препаратов изолированных амилоидов, можно рассмотреть отдельные лежащие кольцевые структуры с диаметром, сопоставимым с самыми тонкими фибриллами (около 10 нм).

Следует отметить, что после работы Ширахамы (1967 г.) [71] появилась статья Гленнера [138], в которой воспроизведены два способа изоляции амилоидных фибрилл из поврежденных тканей печени, селезенки и почек; и в зависимости от способа выделения выявляются либо кольцевые олигомеры и построенные из них стержне-подобные структуры, как у Бендитт (1966 г.) [69], либо вытянутые амилоидные фибриллы, описанные Ширахамы (1967 г.). После данной работы основное внимание стало уделяться амилоидным фибриллам, построенным из протофиламентов, проходящим по всей длине фибриллы. По нашему мнению, сделанная авторами интерпретация ЭМ данных построения фибрилл/филаментов из ряда латерально ассоциированных протофибрилл, могла происходить из интерпретации ранних работ по рентгеноструктурному анализу фибриллярных структур, согласно которым амилоиды имеют кросс- β структуру. Такая структура предполагает, что β -листы проходят вдоль всей фибриллы. И такое построение амилоидных фибрилл из протяженных β -листов, сформированных из β -тяжей сохраняется до настоящего времени. Практически без внимания осталась работа Иное и др. [139], когда после расшифровки первых компонентов амилоидных депозитов стало ясно, что причиной амилоидозов являются разные амилоидные белки (Гленнер, 1971 г.) [115], в которой исследовался амилоид Р. Согласно данным ЭМ анализа были выявлены два типа частиц: пентагональные плоские структуры диаметром 8,5 нм и высотой 2,5 нм с дыркой в центре и построенные из таких пентагональных частиц, лежащих друг на друге в виде стопки монет, вытянутые частицы. Фактически произошло повторение результатов 1966 г [69].

Однако, описываются и другие механизмы формирования амилоидных структур, о которых уже упоминалось выше. В работе [78] описывается метод негативного контрастирования для изучения амилоидных структур. В работе анализируются препараты А β (1–42) пептида на разных временах инкубации и на основании данных

электронной микроскопии предполагается, что фибриллы формируются из глобулярных олигомерных частиц. В работе [79] также предлагается механизм формирования фибрилл α -синуклеина из однородных гранул. Гранулы сначала формируются из мономеров, затем такие гранулы ассоциируют с формированием фибрилл, диаметр которых совпадает с диаметром гранул (a double-concerted fibrillation model). А в статье 2017 г. [140] уделяется большое внимание изучению интермедиатов по пути формирования фибрилл: олигомерным додекамерам, которые взаимодействуют друг с другом с формированием фибрилл. Следует отметить, что во многих работах по изучению механизма формирования амилоидных структур отмечается, что на начальных этапах фибриллообразования (чаще всего во время лаг-периода) на ЭМ изображениях можно наблюдать кольцевые олигомерные частицы, которые на изображениях зрелых фибрилл уже не встречаются. Однако, чаще всего их отсутствие на поздних временах формирования фибрилл, как правило, не обсуждается. И еще следует отметить, что при достаточно хорошем качестве изображений различных фибрилл можно заметить, что они сформированы из кольцевых олигомерных частиц.

Наш опыт работы с различными амилоидными белками/пептидами – инсулином, лизпро инсулином, A β (1–42) и A β (1–40) пептидами, их амилоидогенными фрагментами (A β (16–25), A β (31–40), A β (33–42)), а также амилоидогенными фрагментами белка клеточной стенки дрожжей Bgl2 (GluNB, AspNB) показал, что строительным блоком при формировании фибрилл является кольцевой олигомер. Кольцевые олигомеры взаимодействуют друг с другом боковыми сторонами, часто слегка перекрывая друг друга. При этом структура кольцевых олигомеров различных белков/пептидов на молекулярном уровне отличается [54, 56, 87]. Согласно нашему моделированию, структуры кольцевых олигомеров содержат небольшие фрагменты β -листов. Большое количество таких фрагментов вполне может при рентгеноструктурном анализе дать рефлексы, характерные для кросс- β структуры. Имеющиеся многочисленные другие рефлексы на рентгенограммах амилоидных фибрилл, помогут при правильной их расшифровке показать правильную структурную организацию амилоидных фибрилл.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Накопленный нами опыт работы с различными амилоидогенными белками/пептидами и анализ литературы по изучению механизма/механизмов формирования фибрилл показывает, что далеко не всегда учитываются все получаемые данные. Прежде всего, при рентгеноструктурном анализе обращается основное внимание на два рефлекса – 4,5–4,8 и около 8–12 Å, которые свидетельствуют о кросс-β структурной организации амилоидных фибрилл. При этом многим другим рефлексам, а они всегда есть, практически не уделяется должного внимания (рис. 6). Кроме того, чаще всего на картинах рентгеновских дифракций нет четких рефлексов в области около 4,7 и 11 Å, эти рефлексы бывают размыты, особенно это относится к обычно диффузному рефлексу в области 11 Å (расстояние между β-листами). Чаще всего это объясняют разным способом подготовки препаратов к рентгеноструктурному анализу или недостаточной ориентацией фибрилл [16, 141]. Мы обратили внимание, что попытки анализа данных рентгеноструктурного анализа, предпринятые в 1980-тые и 1990-е годы [14, 18, 75, 142] не нашли дальнейшего развития. Мы думаем, что общее представление о структуре амилоидогенной фибриллы, как о полимере, построенном из β-листов, идущих параллельно вдоль всей оси фибриллы (сами β-листы сформированы из β-участков перпендикулярных оси фибриллы) подлежит более внимательному анализу. Думаем, что следует промоделировать картину дифракции от кольцевых олигомерных структур, с параметрами, полученными из ЭМ анализа и с привлечением данных о молекулярной структуре олигомеров, рассчитанных с помощью теоретических методов. Уже накопилось достаточно данных, которые свидетельствуют, что структура амилоидных фибрилл может быть иной [54, 79, 80, 87]. Исходя из общепринятого взгляда на структурную организацию фибрилл, сложно представить механизм формирования фибрилл и возможность существования проходящего вдоль всей фибриллы β-листа (до 10 и более мкм). Кроме того, трудно объяснить полиморфизм фибрилл, их ветвление и дробление. Из полученных нами данных по изучению фибриллообразования различных амилоидогенных белков/пептидов на данный момент можно предположить, что основным строительным блоком для формирования фибрилл является кольцевой олигомер с параметрами и структурой, свойственной соответствующему белку/пептиду (рис. 6). Ассоциация таких кольцевых олигомеров различным способом приводит к формированию фибрилл разной морфологии.

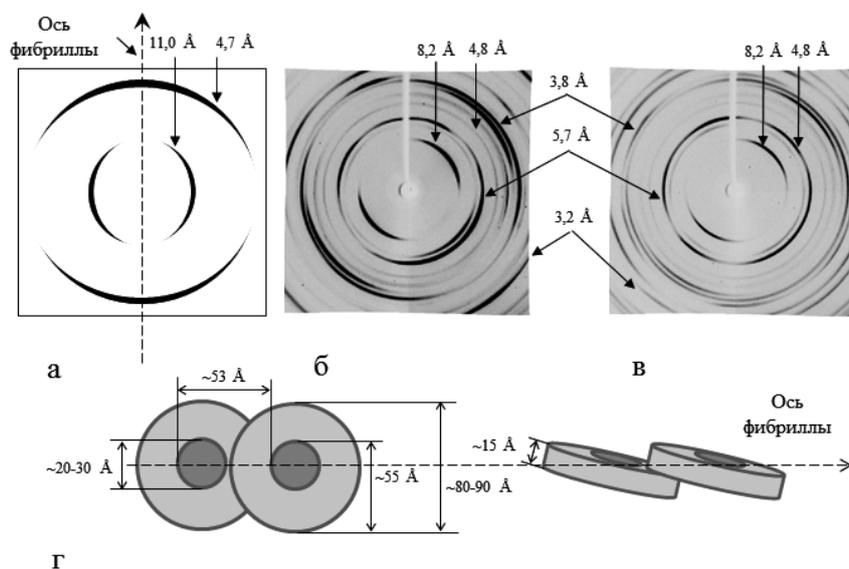


Рис. 6. Рентгеноструктурный анализ A β (1-40) и A β (1-42) пептидов.

а – Схематическое изображение типичной картины дифракции для кросс- β структуры (8–12 Å – экваториальный и 4,5–4,8 – меридиональный рефлекс).

б, в – Рентгенограммы A β (1-40) и A β (1-42) синтетических пептидов (Sigma-Aldrich, USA) в условиях 50 мМ Трис-НСl, рН 7,5 [144]. Кроме основных рефлексов (4,5–4,8 и 8–12 Å) указаны некоторые другие рефлекс.

г – Схематическое изображение укладки кольцевых олигомеров в амилоидной фибрилле для A β (1-40) и A β (1-42) пептидов.

Экваториальные рефлекс отмечены перпендикулярно оси фибриллы, а меридиональные – параллельно. Кольцевые олигомерные структуры представляют собой короткие полые цилиндры.

В литературе встречается мнение, что при разработке терапевтических средств против амилоидозов следует применять персонализированный подход, поскольку показано, что фибриллярные образования у разных пациентов могут морфологически различаться. В этой связи предложенная нами модель единого для всех фибрилл способа формирования фибрилл из олигомерных структур могла бы облегчить создание препаратов общего действия. Однако, на наш взгляд, основное внимание должно быть уделено не полимерным образованиям белков/пептидов в виде фибрилл и даже не олигомерным агрегатам, а физиологическим, генетическим и другим причинам, приводящим к дестабилизации нативных молекул белков/пептидов и запускающим процесс формирования фибрилл.

ЛИТЕРАТУРА

1. Uberti, D., Cenini, G., Bonini, S.A., Barcikowska, M., Styczynska, M., Szybinska, A., Memo, M. (2010) Increased CD44 gene expression in lymphocytes derived from Alzheimer disease patients, *Neurodegener. Dis.*, **7**, 143–147.
2. Song, J., Wang, S., Tan, M., Jia, J. (2012) G1/S checkpoint proteins in peripheral blood lymphocytes are potentially diagnostic biomarkers for Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.*, **526**, 144–149.
3. Saha, A.R., Ninkina, N.N., Hanger, D.P., Anderton, B.H., Davies, A.M., Buchman, V.L. (2000) Induction of neuronal death by alpha-synuclein, *Eur. J. Neurosci.*, **12**, 3073–3077.
4. Caughey, B., Lansbury, P.T. (2003) Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders, *Annu. Rev. Neurosci.*, **26**, 267–298.
5. Lesné, S., Koh, M.T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C.G., Yang, A., Gallagher, M., Ashe, K.H. (2006) A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory, *Nature*, **440**, 352–357.
6. Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., Brett, F.M., Farrell, M.A., Rowan, M.J., Lemere, C.A., Regan, C.M., Walsh, D.M., Sabatini, B.L., Selkoe, D.J. (2008) Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory, *Nat. Med.*, **14**, 837–842.
7. Hardy, J., Selkoe, D.J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics, *Science*, **297**, 353–356.
8. Burns, A., Iliffe, S. (2009) Alzheimer's disease, *BMJ*, **338**, b158–b158.
9. Chartier-Harlin, M.C., Crawford, F., Houlihan, H., Warren, A., Hughes, D., Fidani, L., Goate, A., Rossor, M., Roques, P., Hardy, J. (1991) Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene, *Nature*, **353**, 844–846.
10. Członkowska, A., Kurkowska-Jastrzebska, I. (2011) Inflammation and gliosis in neurological diseases—clinical implications, *J. Neuroimmunol.*, **231**, 78–85.
11. Maltsev, A.V., Santockyte, R., Bystryak, S., Galzitskaya, O.V. (2014) Activation of neuronal defense mechanisms in response to pathogenic factors triggering induction of amyloidosis in Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis. JAD*, **40**, 19–32.
12. Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K., Arrighi, H.M. (2007) Forecasting the global burden of Alzheimer's disease, *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.*, **3**, 186–191.
13. Astbury, W.T., Dickinson, S., Bailey, K. (1935) The X-ray interpretation of denaturation and the structure of the seed globulins, *Biochem. J.*, **29**, 2351–2360.1.
14. Inouye, H., Fraser, P.E., Kirschner, D.A. (1993) Structure of beta-crystallite assemblies formed by Alzheimer beta-amyloid protein analogues: analysis by x-ray diffraction, *Biophys. J.*, **64**, 502–519.
15. Malinchik, S.B., Inouye, H., Szumowski, K.E., Kirschner, D.A. (1998) Structural analysis of Alzheimer's beta(1-40) amyloid: protofilament assembly of tubular fibrils, *Biophys. J.*, **74**, 537–545.

16. Serpell, L.C., Fraser, P.E., Sunde, M. (1999) X-ray fiber diffraction of amyloid fibrils, *Methods Enzymol.*, **309**, 526–536.
17. Sunde, M., Blake, C. (1997) The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction, *Adv. Protein Chem.*, **50**, 123–159.
18. 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**, 729–739.
19. Chiti, F., Dobson, C.M. (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease, *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 333–366.
20. Cohen, S.I.A., Linse, S., Luheshi, L.M., Hellstrand, E., White, D.A., Rajah, L., Otzen, D.E., Vendruscolo, M., Dobson, C.M., Knowles, T.P.J. (2013) Proliferation of amyloid- β 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **110**, 9758–9763.
21. Meisl, G., Yang, X., Hellstrand, E., Frohm, B., Kirkegaard, J.B., Cohen, S.I.A., Dobson, C.M., Linse, S., Knowles, T.P.J. (2014) Differences in nucleation behavior underlie the contrasting aggregation kinetics of the A β 40 and A β 42 peptides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **111**, 9384–9389.
22. Dovidchenko, N.V., Finkelstein, A.V., Galzitskaya, O.V. (2014) How to determine the size of folding nuclei of protofibrils from the concentration dependence of the rate and lag-time of aggregation. I. Modeling the amyloid protofibril formation, *J. Phys. Chem. B*, **118**, 1189–1197.
23. Dovidchenko, N.V., Galzitskaya, O.V. (2015) Computational Approaches to Identification of Aggregation Sites and the Mechanism of Amyloid Growth, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **855**, 213–239.
24. Dovidchenko, N.V., Glyakina, A.V., Selivanova, O.M., Grigorashvili, E.I., Suvorina, M.Y., Dzhus, U.F., Mikhailina, A.O., Shiliaev, N.G., Marchenkov, V.V., Surin, A.K., Galzitskaya, O.V. (2016) One of the possible mechanisms of amyloid fibrils formation based on the sizes of primary and secondary folding nuclei of A β 40 and A β 42, *J. Struct. Biol.*, **194**, 404–414.
25. Tanzi, R.E., Gusella, J.F., Watkins, P.C., Bruns, G.A., St George-Hyslop, P., Van Keuren, M.L., Patterson, D., Pagan, S., Kurnit, D.M., Neve, R.L. (1987) Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus, *Science*, **235**, 880–884.
26. Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease, *Nature*, **349**, 704–706.
27. Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K., Müller-Hill, B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor, *Nature*, **325**, 733–736.
28. Ещенко, Н.Д. (2004) *Биохимия психических и нервных болезней*. С.-Петербург. ун-та, СПб.
29. Stanton, L.R., Coctzee, R.H. (2004) Down's syndrome and dementia, *Advances in Psychiatric Treatment.*, **10**, 50–58.
30. Molinari, M., Eriksson, K.K., Calanca, V., Galli, C., Cresswell, P., Michalak, M., Helenius, A. (2004) Contrasting functions of calreticulin and calnexin in glycoprotein folding and ER quality control, *Mol. Cell*, **13**, 125–135.

31. Van Nostrand, W.E., Melchor, J.P., Cho, H.S., Greenberg, S.M., Rebeck, G.W. (2001) Pathogenic effects of D23N Iowa mutant amyloid beta -protein, *J. Biol. Chem.*, **276**, 32860–32866.
32. Nilsberth, C., Westlind-Danielsson, A., Eckman, C.B., Condron, M.M., Axelman, K., Forsell, C., Stenh, C., Luthman, J., Teplov, D.B., Younkin, S.G., Näslund, J., Lannfelt, L. (2001) The «Arctic» APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation, *Nat. Neurosci.*, **4**, 887–893.
33. Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretschmar, H.A., Herms, J. (2006) Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, **26**, 7212–7221.
34. Мальцев, А.В., Галзитская, О. (2010) Образование и участие нано-амилоидов в патогенезе болезни Альцгеймера и других амилоидогенных заболеваний, *Биомедицинская химия*, **56**, 624–638.
35. Hefter, D., Draguhn, A. (2017) APP as a Protective Factor in Acute Neuronal Insults, *Front. Mol. Neurosci.*, **10**, 22.
36. Pardossi-Piquard, R., Petit, A., Kawarai, T., Sunyach, C., Alves da Costa, C., Vincent, B., Ring, S., D'Adamio, L., Shen, J., Müller, U., St George Hyslop, P., Checler, F. (2005) Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP, *Neuron*, **46**, 541–554.
37. Belyaev, N.D., Nalivaeva, N.N., Makova, N.Z., Turner, A.J. (2009) Neprilysin gene expression requires binding of the amyloid precursor protein intracellular domain to its promoter: implications for Alzheimer disease, *EMBO Rep.*, **10**, 94–100.
38. Fraering, P.C. (2007) Structural and Functional Determinants of gamma-Secretase, an Intramembrane Protease Implicated in Alzheimer's Disease, *Curr. Genomics*, **8**, 531–549.
39. Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., et al. (1997) Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice, *Nat. Med.*, **3**, 67–72.
40. Sun, L., Zhou, R., Yang, G., Shi, Y. (2017) Analysis of 138 pathogenic mutations in presenilin-1 on the in vitro production of Aβ42 and Aβ40 peptides by γ-secretase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E476–E485.
41. Vetrivel, K.S., Cheng, H., Lin, W., Sakurai, T., Li, T., Nukina, N., Wong, P.C., Xu, H., Thinakaran, G. (2004) Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes, *J. Biol. Chem.*, **279**, 44945–44954.
42. Paschkowsky, S., Hamzé, M., Oesterreich, F., Munter, L.M. (2016) Alternative Processing of the Amyloid Precursor Protein Family by Rhomboid Protease RHBDL4, *J. Biol. Chem.*, **291**, 21903–21912.
43. Willem, M., Tahirovic, S., Busche, M.A., Ovsepian, S.V., Chafai, M., Kootar, S., Hornburg, D., Evans, L.D.B., Moore, S., Daria, A., Hampel, H., Müller, V., Giudici, C., Nuscher, B., Wenninger-Weinzierl, A., Kremmer, E., Heneka, M.T., Thal, D.R., Giedraitis, V., et al. (2015) η-Secretase processing of APP inhi-

- bits neuronal activity in the hippocampus, *Nature*, **526**, 443–447.
44. Nussbaum, J.M., Seward, M.E., Bloom, G.S. (2013) Alzheimer disease: a tale of two prions, *Prion*, **7**, 14–19.
45. Marcelli, S., Corbo, M., Iannuzzi, F., Negri, L., Blandini, F., Nisticò, R., Feligioni, M. (2017) The Involvement of Post-Translational Modifications in Alzheimer's Disease, *Curr. Alzheimer Res.*, in press.
46. Guntupalli, S., Jang, S.E., Zhu, T., Haganir, R.L., Widagdo, J., Anggono, V. (2017) GluA1 subunit ubiquitination mediates amyloid- β -induced loss of surface α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors, *J. Biol. Chem.*, **292**, 8186–8194.
47. Girvan, P., Miyake, T., Teng, X., Branch, T., Ying, L. (2016) Kinetics of the Interactions between Copper and Amyloid- β with FAD Mutations and Phosphorylation at the Nterminus, *ChemBiochem Eur. J. Chem. Biol.*, **17**, 1732–1737.
48. Ahmed, M., Davis, J., Aucoin, D., Sato, T., Ahuja, S., Aimoto, S., Elliott, J.I., Van Nostrand, W.E., Smith, S.O. (2010) Structural conversion of neurotoxic amyloid-beta(1-42) oligomers to fibrils, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 561–567.
49. Yu, L., Edalji, R., Harlan, J.E., Holzman, T.F., Lopez, A.P., Labkovsky, B., Hillen, H., Barghorn, S., Ebert, U., Richardson, P.L., Miesbauer, L., Solomon, L., Bartley, D., Walter, K., Johnson, R.W., Hajduk, P.J., Olejniczak, E.T. (2009) Structural characterization of a soluble amyloid beta-peptide oligomer, *Biochemistry (Mosc.)*, **48**, 1870–1877.
50. Bitan, G., Kirkitadze, M.D., Lomakin, A., Vollers, S.S., Benedek, G.B., Teplow, D.B. (2003) Amyloid beta-protein (Abeta) assembly: Abeta 40 and Abeta 42 oligomerize through distinct pathways, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **100**, 330–335.
51. Bernstein, S.L., Dupuis, N.F., Lazo, N.D., Wyttenbach, T., Condron, M.M., Bitan, G., Teplow, D.B., Shea, J.-E., Ruotolo, B.T., Robinson, C.V., Bowers, M.T. (2009) Amyloid- β protein oligomerization and the importance of tetramers and dodecamers in the aetiology of Alzheimer's disease, *Nat. Chem.*, **1**, 326–331.
52. Garai, K., Frieden, C. (2013) Quantitative analysis of the time course of A β oligomerization and subsequent growth steps using tetramethylrhodamine-labeled A β , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **110**, 3321–3326.
53. Jeong, J.S., Ansaloni, A., Mezzenga, R., Lashuel, H.A., Dietler, G. (2013) Novel mechanistic insight into the molecular basis of amyloid polymorphism and secondary nucleation during amyloid formation, *J. Mol. Biol.*, **425**, 1765–1781.
54. Selivanova, O.M., Surin, A.K., Marchenkov, V.V., Dzhus, U.F., Grigorashvili, E.I., Suvorina, M.Y., Glyakina, A.V., Dovidchenko, N.V., Galzitskaya, O.V. (2016) The Mechanism Underlying Amyloid Polymorphism is Opened for Alzheimer's Disease Amyloid- β Peptide, *J. Alzheimers Dis. JAD*, **54**, 821–830.
55. Selivanova, O.M., Suvorina, M.Y., Dovidchenko, N.V., Eliseeva, I.A., Surin, A.K., Finkelstein, A.V., Schmatchenko, V.V., Galzitskaya, O.V. (2014) How to determine the size of folding nuclei of protofibrils from the concentration dependence of the rate and lag-time of aggregation. II. Experimental application for insulin and LysPro insulin: aggregation morphology, kinetics, and sizes of nuclei, *J. Phys. Chem. B*, **118**, 1198–1206.

56. Selivanova, O.M., Suvorina, M.Y., Surin, A.K., Dovidchenko, N.V., Galzitskaya, O.V. (2017) Insulin and Lispro Insulin: What is Common and Different in their Behavior?, *Curr. Protein Pept. Sci.*, **18**, 57–64.
57. Wälti, M.A., Ravotti, F., Arai, H., Glabe, C.G., Wall, J.S., Böckmann, A., Güntert, P., Meier, B.H., Riek, R. (2016) Atomic-resolution structure of a disease-relevant A β (1-42) amyloid fibril, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E4976–4984.
58. Lu, J.-X., Qiang, W., Yau, W.-M., Schwieters, C.D., Meredith, S.C., Tycko, R. (2013) Molecular structure of β -amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue, *Cell*, **154**, 1257–1268.
59. Sgourakis, N.G., Merced-Serrano, M., Boutsidis, C., Drineas, P., Du, Z., Wang, C., Garcia, A.E. (2011) Atomic-level characterization of the ensemble of the A β (1-42) monomer in water using unbiased molecular dynamics simulations and spectral algorithms, *J. Mol. Biol.*, **405**, 570–583.
60. Cho, K.R., Huang, Y., Yu, S., Yin, S., Plomp, M., Qiu, S.R., Lakshminarayanan, R., Moradian-Oldak, J., Sy, M.-S., De Yoreo, J.J. (2011) A multistage pathway for human prion protein aggregation in vitro: from multimeric seeds to β -oligomers and nonfibrillar structures, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 8586–8593.
61. Bieschke, J., Zhang, Q., Powers, E.T., Lerner, R.A., Kelly, J.W. (2005) Oxidative metabolites accelerate Alzheimer's amyloidogenesis by a two-step mechanism, eliminating the requirement for nucleation, *Biochemistry*, **44**, 4977–4983.
62. Suvorina, M.Y., Selivanova, O.M., Grigorashvili, E.I., Nikulin, A.D., Marchenkov, V.V., Surin, A.K., Galzitskaya, O.V. (2015) Studies of Polymorphism of Amyloid- β 42 Peptide from Different Suppliers, *J. Alzheimers Dis.*, **47**, 583–593.
63. Derrick, J.S., Lim, M.H. (2015) Tools of the Trade: Investigations into Design Strategies of Small Molecules to Target Components in Alzheimer's Disease, *ChemBioChem*, **16**, 887–898.
64. Cohen, A.S., Calkins, E. (1959) Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins, *Nature*, **183**, 1202–1203.
65. Gueft, B., Ghidoni, J.J. (1963) The site of formation and ultrastructure of amyloid, *Am. J. Pathol.*, **43**, 837–854.
66. Terry, R.D., Gonatas, N.K., Weiss, M. (1964) Ultrastructural studies in alzheimer's presenile dementia, *Am. J. Pathol.*, **44**, 269–297.
67. Shirahama, T., Cohen, A.S. (1967) Fine structure of the glomerulus in human and experimental renal amyloidosis, *Am. J. Pathol.*, **51**, 869–911.
68. Shirahama, T., Cohen, A.S. (1965) Structure of amyloid fibrils after negative staining and high-resolution electron microscopy, *Nature*, **206**, 737–738.
69. Benditt, E.P., Eriksen, N. (1966) Amyloid. 3. A protein related to the subunit structure of human amyloid fibrils, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **55**, 308–316.
70. Glenner, G.G., Bladen, H.A. (1966) Purification and reconstitution of the periodic fibril and unit structure of human amyloid, *Science*, **154**, 271–272.
71. Shirahama, T., Cohen, A.S. (1967) High-resolution electron microscopic analysis of the amyloid fibril, *J. Cell Biol.*, **33**, 679–708.

72. Shirahama, T., Cohen, A.S. (1967) Reconstitution of amyloid fibrils from alkaline extracts, *J. Cell Biol.*, **35**, 459–464.
73. Pras, M., Schubert, M., Zucker-Franklin, D., Rimon, A., Franklin, E.C. (1968) The characterization of soluble amyloid prepared in water, *J. Clin. Invest.*, **47**, 924–933.
74. Glenner, G.G., Eanes, E.D., Bladen, H.A., Linke, R.P., Termine, J.D. (1974) Beta-pleated sheet fibrils. A comparison of native amyloid with synthetic protein fibrils, *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.*, **22**, 1141–1158.
75. Kirschner, D.A., Inouye, H., Duffy, L.K., Sinclair, A., Lind, M., Selkoe, D.J. (1987) Synthetic peptide homologous to beta protein from Alzheimer disease forms amyloid-like fibrils in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**, 6953–6957.
76. Goldsbury, C.S., Wirtz, S., Müller, S.A., Sunderji, S., Wicki, P., Aebi, U., Frey, P. (2000) Studies on the in vitro assembly of a beta 1-40: implications for the search for a beta fibril formation inhibitors, *J. Struct. Biol.*, **130**, 217–231.
77. Goldsbury, C., Frey, P., Olivieri, V., Aebi, U., Müller, S.A. (2005) Multiple assembly pathways underlie amyloid-beta fibril polymorphisms, *J. Mol. Biol.*, **352**, 282–298.
78. Nielsen, E.H., Nybo, M., Svehag, S.E. (1999) Electron microscopy of pre-fibrillar structures and amyloid fibrils, *Methods Enzymol.*, **309**, 491–496.
79. Bhak, G., Lee, J.-H., Hahn, J.-S., Paik, S.R. (2009) Granular assembly of alpha-synuclein leading to the accelerated amyloid fibril formation with shear stress, *PLoS One*, **4**, e4177.
80. Hill, S.E., Robinson, J., Matthews, G., Muschol, M. (2009) Amyloid protofibrils of lysozyme nucleate and grow via oligomer fusion, *Biophys. J.*, **96**, 3781–3790.
81. Quist, A., Doudevski, I., Lin, H., Azimova, R., Ng, D., Frangione, B., Kagan, B., Ghiso, J., Lal, R. (2005) Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **102**, 10427–10432.
82. Roychaudhuri, R., Yang, M., Hoshi, M.M., Teplow, D.B. (2009) Amyloid beta-protein assembly and Alzheimer disease, *J. Biol. Chem.*, **284**, 4749–4753.
83. Kumar, S., Udgaonkar, J.B. (2009) Conformational conversion may precede or follow aggregate elongation on alternative pathways of amyloid protofibril formation, *J. Mol. Biol.*, **385**, 1266–1276.
84. Walsh, D.M., Lomakin, A., Benedek, G.B., Condron, M.M., Teplow, D.B. (1997) Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate, *J. Biol. Chem.*, **272**, 22364–22372.
85. Morris, A.M., Watzky, M.A., Finke, R.G. (2009) Protein aggregation kinetics, mechanism, and curve-fitting: a review of the literature, *Biochim. Biophys. Acta*, **1794**, 375–397.
86. 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) Определение размера ядер сворачивания фибрилл, образованных рекомбинантным A β (1–40) пептидом. *Биохимия*, **81**, 710–720.
87. Selivanova, O.M., Glyakina, A.V., Gorbunova, E.Y., Mustaeva, L.G., Suvorina, M.Y., Grigorashvili, E.I., Nikulin, A.D., Dovidchenko, N.V.,

- Rekstina, V.V., Kalebina, T.S., Surin, A.K., Galzitskaya, O.V. (2016) Structural model of amyloid fibrils for amyloidogenic peptide from Bgl2p-glucantransferase of *S. cerevisiae* cell wall and its modifying analog. New morphology of amyloid fibrils, *Biochim. Biophys. Acta BBA – Proteins Proteomics*, **1864**, 1489–1499.
88. Селиванова, О.М., Горбунова, Е.Ю., Мустаева, Л.Г., Григорашвили, Е.И., Суворина, М.Ю., Сурин, А.К., Галзитская, О.В. (2016) Пептид А β (16–25) образует наноплёнки в процессе его агрегации. *Биохимия*, **81**, 991–998.
89. Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., Katzman, R. (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment, *Ann. Neurol.*, **30**, 572–580.
90. Ferreira, S.T., Vieira, M.N.N., De Felice, F.G. (2007) Soluble protein oligomers as emerging toxins in Alzheimer's and other amyloid diseases, *IUBMB Life*, **59**, 332–345.
91. Sakono, M., Zako, T. (2010) Amyloid oligomers: formation and toxicity of A β oligomers: Formation of toxic A β oligomers, *FEBS J.*, **277**, 1348–1358.
92. Stroud, J.C., Liu, C., Teng, P.K., Eisenberg, D. (2012) Toxic fibrillar oligomers of amyloid- β have cross- β structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **109**, 7717–7722.
93. Friedrich, R.P., Tepper, K., Ronicke, R., Soom, M., Westermann, M., Reymann, K., Kaether, C., Fandrich, M. (2010) Mechanism of amyloid plaque formation suggests an intracellular basis of A pathogenicity, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**, 1942–1947.
94. Gouras, G.K., Tampellini, D., Takahashi, R.H., Capetillo-Zarate, E. (2010) Intraneuronal β -amyloid accumulation and synapse pathology in Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **119**, 523–541.
95. Canter, R.G., Penney, J., Tsai, L.-H. (2016) The road to restoring neural circuits for the treatment of Alzheimer's disease, *Nature*, **539**, 187–196.
96. Mattson, M.P. (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease, *Nature*, **430**, 631–639.
97. Kaye, R., Lasagna-Reeves, C.A. (2013) Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity, *J. Alzheimers Dis. JAD*, **33** Suppl 1, S67-S78.
98. Fu, L., Sun, Y., Guo, Y., Chen, Y., Yu, B., Zhang, H., Wu, J., Yu, X., Kong, W., Wu, H. (2017) Comparison of neurotoxicity of different aggregated forms of A β 40, A β 42 and A β 43 in cell cultures, *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.*, **23**, 245–251.
99. Connelly, L., Jang, H., Arce, F.T., Capone, R., Kotler, S.A., Ramachandran, S., Kagan, B.L., Nussinov, R., Lal, R. (2012) Atomic force microscopy and MD simulations reveal pore-like structures of all-D-enantiomer of Alzheimer's β -amyloid peptide: relevance to the ion channel mechanism of AD pathology, *J. Phys. Chem. B*, **116**, 1728–1735.
100. Soscia, S.J., Kirby, J.E., Washicosky, K.J., Tucker, S.M., Ingelsson, M., Hyman, B., Burton, M.A., Goldstein, L.E., Duong, S., Tanzi, R.E., Moir, R.D. (2010) The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide, *PLoS One*, **5**, e9505.

101. Clare, D.K., Vasishtan, D., Stagg, S., Quispe, J., Farr, G.W., Topf, M., Horwich, A.L., Saibil, H.R. (2012) ATP-triggered conformational changes delineate substrate-binding and -folding mechanics of the GroEL chaperonin, *Cell*, **149**, 113–123.
102. Koike-Takeshita, A., Arakawa, T., Taguchi, H., Shimamura, T. (2014) Crystal structure of a symmetric football-shaped GroEL:GroES2-ATP14 complex determined at 3.8Å reveals rearrangement between two GroEL rings, *J. Mol. Biol.*, **426**, 3634–3641.
103. Horwich, A.L. (2011) Protein folding in the cell: an inside story, *Nat. Med.*, **17**, 1211–1216.
104. Марченков, В.В., Соколовский, И.В., Котова, Н.В., Галзитская, О.В., Бочкарёва, Е.С., Гиршович, А.С., Семисотнов, Г.В. (2004) Взаимодействие шаперона GroEL с ранними кинетическими промежуточными состояниями ренатурирующих белков ингибирует формирование их нативной структуры. *Биофизика*, **49**, 987–994.
105. Yagi-Utsumi, M., Kunihara, T., Nakamura, T., Uekusa, Y., Makabe, K., Kuwajima, K., Kato, K. (2013) NMR characterization of the interaction of GroEL with amyloid β as a model ligand, *FEBS Lett.*, **587**, 1605–1609.
106. Fukui, N., Araki, K., Hongo, K., Mizobata, T., Kawata, Y. (2016) Modulating the Effects of the Bacterial Chaperonin GroEL on Fibrillogenic Polypeptides through Modification of Domain Hinge Architecture, *J. Biol. Chem.*, **291**, 25217–25226.
107. Haslbeck, M., Peschek, J., Buchner, J., Weinkauff, S. (2016) Structure and function of α -crystallins: Traversing from in vitro to in vivo, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 149–166.
108. Shammas, S.L., Waudby, C.A., Wang, S., Buell, A.K., Knowles, T.P.J., Ecroyd, H., Welland, M.E., Carver, J.A., Dobson, C.M., Meehan, S. (2011) Binding of the molecular chaperone α B-crystallin to A β amyloid fibrils inhibits fibril elongation, *Biophys. J.*, **101**, 1681–1689.
109. Dehle, F.C., Ecroyd, H., Musgrave, I.F., Carver, J.A. (2010) α B-Crystallin inhibits the cell toxicity associated with amyloid fibril formation by κ -casein and the amyloid- β peptide, *Cell Stress Chaperones*, **15**, 1013–1026.
110. Bonito-Oliva, A., Barbash, S., Sakmar, T.P., Graham, W.V. (2017) Nucleobindin 1 binds to multiple types of pre-fibrillar amyloid and inhibits fibrillization, *Sci. Rep.*, **7**, 42880.
111. Soper-Hopper, M.T., Eschweiler, J.D., Ruotolo, B.T. (2017) Ion Mobility-Mass Spectrometry Reveals a Dipeptide That Acts as a Molecular Chaperone for Amyloid β , *ACS Chem. Biol.*, **12**, 1113–1120.
112. Romeo, M., Stravalaci, M., Beeg, M., Rossi, A., Fiordaliso, F., Corbelli, A., Salmona, M., Gobbi, M., Cagnotto, A., Diomedede, L. (2017) Humanin Specifically Interacts with Amyloid- β Oligomers and Counteracts Their in vivo Toxicity, *J. Alzheimers Dis. JAD*, **57**, 857–871.
113. Li, J., Zhu, M., Manning-Bog, A.B., Di Monte, D.A., Fink, A.L. (2004) Dopamine and L-dopa disaggregate amyloid fibrils: implications for Parkinson's and Alzheimer's disease, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **18**, 962–964.

114. Eanes, E.D., Glenner, G.G. (1968) X-ray diffraction studies on amyloid filaments, *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.*, **16**, 673–677.
115. Glenner, G.G., Terry, W., Harada, M., Isersky, C., Page, D. (1971) Amyloid fibril proteins: proof of homology with immunoglobulin light chains by sequence analyses, *Science*, **172**, 1150–1151.
116. Benditt, E.P., Eriksen, N., Hermodson, M.A., Ericsson, L.H. (1971) The major proteins of human and monkey amyloid substance: Common properties including unusual N-terminal amino acid sequences, *FEBS Lett.*, **19**, 169–173.
117. Petkova, A.T., Buntkowsky, G., Dyda, F., Leapman, R.D., Yau, W.-M., Tycko, R. (2004) Solid state NMR reveals a pH-dependent antiparallel beta-sheet registry in fibrils formed by a beta-amyloid peptide, *J. Mol. Biol.*, **335**, 247–260.
118. Petkova, A.T., Ishii, Y., Balbach, J.J., Antzutkin, O.N., Leapman, R.D., Delaglio, F., Tycko, R. (2002) A structural model for Alzheimer's beta-amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **99**, 16742–16747.
119. Paravastu, A.K., Leapman, R.D., Yau, W.-M., Tycko, R. (2008) Molecular structural basis for polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **105**, 18349–18354.
120. Schmidt, M., Rohou, A., Lasker, K., Yadav, J.K., Schiene-Fischer, C., Fändrich, M., Grigorieff, N. (2015) Peptide dimer structure in an A β (1–42) fibril visualized with cryo-EM, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **112**, 11858–11863.
121. Zhang, R., Hu, X., Khant, H., Ludtke, S.J., Chiu, W., Schmid, M.F., Frieden, C., Lee, J.-M. (2009) Interprotofilament interactions between Alzheimer's Abeta1-42 peptides in amyloid fibrils revealed by cryoEM, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **106**, 4653–4658.
122. Xiao, Y., Ma, B., McElheny, D., Parthasarathy, S., Long, F., Hoshi, M., Nussinov, R., Ishii, Y. (2015) A β (1–42) fibril structure illuminates self-recognition and replication of amyloid in Alzheimer's disease, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 499–505.
123. Colvin, M.T., Silvers, R., Ni, Q.Z., Can, T.V., Sergeyev, I., Rosay, M., Donovan, K.J., Michael, B., Wall, J., Linse, S., Griffin, R.G. (2016) Atomic Resolution Structure of Monomorphic A β ₄₂ Amyloid Fibrils, *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 9663–9674.
124. Waugh, D.F. (1948) Regeneration of insulin from insulin fibrils by the action of alkali, *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 1850–1857.
125. Waugh, D.F. (1947) A comparison of the regeneration products of fibrous insulin with native insulin, *Fed. Proc.*, **6**, 223.
126. Elliott, A., Ambrose, E.J., Robinson, C. (1950) Chain configurations in nated and denatured insulin: evidence from infrared spectra, *Nature*, **166**, 194.
127. Koltun, W.L., Waugh, D.F., Bear, R.S. (1954) An X-Ray Diffraction Investigation of Selected Types of Insulin Fibrils, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 413–417.
128. Reithel, F.J. (1963) The dissociation and association of protein structures, *Adv. Protein Chem.*, **18**, 123–226.

129. Beaven, G.H., Gratzner, W.B., Davies, H.G. (1969) Formation and structure of gels and fibrils from glucagon, *Eur. J. Biochem.*, **11**, 37–42.
130. Burke, M.J., Rougvie, M.A. (1972) Cross-protein structures. I. Insulin fibrils, *Biochemistry*, **11**, 2435–2439.
131. Geddes, A.J., Parker, K.D., Atkins, E.D., Beighton, E. (1968) «Cross-beta» conformation in proteins, *J. Mol. Biol.*, **32**, 343–358.
132. Lim, K.H., Dasari, A.K.R., Hung, I., Gan, Z., Kelly, J.W., Wright, P.E., Wemmer, D.E. (2016) Solid-State NMR Studies Reveal Native-like β -Sheet Structures in Transthyretin Amyloid, *Biochemistry*, **55**, 5272–5278.
133. Economou, N.J., Giammona, M.J., Do, T.D., Zheng, X., Teplov, D.B., Buratto, S.K., Bowers, M.T. (2016) Amyloid β -Protein Assembly and Alzheimer's Disease: Dodecamers of A β 42, but Not of A β 40, Seed Fibril Formation, *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 1772–1775.
134. Tran, J., Chang, D., Hsu, F., Wang, H., Guo, Z. (2017) Cross-seeding between A β 40 and A β 42 in Alzheimer's disease, *FEBS Lett.*, **591**, 177–185.
135. Pauwels, K., Williams, T.L., Morris, K.L., Jonckheere, W., Vandersteen, A., Kelly, G., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Pastore, A., Serpell, L.C., Broersen, K. (2012) Structural basis for increased toxicity of pathological a β 42:a β 40 ratios in Alzheimer disease, *J. Biol. Chem.*, **287**, 5650–5660.
136. Cukalevski, R., Yang, X., Meisl, G., Weininger, U., Bernfur, K., Frohm, B., Knowles, T.P.J., Linse, S. (2015) The A β 40 and A β 42 peptides self-assemble into separate homomolecular fibrils in binary mixtures but cross-react during primary nucleation, *Chem Sci*, **6**, 4215–4233.
137. Pauling, L., Corey, R.B. (1953) Two Rippled-Sheet Configurations of Polypeptide Chains, and a Note about the Pleated Sheets, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **39**, 253–256.
138. Glenner, G.G., Keiser, H.R., Bladen, H.A., Cuatrecasas, P., Eanes, E.D., Ram, J.S., Kanfer, J.N., DeLellis, R.A. (1968) Amyloid. VI. A comparison of two morphologic components of human amyloid deposits, *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.*, **16**, 633–644.
139. Inoue, S., Skinner, M., Leblond, C.P., Shirahama, T., Cohen, A.S. (1986) Isolation of the amyloid P component from the Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) tumor of the mouse, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **134**, 995–999.
140. Dean, D.N., Das, P.K., Rana, P., Burg, F., Levites, Y., Morgan, S.E., Ghosh, P., Rangachari, V. (2017) Strain-specific Fibril Propagation by an A β Dodecamer, *Sci. Rep.*, **7**, 40787.
141. Makin, O.S., Serpell, L.C. (2005) X-ray diffraction studies of amyloid structure, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, **299**, 67–80.
142. Kirschner, D.A., Abraham, C., Selkoe, D.J. (1986) X-ray diffraction from intraneuronal paired helical filaments and extraneuronal amyloid fibers in Alzheimer disease indicates cross-beta conformation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **83**, 503–507.
143. Galzitskaya, O.V., Selivanova, O.M. (2017) Rosetta Stone for Amyloid Fibrils: The Key Role of Ring-Like Oligomers in Amyloidogenesis, *J. Alzheimers Dis. JAD*, **59**, 785–795.

144. 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.