

## МЕХАНИЗМЫ ОБРАЗОВАНИЯ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ

©2014 г. Н. В. ДОВИДЧЕНКО, Е. И. ЛЕОНОВА,  
О. В. ГАЛЗИТСКАЯ\*

*Институт белка РАН, Московская обл., Пушкино*

I. Введение. II. Процесс образования амилоидов. III. Образование амилоидов, приводящее к патологии. IV. Образование амилоидов по прионному механизму необходимо для нормального функционирования клеток. V. Биохимическая характеристика амилоидных фибрилл. VI. Экспериментальное моделирование амилоидоза у животных. VII. Особенности кинетики амилоидообразования. VIII. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Парадигма, что одна полипептидная цепь может принять только одну уникальную пространственную конформацию, давно ушла в историю [1]. Образование различных структур по прионному механизму является убедительным тому доказательством, иллюстрируя, как за счет конформационных изменений один белок может образовывать различные структуры, в том числе и амилоиды, и амилоидоподобные фибриллы. Особенно это стало актуально, когда выяснилось, что неправильная укладка некоторых белков может стать причиной патологических агрегаций и приводить к развитию многих нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона, диабета второго типа, Бокового Амиотрофического склероза (БАС), фронтотемпоральной дегенерации (ФТД), Гентингтона и др. [2–5]. При этом следует отметить, что не все амилоиды и различ-

---

*Принятые сокращения:* БАС – боковой амиотрофический склероз; ФТД – фронтотемпоральная дегенерация; БКЯ – болезнь Крейтцфельда-Якоба; FUS – fused in sarcoma; TDP-43 – TAR DNA-binding protein-43; TIA1 – cytotoxic granule-associated RNA binding protein; TAF15 – TATA box binding protein (TBP)-associated factor; EWS – Ewing sarcoma breakpoint region 1; APP – amyloid precursor protein; PSF – PTB-associated splicing factor; аполипопротеин E – ApoE; SAP – Serum amyloid P component.

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

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 14-14-00536.

ные амилоидоподобные фибриллы ассоциированы с нейродегенеративными заболеваниями и это свойство присуще большому количеству белков. Но, несмотря на такое разнообразие белков, образованные амилоидные фибриллы на первый взгляд схожи между собой и представляют уложенные в стопку антипараллельные  $\beta$ -структуры, направленные перпендикулярно оси фибриллы [6]. Благодаря электронной микроскопии и рентгеноструктурному анализу появилось более точное описание амилоидных фибрилл. Амилоидные фибриллы могут быть прямыми или перекрученными, могут содержать много протофиламентов, которые выстраиваются параллельно оси фибриллы или закручиваться относительно друг друга. Можно представить, что амилоидные фибриллы представляют собой закрученные в спираль антипараллельные  $\beta$ -листы, внутри спирали образуется полость, подобно цилиндру [7]. Амилоидоподобные структуры образуют дрожжевые прионы Sup35, богатые аспарагином и глутамином. И, тем не менее, более глубокие исследования выявили ряд отличий между амилоидными фибриллами, связанными с составом белков и с условиями, в которых они были созданы. Например, синуклеин, агрегаты которого характерны для болезни Паркинсона, формирует одиночные цилиндры, состоящие из  $\beta$ -листов, а фибриллы А $\beta$ -фрагментов, образующиеся при болезни Альцгеймера, вероятнее всего, состоят из двух-трех цилиндрических  $\beta$ -листов [7].

Впервые амилоидные отложения были определены в тканях при окрашивании йодом более 150 лет назад [8]. Отложения окрашивались в синий цвет подобно крахмальным зернам у растений. Несмотря на то, что результаты привели к неправильному выводу о существовании у человека крахмальных зерен подобно растениям (откуда и пошло название «амилоид»), последующие 100 лет шло накопление данных о встречаемости амилоидов в различных тканях. Так как к моменту обнаружения амилоидных отложений в распоряжении исследователей были только световой микроскоп и различные красители, то последующий «описательный» период обнаруженные отложения систематизировались в зависимости от области нахождения, степени окраски тем или иным красящим агентом и от клинического случая, при котором амилоидные отложения были обнаружены. Так в 20-х годах XX века уже было известно, что амилоиды окрашиваются Конго красным, поэтому их можно отнести к оптически активным веществам и по степени окрашенности судить об их количестве в образце [9, 10]. Например, Конго красный одно время использовался как тест на амилоидоз, когда краситель вводился внутривенно, и через определенный промежуток времени оценивалась доля

связанного красителя в сыворотке [11, 12]. Считалось, что полученная оценка пропорциональна общему количеству амилоидов в крови. Несмотря на то, что использование теста было прекращено в связи с риском развития анафилактического шока, связывание амилоидных агрегатов считалось характерной особенностью красителя и использовалось для выделения фибрилл из отложений при аутопсии. Но при этом до настоящего времени точный механизм связывания Конго красного красителя с амилоидными фибрилами до конца не изучен [13, 14]. Другой часто используемый краситель для выявления амилоидоза – тиофлафин Т (ThT), который при встраивании в фибриллы значительно увеличивает квантовый выход флуоресценции со сдвигом в длинноволновую часть спектра. Однако не все амилоидные образования окрашиваются этими красителями: амилоиды, образованные белком MAVS, задействованный в противовирусном иммунитете [15], альфа-синуклеин при болезни Паркинсона [16], белком Тау при болезни Альцгеймера [17], FUS при болезни бокового амиотрофического склероза [18] и др. Возможно, это связано с тем, что в воде коротковолновый спектр возбуждения незначительно перекрывает спектр поглощения красителя, т.е. при максимальном возбуждении происходит слабое поглощение. А при длинноволновом спектре возбуждения тиофлафин Т флуоресцирует в той же спектральной области, что и встроенный в фибриллы краситель, а раствор красителя с амилоидными фибриллами, как правило, представляет собой смесь свободного красителя и красителя, интеркалированного в фибриллы [19]. Показано, что тиофлафин Т способен связываться с ароматическими аминокислотными остатками, определенным образом расположенными в  $\beta$ -листах [20]. Несмотря на широкое использование тиофлафина Т в качестве флуоресцентного зонда, до сих пор нет единого мнения о механизме встраивания тиофлафина Т в амилоидные фибриллы [19].

## II. ПРОЦЕСС ОБРАЗОВАНИЯ АМИЛОИДОВ

Прионы – это инфекционные белки, способные принимать различные конформации, в том числе и амилоидные фибриллы, которые могут выступать в качестве матрицы и «заражать» другие белки как внутри клетки и между клетками, так и между организмами [21–23]. Изначально прионы исследовались в связи с инфекционными заболеваниями, такими как болезнь Куру, болезнь Крейтцфельда-Якоба (БКЯ), скрепи, губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота, фатальная семейная бессонница, где в качестве патологического

агента выступал прионный белок [24]. Но затем выяснилось, что прионы дрожжей помогают им адаптироваться к различным условиям окружающей среды [25]. А у млекопитающих они способны как вызывать различные заболевания и даже приводить к смерти, так и выполнять полезные функции, например, активировать врожденный клеточный иммунитет (белок MAVS), обеспечивать долговременную память (белок CREB) [26, 27], образовывать стресс гранулы во время действия неблагоприятных условий для клетки [28]. Многие белки содержат прионоподобные домены, которые наделяют белок свойствами близкими к прионам, в том числе и способность к самосборке. Например, аминокислотный состав прионоподобных доменов белков FUS (fused in sarcoma), TDP-43 (TAR DNA-binding protein-43), TIA1 (cytotoxic granule-associated RNA binding protein) имеют близкое сходство с прионными доменами дрожжевых белков, таких как Sup35, Ure2 [29]. Для последних характерно высокое содержание полярных аминокислотных остатков, таких как аспарагин, глутамин, тирозин и глицин. Эти домены наделяют белки способностью переходить из развернутой пространственной структуры в промежуточные состояния, которые в свою очередь предрасположены к различным конформационным переходам, в том числе и образованию амилоидных фибрилл [18, 30, 31]. Обычно такие белки находятся в динамическом равновесии между двумя формами: развернутыми растворимыми мономерами и подрасплавленными олигомерами. Эти подрасплавленные олигомеры могут быть вовлечены во множественные конформационные состояния (рис. 1). По одному сценарию они могут организоваться в структурированные амилоидогенные олигомеры, которые потом преобразуются в патологические агрегаты неамилоидного типа, или амилоидные фибриллы. Последние, в свою очередь, могут выступать в качестве «матрицы» для неправильного сворачивания по типу прионов. По другому сценарию белковые молекулы могут образовывать аморфные агрегаты, состоящие как из растворимых мономеров, так и расплавленных олигомеров, организованных в форме динамических кросс- $\beta$ -структур, которые проявляют свойства жидкостей, но могут образовывать и гелеобразные формы [32–34]. Состояние гидрогеля очень важно для образования различных немембранных структур, как стресс гранул, рибонуклеиновых комплексов и т.д. [31, 32, 35, 36]. Другими словами, прионоподобный домен необходим для агрегации на стадии конформационного перехода белка из жидкого состояния в гелеподобное для выполнения ряда жизненно важных функций, но в определенных условиях могут преобразовываться в необратимые амилоидные фибриллы.

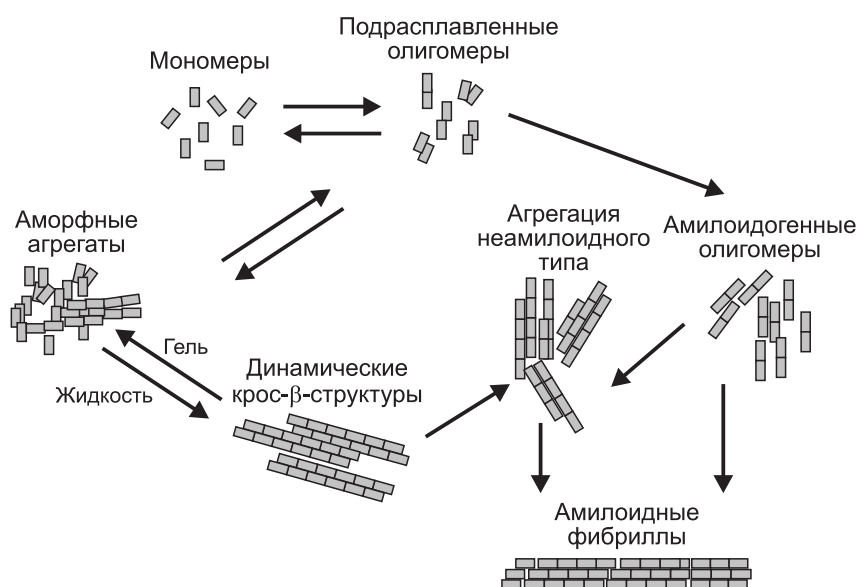


Рис. 1. Схематическое изображение прионов и прионоподобных доменов, которые могут приводить к различным конформационным состояниям и сценариям (модифицировано и адаптировано по [37]).

### III. ОБРАЗОВАНИЕ АМИЛОИДОВ, ПРИВОДЯЩЕЕ К ПАТОЛОГИИ

В последнее время появилась новая концепция о развитии ряда нейродегенеративных заболеваний. Она включила в себя идею о переходе или размножении белковых агрегатов от клетки к клетке, от одного отдела головного мозга к другому на протяжении развития болезни. Как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo* было показано, что при различных неврологических заболеваниях патогенные белки способны внедряться в клетку, находить подобные себе другие белки и затем выступать в качестве «матрицы» для патогенной агрегации [23, 38–41]. Таким образом, патологическое заражение клеток распространяется из очага поражения. Следует отметить, что случаи, при которых болезнь началась в различных областях мозга, необязательно исключают прионоподобный механизм своего разрастания. В этом случае каждый очаг поражения будет распространять болезнь независимо от других. Но какова молекулярная основа

распространения нейродегенерации по прионному механизму? Как эти белки могут принимать такую конформацию, при которой измененный белок может служить «матрицей» для «здоровых» белков, переводя последние в патологическое агрегированное состояние?

Образование нерастворимых фибрилл  $\beta$ -амилоида в тканях головного мозга также сопровождается многими нейродегенеративными заболеваниями, такие как болезнь Альцгеймера, синдром Дауна и др. А $\beta$ -пептид образуется в результате протеолитического расщепления белка-предшественника APP (Amyloid precursor protein). мРНК APP часто подвергается альтернативному сплайсингу, поэтому существует несколько его изоформ. В норме белки выполняют важные физиологические функции и ген APP экспрессируется почти во всех клетках. Изменение в протеолизе APP приводит к накоплению А $\beta$ -фрагментов, которые собираются в амилоидные фибриллы [42].

После обнаружения прионоподобных доменов в TDP-43 и FUS [18, 30, 31, 43] стало очевидно, что мутации в этих белках могут приводить к патогенным состояниям. Так, у белка TDP-43 мутации Q331K и M337V, которые расположены в прионоподобном домене, напрямую усиливают неправильное сворачивание. У белка FUS мутации, ассоциированные с боковым амиотрофическим склерозом (БАС), находятся в сигнале ядерной локализации NLS, в результате чего белок аккумулялируется в цитоплазме, что также способствует патологической агрегации. В норме белок FUS локализуется в ядре, хотя и периодически перемещается в цитоплазму и обратно [44–49]. Наряду с TDP-43 и FUS у 40-ка других РНК-связывающих белков обнаружили прионоподобные домены. Неудивительно, если они тоже будут иметь отношение к развитию БАС и похожих нейродегенеративных заболеваний. Как выяснилось, другие представители семейства FET TAF15 (TATA box binding protein (TBP)-associated factor) и EWS (Ewing sarcoma breakpoint region 1) также имеют отношение к болезням БАС и ФТД. Более того, в случае ФТД другой РНК-связывающий белок PSF (PTB-associated splicing factor) аномально накапливается в цитоплазме олигодендроцитов и формирует нерастворимую структуру [50]. Мутации в TIA1, являющемся важным белком для формирования СГ, найдены при заболеваниях формой миопатии Веландера (медленно прогрессирующая мышечная дистрофия) [51]. Были найдены и многие другие мутации в РНК-связывающих белках с прионоподобными доменами, которые ассоциированы с различными нейродегенеративными заболеваниями [52]. Это позволило предположить важность этого домена при развитии патологии.

#### IV. ОБРАЗОВАНИЕ АМИЛОИДОВ ПО ПРИОННОМУ МЕХАНИЗМУ НЕОБХОДИМО ДЛЯ НОРМАЛЬНОГО ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ КЛЕТОК

Свойство белковых молекул образовывать амилоидные структуры широко используется в живых организмах для различных специфических целей. В норме некоторые организмы образуют амилоидные фибриллы для выполнения различных функций. Один из самых хорошо изученных примеров таких функциональных амилоидов – курлин, который используется в *E. coli* для колонизации инертных поверхностей и является посредником при связывании с белками других организмов. Как и другие амилоидные структуры, данные фибриллы имеют толщину 6–12 нм в диаметре, обладают большой долей  $\beta$ -структуры (показано КД) и связывают тиофлавин Т и Конго красный [53]. Вторым примером могут служить бактерии *Streptomyces Coelicolor*, которые за счет формирования амилоидных фибрилл белками чаплин (chaplin proteins) образуют гифы, используемые для распространения спор [54].

В приведенных примерах процесс образования амилоидного ядра, с которого уже начнется рост агрегата, зависит от окружающих условий и регулируется определенным каскадом реакций. Контролируемое образование функциональных амилоидных агрегатов происходит и у млекопитающих. Например, меланосомы – это органеллы, дифференцирующиеся в меланоциты, ответственные за образование меланина в клетках кожи, внутри имеются фибриллярные образования, на которых образуются гранулы меланина. Эти фибриллярные образования имеют много схожего с амилоидами, они образованы из протеолитически отщепленного домена мембранного белка Pmel17 [55].

Обеспечение долговременной памяти также происходит по принципу образования фибрилл, где важную роль играет белок CREB – РНК-связывающий белок, способный регулировать локальную трансляцию мРНК в дендритах. Он способен стимулировать полиаденилирование мРНК, а его агрегация активирует трансляцию «молчащей» мРНК, накапливающейся в синаптических окончаниях [56]. N-домен CREB богат аспарагином и глутамином, один из признаков характерных для прионоподобных доменов.

Так, белок MAVS, который расположен на поверхности мембраны митохондрий, активирует врожденный противовирусный клеточный иммунитет. В агрегированном виде он способен взаимодействовать с цитоплазматическими рецепторами, опознающими паттерны, характерные для большинства патогенов, в результате чего активируется

каскад реакций, приводящий к синтезу  $\beta$ -интерферона [57, 58]. Этот белок также способен к агрегации по прионному механизму.

Приведенные выше примеры говорят о том, что даже в высокоорганизованных организмах образование амилоидов, локализованных в строго определенном месте и находящихся под жестким контролем, может быть физиологически полезным для выполнения специфических и специализированных биологических функций.

#### **V. БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ**

На первых этапах исследований химический анализ амилоидозов был затруднен тем, что в образцах, как человеческого происхождения, так и животного, образованные фибриллы часто обволакиваются другими тканевыми компонентами, что делает их невосприимчивыми к процедуре экстракции. Более жесткие методы экстракции, такие как воздействие сильными основаниями и кислотами, разрушают амилоидные структуры. Переломным моментом в химической идентификации амилоидных белков послужил тот факт, что интактные амилоидные фибриллы могут быть количественно экстрагированы из человеческих и животных тканей при помощи дистиллята и буферов с низкой ионной силой [10]. Процедура сводилась к следующему: образцы тканей несколько раз были проэкстрагированы в солевом растворе. После того как супернатант переставал показывать значительный сигнал оптической плотности на волне 280 нм, гранулы выдерживали в дистилляте до появления опалесцирующего раствора, который затем при осаждении солью давал осадок чистых, связанных с Конго красным, фибрилл на электронной микроскопии. Фибриллы затем могли быть денатурированы в 8 М мочевины или 6 М гуанидина хлорида и нанесены на хроматографическую колонку для дальнейшей очистки для анализа аминокислотной последовательности [59, 60]. Очевидно, что любые растворимые в солевом растворе продукты будут потеряны при смыве и, таким образом, будут затруднять определение критически важных молекул, приводящих к амилоидогенезу или токсичности. Химическая идентификация специфических предшественников позволила разработать иммуногистохимические реагенты, которые могли бы идентифицировать химическую природу амилоидов в образцах тканей без необходимости химической экстракции.

Первый идентифицированный и химически охарактеризованный амилоид являлся агрегатом легких цепей иммуноглобулина человека,



изолированного из тканей пациента с так называемым первичным амилоидозом и не ассоциированным с какими либо еще заболеваниями [61]. Последующие исследования показали, что тот же самый класс белков является предшественником амилоидных отложений при множественной миеломе [62]. Включенные в амилоид L-цепи и их фрагменты обладают сходной аминокислотной последовательностью с циркулирующими в сыворотке и /или моноклональными легкими цепями, изолированными из одного и того же пациента. Отложения в тканях сложены из интактных L-цепей и /или C-концевых фрагментов таких L-цепей, это означает, что фрагменты *in vivo*, подвергшиеся протеолизу, являются более амилоидогенными нежели интактные цепи, или отложения интактных цепей являются объектом протеолиза *in situ* [63]. Биосинтетические эксперименты с клетками костного мозга показали, что в некоторых случаях укороченные L-цепи могут быть продуктами синтеза, но эти эксперименты не были достаточно строгими для того, чтобы вычеркнуть гипотезу быстрого постсинтетического переваривания [64]. Дальнейшие эксперименты продемонстрировали, что фрагменты некоторых изолированных L-цепей, полученные при помощи обработки протеазами *in vitro*, образовывали амилоидоподобные фибриллы в пробирке [59, 65]. Основным результатом этих экспериментов можно назвать установление того факта, что амилоидогенный потенциал связан с аминокислотной последовательностью белка.

Последующие наблюдения позволили идентифицировать некоторые структурные особенности, делавшие некоторых членов данного класса белков более амилоидогенными по сравнению с другими [66]. Эксперименты с использованием рекомбинантных версий вариативного участка амилоидогенной IgL-цепи и не амилоидогенной IgL-цепи (полученной из амилоидогенной молекулы при помощи мутаций в некоторых аминокислотах) так же указали на различия, которые могут приводить к предрасположенности образовывать фибриллы [67]. С биофизической точки зрения множество последовательностей аминокислотных остатков L-цепей приводит к четырем потенциально растворимым формам, когда концентрация любой одиночной молекулы L-цепи увеличивается за счет клонирования при реакции иммунного ответа в ходе болезни.

Часть человеческих L-цепей иммуноглобулинов, порядка 15% из всех возможных вариантов L-цепей (преимущественно из  $\lambda$  класса), исключительно амилоидогенны, образуют отложения и приводят к дисфункции множества органов, особенно почек, сердце, желудка и периферических нервов [63].

Другая часть L-цепей способна образовывать нефибриллярные агрегаты и представляет сходную по сравнению с фибриллообразующими L-цепями угрозу для органов [63]. Случаи отложений обоих типов одного и того же белка в одном и том же индивиде редки, хотя и были зарегистрированы, это предполагает, что принимаемая конформация *in vivo* может быть связана с окружением пораженной ткани [68].

Третья часть обладает характерным признаком Бенса-Джонса (агрегация при специфических температурах (обычно 56 градусов) с последующей диссоциацией при повышении температуры), связана с агрегацией в почечных канальцах, где концентрация белка выше, рН ниже, и может приводить к дисфункции почки [69].

Четвертая часть L-цепей иммуноглобулинов человека, по-видимому, не выпадает в осадок при физиологических условиях, никак не агрегирует *in vivo* [70]. Точные структурные особенности, ответственные за широкое разнообразие в биофизических особенностях настолько похожих белков при физиологических условиях, в настоящий момент не известны.

Неудивительно, учитывая гомологию среди Ig-доменов, что были сообщения о редких случаях, в которых обособленные тяжелые цепи служили предшественниками для амилоидных агрегатов в контексте моноклонального производства В-клеток [71]. Первый не иммуноглобулиновый амилоид был изолирован из отложений примата с хроническим воспалением. Белок имел аминокислотную последовательность не похожую ни на последовательность амилоида, образованного иммуноглобулиновыми L-цепями, ни на последовательность любого другого секвенированного к тому моменту белка [72]. Одновременно сходный белок был изолирован и секвенирован из почки гражданина Израиля с периодической болезнью и вторичным (или ассоциированным с воспалением) амилоидозом [60]. Оба белка обладали сходной аминокислотной последовательностью, при этом последовательность с N-конца была практически идентичной, а отличающиеся аминокислоты не выбивались из частоты характерной для нормального полиморфизма остатков. Позже было обнаружено, что данный белок также образует амилоиды при длительном ревматоидном артрите (еще одно хроническое воспалительное заболевание) и является основным компонентом фибрилл в мышечных и кроличьих моделях [73].

На настоящий момент известно о более 30-ти амилоидных белках, признанных Международным комитетом по номенклатуре амилоидных белков [33, 50, 74, 75]. Предшественниками большинства из

них являются аполипопротеины A1 и A2, сывороточный амилоид A, а также различные протеогормоны и иммуноглобулины [76]. В отложениях были обнаружены также и другие молекулы, такие как аполипопротеин E (АпоЕ), SAP (Serum amyloid P component) и протеогликан перлекан [77–80]. При АА-амилоидозе (см. ниже) фибриллы образуются из отщепленного продукта SAA, концентрация которого увеличивается в ходе различных хронических воспалений и других системных заболеваний [81, 82]. Его нормальная функция интенсивно изучалась последние три десятилетия. Данный белок участвует в метаболизме жиров в макрофагах, участвующих в воспалении, также может выполнять и другие функции, например роль в ассоциированном с воспалением атерогенезе [74]. SAA был первым из пяти белков (другие – IAPP, Аβ-белок, прион, и белок Bg12, отложения которого находят при фатальной семейной бессоннице [83–86]), в которых отложение амилоида обеспечило доказательство нормально функционирующего растворимого предшественника, который был идентифицирован либо после того, как были наработаны соответствующие антитела к фибриллам и данные антитела связывались также с нормальным белком, либо после того, как при помощи кДНК идентифицировали соответствующий ген в нормальных тканях.

Что более важно, в ходе этих исследований были разработаны методы выделения, которые могли быть использованы для изучения фибрилл из любой ткани любого организма, например эти методы были использованы для выделения белков из конгофильных васкулярных и мозговых отложений Аβ [87, 88]. Внеклеточные молекулы матрикса и мембранные компоненты, такие как ламинин и тенаascin, также присутствовали в некоторых отложениях. По-видимому, такие молекулы способствуют как накоплению, так и формированию тканевых отложений. Было предположено, что дополнительные молекулы могут играть роль в стабилизации структуры фибрилл или обеспечивают среду, в которой фибрилогенез усиливается.

## VI. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ АМИЛОИДОЗА У ЖИВОТНЫХ

Начиная с 1960-ых годов животные модели становятся одним из способов изучения амилоидозов. С помощью введения определенной дозы казеина или адьюванта Фрейнда мышам и кроликам провоцировали развитие острого воспалительного процесса, который, в свою очередь, сопровождался накоплением окрашиваемых

Конго красным отложений в печени, почках и селезенке [89]. При этом удалось выяснить, что вследствие воспаления продукция цитокинов стимулирует образование амилоидного предшественника сывороточного амилоида А (SAA) [90]. Эта модель полностью отражает АА-амилоидоз человека, возникающий при воспалениях, и часто используется для изучения патогенеза. Высокий процент амилоидозов у человека связан с амилоидозом типа АА, так называемым вторичным или реактивным амилоидозом, когда в печени в ответ на любое хроническое воспаление начинают активно синтезироваться белки острой фазы – предшественники сывороточного амилоида А (SAA) [76]. Еще одна интересная особенность данной модели заключалась в том, что экстракты из селезенки уже зараженного животного при переносе другому могли конкурентно ускорять процесс отложения фибрилл. Явление такого ускорения было обосновано наличием фибриллярных фрагментов, которые могут служить зародышами для образования и отложения вновь образованных амилоидных предшественников [91]. Такие зародыши посредством присоединения мономеров к концам способны образовывать вытянутые протофибриллы, которые затем могут образовывать амилоидные фибриллы. Что интересно, мышьяная модель амилоидогенеза может быть запущена посредством введения зародышей ксеногенного происхождения, из чего можно сделать вывод, что зародыши обладают сходными структурными элементами [92, 93]. Сходный феномен был замечен для модели спонтанного амилоидогенеза у мышей линии SAMP1. Для этой линии характерно наличие изоформы белка ApoA2(C) с заменами: Gln на Pro в 5-ой позиции, Ala на Val в позиции 26 и Met на Val в позиции 38 [94]. Скорость накопления амилоидов у животных прямо пропорциональна возрасту, и, как оказалось, накопление амилоидов в молодых особях может быть ускорено введением препаратов, полученных из старых мышей [95, 96]. Рассмотренные модели характеризуются требованием содержания достаточного количества амилоидного предшественника, генетически обусловленным в одном случае (ApoA2-АА-амилоидоза) и искусственно стимулированным воспалением в другом случае АА-амилоидоза. Также возможно взаимное влияние ApoA2-АА, выражающееся либо при угнетении, либо при ускорении образования фибрилл [97].

Немаловажную роль при образовании амилоидных фибрилл играет белок ApoE. Так, потомство, полученное при скрещивании нокаутированных по гену *apoe*-(ApoE-/-) с трансгенными мышами с гиперэкспрессией мутантного белка человека APP-(PDAPP+/+) имело

много меньше отложений А $\beta$  в мозгу относительно трансгенных родителей (PDAPP+/+ ApoE+/+) [98, 99]. В результате этих исследований было предложено использовать белок ApoE в качестве терапевтической цели при лечении заболевания Альцгеймера [100]. Однако последующие исследования с нокаутрованными по гену *apoe* мышами показали, что такие мыши чувствительны к амилоидозу, вызываемому IAPP, настолько же, насколько мыши дикого типа. Есть также противоречивые свидетельства о том, увеличивается или уменьшается доля отложений в индуцированных воспалениями AA-амилоидозах [101–103]. Было показано, что белок SAP подавляет *in vitro* расщепление амилоидных фибрилл, но не за счёт прямого ингибирования этого процесса, а за счёт непосредственного связывания с фибриллами, закрывая таким образом потенциальные сайты расщепления от протеиназ [80]. Нокаутрованные по гену *sap* мыши имели меньшую скорость образования амилоидов в ответ на воспалительную стимуляцию, что согласуется с вышеприведенными наблюдениями, однако данные эксперименты не означают, что белок SAP является необходимым условием для образования фибрилл [104, 105]. Отсутствие жизнеспособных моделей, нокаутрованных по гену, кодирующему перлекан, сделали эксперименты подобные SAP невозможными. В то же время наблюдение экспрессии гена, кодирующего перлекан перед образованием амилоидных отложений в мышинной модели AA-амилоидоза в культуре тканей, а также эксперименты *in vitro*, показали ускорение образования фибрилл посредством воздействия как корового белка перлекана (перлекан – это гепарансульфат протеингликан), так и ассоциированных с ним цепей гепарансульфата и хондроитинсульфата. В частности, у трансгенных мышей с гиперэкспрессией гепараназы образование амилоидов ингибировалось. Более того, и другие сульфатированные глюкозаминогликаны, такие как гепарин, дерматансульфат, декстрансульфат и пентосан полисульфат, усиливали образование амилоидных фибрилл [106–109].

Очевидно, общее вовлечение рассмотренных молекул означает, что гомомолекулярная агрегация, связанная как с нуклеацией, так и с последующим ростом фибрилл, происходит в контексте гетеромолекулярных взаимодействий, некоторые из которых амилоидогенны, другие антиамилоидогенны.

Наблюдения за моделями позволили поднять важный вопрос о том, являются ли все амилоиды прионоподобными (то есть обладающими инфекционной активностью) и может ли такой феномен быть распространен на некоторые формы амилоидов, вызывающих нейро-

дегенеративные заболевания, способные распространяться по всему организму [110]. Следует, однако, учитывать различие между распространением амилоидов от клетки к клетке в ограниченном пространстве, где есть аутологичные белки и генетическая совместимость для непосредственной передачи от клетки к клетке, и распространением инфекционных прионов из внешней среды, что накладывает сильные требования по количеству и качеству взаимодействий между зародышем и будущими мономерами агрегата. Различие между прионами, находящимися в основном в фибриллярной форме, и прионами в инфекционной форме, а также видимое расслоение между фазой агрегации и фазой нейротоксичности в течение болезни может в некотором роде отражать приобретение или селекцию конформационной совместимости, необходимой для инфективности или токсичности [111, 112].

## **VII. ОСОБЕННОСТИ КИНЕТИКИ АМИЛОИДОБРАЗОВАНИЯ**

Для того чтобы описание процесса амилоидобразования было полным, необходимо установить все возможные конформационные состояния белка на пути его агрегации, а также возможные олигомерные структуры, образуемые в процессе амилоидобразования. Кроме того, описание не будет являться полным без соответствующего определения кинетических и термодинамических параметров для всех возможных форм и состояний белка в ходе агрегации. Следует отметить, что такие требования также включают в себя анализ агрегации на молекулярном уровне для последующего выявления участков, важных для всего процесса амилоидобразования. Общепринятой является точка зрения, что процесс амилоидобразования включает в себя стадию нуклеации. Процесс агрегации мономеров белка в фибриллу можно разделить на два этапа – лаг-период, в течение которого образуются зародыши, и время перехода всех мономеров в агрегат. Следует отметить, что последняя фаза варьирует в зависимости от белка и может носить как линейный характер, так и экспоненциальный [113]. Реакции, имеющие стадию нуклеации, вполне изучены как с теоретической, так и с экспериментальной точки зрения для широкого ряда веществ, в основном в контексте кристаллизации как для больших, так и для малых молекул [114].

Как и для других процессов, имеющих стадию нуклеации (включая и кристаллизацию), добавление затравок из уже сформировавшихся зародышей в ходе процесса амилоидобразования практически

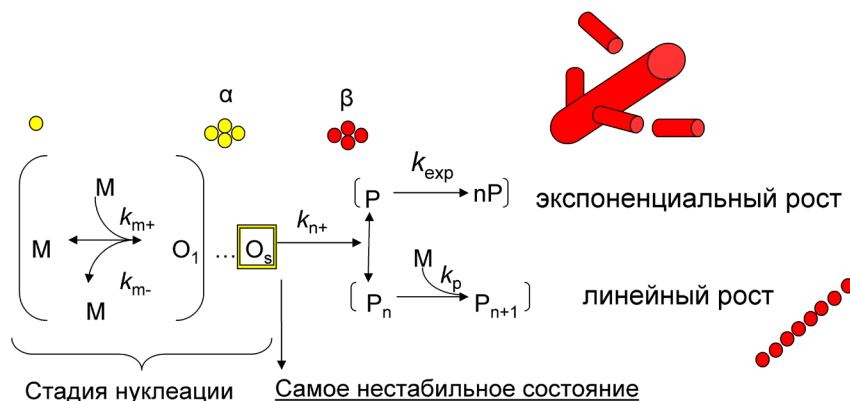


Рис. 2. Схематическое обобщение процесса амилоидообразования.

$k_{m+}$  – константа скорости присоединения мономера к олигомеру,  $k_{m-}$  – константа скорости отсоединения мономера от олигомера,  $k_{n+}$  – константа скорости перехода зародыша (олигомер, состоящий из  $s$  мономеров) из состояния  $\alpha$  в состояние  $\beta$ ,  $k_p$  – константа скорости полимеризации,  $k_{exp}$  – константа скорости экспоненциального увеличения концов растущей фибриллы.

нивелирует лаг-период, так как скорость агрегации больше не лимитирована стадией нуклеации [115, 116]. Было показано, что введение определенных мутаций в агрегирующие белки или определенные изменения в условиях эксперимента также могут практически нивелировать лаг-период, при этом предполагается, что нуклеация перестает быть лимитирующей стадией процесса [117–119]. Отсутствие лаг-периода, однако, не обязательно связано с тем, что описание механизма агрегации, имеющего стадию нуклеации, больше не применимо, а скорее означает, что время, необходимое для образования фибриллы, достаточно велико относительно скорости образования зародышей и, таким образом, нуклеация больше не является скорость-лимитирующей стадией на пути перехода белка из растворимой формы в амилоид. Несмотря на то, что в ходе лаг-периода фибриллы не образуются, понятно, что это важная стадия, в ходе которой образуются различные олигомеры, в том числе и те, что смогут послужить затравкой для образования зрелых фибрилл.

Эффективность сформированных фибрилл стимулировать агрегацию, выступая в качестве затравки, может сильно уменьшаться при увеличении различий в первичной структуре [120–122]. На примере иммуноглобулиновых доменов с различной первичной структурой было показано, что коагрегация между различными типами доменов

не наблюдается в тех случаях, когда идентичность первичной структуры была ниже 30–40% [121]. Биоинформатический анализ последовательно расположенных гомологичных доменов в больших мультидоменных белках показал идентичность менее 40%, что, возможно, свидетельствует о том, что первичная структура таких белков устроена таким образом, чтобы избежать агрегации.

В последнее десятилетие были предприняты значительные усилия для идентификации, выделения и описания олигомерных частиц, образующихся в растворе перед появлением фибрилл. Такой интерес к олигомерам вызван двумя причинами: по-видимому, образование таких частиц является важным этапом в ходе процесса амилоидобразования, также существуют все основания полагать, что олигомеры представляют наибольшую опасность в ходе патогенеза, то есть являются токсичными. В качестве примера можно рассмотреть амилоидобразование А $\beta$ -пептидом. Агрегации этого пептида предшествует формирование серии метастабильных нефибриллярных образований, наблюдаемых посредством АФМ и ТЕМ [123–126]. Некоторые из образований похожи на сферические бусинки диаметром 2–5 нм, другие похожи на бусинки, натянутые на леску, при этом индивидуальные бусинки, также имеют диаметр 2–5 нм, третьи образуют кольцевые структуры, образованные, по-видимому, замыканием структур, похожих на бусинки на леске. Все эти агрегаты, названные авторами, которые первыми их наблюдали, протофибриллами [123–126], не должны, однако, смешиваться с понятием протофиламенты – единичными нитями зрелых фибрилл. Протофибриллы, состоящие из А $\beta$ -пептида, могут связывать Конго красный и тиофлафин Т [126], содержат много  $\beta$ -структуры, а также состоят из ~20-ти молекул, образуя небольшие сферические частицы.

Аналогичные сферические и подобные бусам протофибриллярные образования были обнаружены также и в других системах, включая альфа-синуклеин [127], амилин [128], иммуноглобулиновые легкие цепи [129], транстиретин [130], поли-Q [128],  $\beta_2$ -микроглобулин [131], лизоцим [132], ацилфосфатаза из *Sulfolobus solfataricus* [133] и SH3-домен [134]. Данные образования можно охарактеризовать как богатые  $\beta$ -структурой частицы, имеющие достаточно высокую упорядоченность, позволяющую связывать Конго красный и тиофлафин Т. Стоит также отметить особенность – сродство специфических антител к протофибриллам, полученным из разных источников, отсутствие сродства к мономерным единицам, а также зрелым частицам, что предполагает наличие у растворимых олигомерных образований определенных сходных структурных элементов.



В некоторых случаях, по-видимому, протофибриллы являются побочными агрегатами [131, 135], однако имеются также и данные, говорящие о том, что протофибриллы являются состоянием, преодолеваемым белком на пути амилоидообразования [116, 123]. Оказалось, что переход из протофибриллы в зрелую фибриллу пептидом (109–122) из прионного белка Сирийского хомячка происходит через подгонку изначально не выравненных  $\beta$ -участков, образующих будущую фибриллу [136]. Такое выравнивание включает в себя отсоединение  $\beta$ -участков с последующим их включением в будущую фибриллу снова, однако возможен и вариант внутренней реорганизации  $\beta$ -участков, который реализуется в зависимости от условий [137]. Подытоживая вышесказанное, можно утверждать, что независимо от точной роли, играющей протофибриллами в ходе процесса формирования амилоидных фибрилл, установление механизма образования подобных олигомерных частиц, а также их структуры крайне важно и не в последнюю очередь в связи с подозрением последних быть основными токсичными образованиями, вовлеченными в нейродегенеративные заболевания.

Дальнейшее изучение олигомерных частиц, предшествующих образованию фибрилл, стало возможным благодаря методу фотоиндуцированного связывания немодифицированных белков (PICUP). Так оказалось, что растворимые олигомеры, образованные A $\beta$ -пептидом (как вариант 1–40, так и 1–42), существуют в динамическом равновесии с мономерной формой. Эти олигомеры состоят из 2–4-х мономеров для A $\beta$  1–40 и 5–6-ти для A $\beta$  1–42, и, как показывает КД, относительно неструктурированы [138]. Интерес к олигомерным образованиям A $\beta$  был вызван, в частности, тем фактом, что подобные частицы были обнаружены в мозгу больных болезнью Альцгеймера [139], а также в лизатах и концентрате среды с клетками, экспрессирующими белок предшественник A $\beta$  [140, 141].

Участок NM дрожжевого приона Sup35p также имеет тенденцию быстро образовывать структурно неорганизованные олигомеры. Только после образования таких частиц происходит переход с увеличением  $\beta$ -структуры, и уже после трансформации олигомеры могут служить заправками для фибрилл [116]. Переход может быть облегчен за счет ковалентной димеризации NM-молекул, если остатки в головной части N (25–38) кросс-перешиты. Более того, если олигомеры выдерживаются в среде, богатой кислородом, внутримолекулярные дисульфидные мостики образуются легче для тех молекул, у которых цистеины находятся в N-участке. Данные результаты свидетельствуют о том, что, возможно, взаимодействие

между двумя головными участками молекул N порождает зародыш для амилоидоподобной структуры внутри агрегата.

Сходное поведение было обнаружено для агрегации денатурированной дрожжевой фосфолицерат киназы при низких pH при помощи динамического рассеяния света и КД [142].

При этом отмечалась стабилизация  $\beta$ -структуры с увеличением размера агрегата. При накоплении критической массы олигомеры слипаются и образуют короткие искривленные протофибриллы, похожие на таковые, образуемые A $\beta$  и  $\alpha$ -синуклеином [142]. Более того, разворачивание SH3-домена из бычьей фосфотидилинозитол киназы приводит к быстрому образованию неструктурированных частиц различного размера, которые последовательно переходят в тонкие искривленные протофибриллы, связывающие тиофлавин T [134]. Таким образом, экспериментальные данные свидетельствуют о том, что структурированные протофибриллы, по-видимому, могут образовываться посредством слипания или реорганизации небольших относительно неструктурированных олигомеров, образующихся практически сразу с началом процесса агрегации.

## VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многие белки в природе способны образовывать амилоидные фибриллы. И, тем не менее, молекулярный механизм, лежащий в основе образования амилоидов, до сих пор остается неразгаданным. Это связано с тем, что огромное количество факторов может повлиять на конформационный переход из «нативного» белка в патологические агрегаты, включая высокую концентрацию белка, специфическое протеолитическое расщепление, мутации, взаимодействие с лигандами и многие другие еще не найденные факторы. До сих пор остается много вопросов относительно процесса агрегации белков. Удивительным фактом является то, что образование амилоидов характерно для всех живых организмов, от микроорганизмов до человека. На основании этого можно сделать вывод, что процесс образования амилоидных фибрилл прошел испытание на прочность эволюцией и сохранил консервативность структуры. Уникальные физико-химические свойства амилоидов и тот факт, что они образуются многими белками и этот процесс может регулироваться, а также широкое распространение в природе, подчеркивает биологическую необходимость этих формирований. Несмотря на большое разнообразие нейродегенеративных заболеваний и не только, которые связаны с образованием патологических

белковых агрегаций, можно предположить, что способность белков образовывать амилоидные агрегаты в первую очередь связана с выполнением многочисленных функций, поэтому библиотека белков, способных образовывать «функциональные» амилоиды, будет постоянно пополняться. Необходимы дальнейшие исследования для выяснения детального механизма формирования амилоидных фибрилл, выявления определенных детерминантов, влияющих на кинетику процесса. Но самое главное, найти возможные рычаги управления процессом агрегации, чтобы предотвратить развитие патологии и связанные с ними болезни, или наоборот использовать для улучшения здоровья, например для усиления противовирусного иммунитета или улучшения памяти.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains, *Science (New York, N.Y.)*, **181**, 223–230.
2. Neumann, M., Rademakers, R., Roeber, S., Baker, M., Kretzschmar, H.A., Mackenzie, I.R.A. (2009) A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology, *Brain: a journal of neurology*, **132**, 2922–2931.
3. Doi, H., Koyano, S., Suzuki, Y., Nukina, N., Kuroiwa, Y. (2010) The RNA-binding protein FUS/TLS is a common aggregate-interacting protein in polyglutamine diseases, *Neuroscience research*, **66**, 131–133.
4. Kwiatkowski, T.J., Jr, Bosco, D.A., Leclerc, A.L., Tamrazian, E., Vanderburg, C.R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E.J., Munsat, T., Valdmanis, P., Rouleau, G.A., Hosler, B.A., Cortelli, P., de Jong, P.J., Yoshinaga, Y., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., Yan, J., Ticozzi, N., Siddique, T., McKenna-Yasek, D., Sapp, P.C., Horvitz, H.R., Landers, J.E., Brown, R.H., Jr. (2009) Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis, *Science (New York, N.Y.)*, **323**, 1205–1208.
5. Vance, C., Rogelj, B., Hortobágyi, T., De Vos, K.J., Nishimura, A.L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., Ganesalingam, J., Williams, K.L., Tripathi, V., Al-Sarraj, S., Al-Chalabi, A., Leigh, P.N., Blair, I.P., Nicholson, G., de Belle-roche, J., Gallo, J.-M., Miller, C.C., Shaw, C.E. (2009) Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6, *Science (New York, N.Y.)*, **323**, 1208–1211.
6. Sunde, M., Blake, C. (1997) The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction, *Advances in protein chemistry*, **50**, 123–159.
7. Perutz, M.F., Finch, J.T., Berriman, J., Lesk, A. (2002) Amyloid fibers are water-filled nanotubes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 5591–5595.
8. Virchow, R. (1857) Neue beobachtungen über amyloid degeneration, *Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin*, **11**, 188–189.

9. Divry, P., Florkin, M. (1927) Sur les proprietes optiques de l'amyloide, *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et des ses Filiales (Paris)*, **97**, 1808–1810.
10. Pras, M., Schubert, M., Zucker-Franklin, D., Rimon, A., Franklin, E.C. (1968) The characterization of soluble amyloid prepared in water, *The Journal of clinical investigation*, **47**, 924–933.
11. Bennhold, H. (1923) Uber die Ausscheidung intravenous einverbleibten Kongorotes bei den verschiedensten Erkrankungen insbesondere bei Amyloidosis, *Deutsches Archiv Fur Klinische Medizin*, **142**, 32–46.
12. Ouchi, E., Nomura, N., Watabe, S., Seiji, K., Sato, J. (1976) Clinical significance of Congo red test, *The Tohoku journal of experimental medicine*, **118**, 191–198.
13. Linke, R. (Springer US, 2006). in *Protein Misfolding, Aggregation, and Conformational Diseases*, (Uversky, V. & Fink, A.) **4**, 239–276.
14. Groenning, M. (2010) Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status, *Journal of chemical biology*, **3**, 1–18.
15. Xu, H., He, X., Zheng, H., Huang, L.J., Hou, F., Yu, Z., de la Cruz, M.J., Borkowski, B., Zhang, X., Chen, Z.J., Jiang, Q.-X. (2014) Structural basis for the prion-like MAVS filaments in antiviral innate immunity, *eLife*, **3**, e01489.
16. Narkiewicz, J., Giachin, G., Legname, G. (2014) In vitro aggregation assays for the characterization of  $\alpha$ -synuclein prion-like properties, *Prion*, **8**, 19–32.
17. Sydow, A., Mandelkow, E.-M. (2010) «Prion-like» propagation of mouse and human tau aggregates in an inducible mouse model of tauopathy, *Neuro-degenerative diseases*, **7**, 28–31.
18. Kato, M., Han, T.W., Xie, S., Shi, K., Du, X., Wu, L. C., Mirzaei, H., Goldsmith, E.J., Longgood, J., Pei, J., Grishin, N.V., Frantz, D.E., Schneider, J.W., Chen, S., Li, L., Sawaya, M.R., Eisenberg, D., Tycko, R., McKnight, S.L. (2012) Cell-free Formation of RNA Granules: Low Complexity Sequence Domains Form Dynamic Fibers within Hydrogels, *Cell*, **149**, 753–767.
19. Сулацкая А., Кузнецова И. (2010) Взаимодействие тиофлавина Т с амилоидными фибриллами как инструмент для изучения их структуры, *Цитология*, **52**, 955–959.
20. Biancalana, M., Koide, S. (2010) Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils, *Biochimica et biophysica acta*, **1804**, 1405–1412.
21. Gendoo, D.M.A., Harrison, P.M. (2011) Origins and evolution of the HET-s prion-forming protein: searching for other amyloid-forming solenoids, *PLoS one*, **6**, e27342.
22. King, O.D., Gitler, A.D., Shorter, J. (2012) The tip of the iceberg: RNA-binding proteins with prion-like domains in neurodegenerative disease, *Brain research*, **1462**, 61–80.
23. Aguzzi, A., Rajendran, L. (2009) The transcellular spread of cytosolic amyloids, prions, and prionoids, *Neuron*, **64**, 783–790.
24. Prusiner, S.B., Scott, M.R., DeArmond, S.J., Cohen, F.E. (1998) Prion protein biology, *Cell*, **93**, 337–348.
25. Halfmann, R., Alberti, S., Lindquist, S. (2010) Prions, protein homeostasis, and phenotypic diversity, *Trends in cell biology*, **20**, 125–133.
26. Hou, F., Sun, L., Zheng, H., Skaug, B., Jiang, Q.-X., Chen, Z.J. (2011) MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response, *Cell*, **146**, 448–461.

27. Bailey, C.H., Kandel, E.R., Si, K. (2004) The persistence of long-term memory: a molecular approach to self-sustaining changes in learning-induced synaptic growth, *Neuron*, **44**, 49–57.
28. Gilks, N., Kedersha, N., Ayodele, M., Shen, L., Stoecklin, G., Dember, L.M., Anderson, P. (2004) Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1, *Molecular biology of the cell*, **15**, 5383–5398.
29. Shorter, J., Lindquist, S. (2004) Hsp104 catalyzes formation and elimination of self-replicating Sup35 prion conformers, *Science (New York, N.Y.)*, **304**, 1793–1797.
30. Halfmann, R., Alberti, S., Krishnan, R., Lyle, N., O'Donnell, C.W., King, O.D., Berger, B., Pappu, R.V., Lindquist, S. (2011) Opposing effects of glutamine and asparagine govern prion formation by intrinsically disordered proteins, *Molecular cell*, **43**, 72–84.
31. Han, T.W., Kato, M., Xie, S., Wu, L.C., Mirzaei, H., Pei, J., Chen, M., Xie, Y., Allen, J., Xiao, G., McKnight, S.L. (2012) Cell-free formation of RNA granules: bound RNAs identify features and components of cellular assemblies, *Cell*, **149**, 768–779.
32. Sun, Z., Diaz, Z., Fang, X., Hart, M.P., Chesi, A., Shorter, J., Gitler, A.D. (2011) Molecular determinants and genetic modifiers of aggregation and toxicity for the ALS disease protein FUS/TLS, *PLoS biology*, **9**, e1000614.
33. Wickner, R.B., Taylor, K.L., Edskes, H.K., Maddelein, M.L. (2000) Prions: Portable prion domains, *Current biology*, **10**, 335–337.
34. Li, L., Lindquist, S. (2000) Creating a protein-based element of inheritance, *Science (New York, N.Y.)*, **287**, 661–664.
35. Kaiser, T.E., Intine, R.V., Dunder, M. (2008) De novo formation of a subnuclear body, *Science (New York, N.Y.)*, **322**, 1713–1717.
36. Shevtsov, S.P., Dunder, M. (2011) Nucleation of nuclear bodies by RNA, *Nature cell biology*, **13**, 167–173.
37. Li, Y.R., King, O.D., Shorter, J., Gitler, A.D. (2013) Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis, *The Journal of cell biology*, **201**, 361–372.
38. Cushman, M., Johnson, B.S., King, O.D., Gitler, A.D., Shorter, J. (2010) Prion-like disorders: blurring the divide between transmissibility and infectivity, *Journal of cell science*, **123**, 1191–1201.
39. Frost, B., Diamond, M.I. (2010) Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases, *Nature reviews. Neuroscience*, **11**, 155–159.
40. Braak, H., Rüb, U., Gai, W.P., Del Tredici, K. (2003) Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen, *Journal of neural transmission*, **110**, 517–536.
41. Ravits, J.M., La Spada, A.R. (2009) ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread: deconstructing motor neuron degeneration, *Neurology*, **73**, 805–811.
42. Selkoe, D.J. (1999) Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease, *Nature*, **399**, 23–31.
43. Alberti, S., Halfmann, R., King, O., Kapila, A., Lindquist, S. (2009) A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins, *Cell*, **137**, 146–158.
44. Dormann, D., Rodde, R., Edbauer, D., Bentmann, E., Fischer, I., Hruscha, A., Than, M.E., Mackenzie, I.R.A., Capell, A., Schmid, B., Neumann, M., Haass, C. (2010) ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import, *The EMBO journal*, **29**, 2841–2857.

45. Gal, J., Zhang, J., Kwinter, D.M., Zhai, J., Jia, H., Jia, J., Zhu, H. (2011) Nuclear localization sequence of FUS and induction of stress granules by ALS mutants, *Neurobiology of aging*, **32**, 27–40.
46. Ito, D., Seki, M., Tsunoda, Y., Uchiyama, H., Suzuki, N. (2011) Nuclear transport impairment of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations in FUS/TLS, *Annals of neurology*, **69**, 152–162.
47. Kino, Y., Washizu, C., Aquilanti, E., Okuno, M., Kurosawa, M., Yamada, M., Doi, H., Nukina, N. (2011) Intracellular localization and splicing regulation of FUS/TLS are variably affected by amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations, *Nucleic acids research*, **39**, 2781–2798.
48. Niu, C., Zhang, J., Gao, F., Yang, L., Jia, M., Zhu, H., Gong, W. (2012) FUS-NLS/Transportin 1 complex structure provides insights into the nuclear targeting mechanism of FUS and the implications in ALS, *PLoS one*, **7**, e47056.
49. Zhang, Z.C., Chook, Y.M. (2012) Structural and energetic basis of ALS-causing mutations in the atypical proline-tyrosine nuclear localization signal of the Fused in Sarcoma protein (FUS), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 12017–12021.
50. Seyfried, N.T., Gozal, Y.M., Donovan, L.E., Herskowitz, J.H., Damer, E.B., Xia, Q., Ku, L., Chang, J., Duong, D.M., Rees, H.D., Cooper, D.S., Glass, J.D., Gearing, M., Tansey, M.G., Lah, J.J., Feng, Y., Levey, A.I., Peng, J. (2012) Quantitative analysis of the detergent-insoluble brain proteome in frontotemporal lobar degeneration using SILAC internal standards, *Journal of proteome research*, **11**, 2721–2738.
51. Klar, J., Sobol, M., Melberg, A., Mäbert, K., Ameer, A., Johansson, A.C.V., Feuk, L., Entesarian, M., Orlén, H., Casar-Borota, O., Dahl, N. (2013) Welander distal myopathy caused by an ancient founder mutation in TIA1 associated with perturbed splicing, *Human mutation*, **34**, 572–577.
52. Sawaya, M.R., Sambashivan, S., Nelson, R., Ivanova, M.I., Sievers, S.A., Apostol, M.I., Thompson, M.J., Balbirnie, M., Wiltzius, J.J.W., McFarlane, H.T., Madsen, A.Ø., Riekel, C., Eisenberg, D. (2007) Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers, *Nature*, **447**, 453–457.
53. Chapman, M.R., Robinson, L.S., Pinkner, J.S., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., Normark, S., Hultgren, S.J. (2002) Role of Escherichia coli curli operons in directing amyloid fiber formation, *Science (New York, N.Y.)*, **295**, 851–855.
54. Claessen, D., Rink, R., de Jong, W., Siebring, J., de Vreugd, P., Boersma, F.G.H., Dijkhuizen, L., Wosten, H.A.B. (2003) A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in Streptomyces coelicolor by forming amyloid-like fibrils, *Genes & development*, **17**, 1714–1726.
55. Berson, J.F., Theos, A.C., Harper, D.C., Tenza, D., Raposo, G., Marks, M.S. (2003) Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis, *The Journal of cell biology*, **161**, 521–533.
56. Tompa, P., Friedrich, P. (1998) Prion proteins as memory molecules: an hypothesis, *Neuroscience*, **86**, 1037–1043.
57. Onoguchi, K., Onomoto, K., Takamatsu, S., Jogi, M., Takemura, A., Morimoto, S., Julkunen, I., Namiki, H., Yoneyama, M., Fujita, T. (2010) Virus-infection or 5'ppp-RNA activates antiviral signal through redistribution of IPS-1 mediated by MFN1, *PLoS pathogens*, **6**, e1001012.

58. Jacobs, J.L., Coyne, C.B. (2013) Mechanisms of MAVS regulation at the mitochondrial membrane, *Journal of molecular biology*, **425**, 5009–5019.
59. Glenner, G.G., Ein, D., Eanes, E.D., Bladen, H.A., Terry, W., Page, D.L. (1971) Creation of «amyloid» fibrils from Bence Jones proteins in vitro, *Science (New York, N.Y.)*, **174**, 712–714.
60. Levin, M., Franklin, E.C., Frangione, B., Pras, M. (1972) The amino acid sequence of a major nonimmunoglobulin component of some amyloid fibrils, *The Journal of clinical investigation*, **51**, 2773–2776.
61. 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 (New York, N.Y.)*, **172**, 1150–1151.
62. Terry, W.D., Page, D.L., Kimura, S., Isobe, T., Osserman, E.F., Glenner, G.G. (1973) Structural identity of Bence Jones and amyloid fibril proteins in a patient with plasma cell dyscrasia and amyloidosis, *The Journal of clinical investigation*, **52**, 1276–1281.
63. Buxbaum, J. (1992) Mechanisms of disease: monoclonal immunoglobulin deposition. Amyloidosis, light chain deposition disease, and light and heavy chain deposition disease, *Hematology/oncology clinics of North America*, **6**, 323–346.
64. Buxbaum, J. (1986) Aberrant immunoglobulin synthesis in light chain amyloidosis. Free light chain and light chain fragment production by human bone marrow cells in short-term tissue culture, *The Journal of clinical investigation*, **78**, 798–806.
65. Linke, R.P., Zucker-Franklin, D., Franklin, E.D. (1973) Morphologic, chemical, and immunologic studies of amyloid-like fibrils formed from Bence Jones Proteins by proteolysis, *Journal of immunology*, **111**, 10–23.
66. Stevens, F.J. (2000) Four structural risk factors identify most fibril-forming kappa light chains, *Amyloid: the international journal of experimental and clinical investigation: the official journal of the International Society of Amyloidosis*, **7**, 200–211.
67. Hurle, M.R., Helms, L.R., Li, L., Chan, W., Wetzel, R. (1994) A role for destabilizing amino acid replacements in light-chain amyloidosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 5446–5450.
68. Kaplan, B., Vidal, R., Kumar, A., Ghiso, J., Frangione, B., Gallo, G. (1997) Amino-terminal identity of co-existent amyloid and non-amyloid immunoglobulin kappa light chain deposits. A human disease to study alterations of protein conformation, *Clinical and experimental immunology*, **110**, 472–478.
69. Putnam, F.W., Easley, C.W., Lynn, L.T., Ritchie, A.E., Phelps, R.A. (1959) The heat precipitation of Bence-Jones proteins. I. Optimum conditions, *Archives of biochemistry and biophysics*, **83**, 115–130.
70. Solomon, A., Weiss, D.T., Kattine, A.A. (1991) Nephrotoxic potential of Bence Jones proteins, *The New England journal of medicine*, **324**, 1845–1851.
71. Eulitz, M., Weiss, D.T., Solomon, A. (1990) Immunoglobulin heavy-chain-associated amyloidosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**, 6542–6546.
72. 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 letters*, **19**, 169–173.
73. Sletten, K., Husby, G. (1974) The complete amino-acid sequence of non-immunoglobulin amyloid fibril

- protein AS in rheumatoid arthritis, *European journal of biochemistry*, **41**, 117–125.
74. Manley, P.N., Ancsin, J.B., Kisilevsky, R. (2006) Rapid recycling of cholesterol: the joint biologic role of C-reactive protein and serum amyloid A, *Medical hypotheses*, **66**, 784–792.
  75. Chapman, M.R., Robinson, L.S., Pinkner, J.S., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., Normark, S., Hultgren, S.J. (2002) Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation, *Science (New York, N.Y.)*, **295**, 851–855.
  76. Röcken, C., Shakespeare, A. (2002) Pathology, diagnosis and pathogenesis of AA amyloidosis, *Virchows Archiv: an international journal of pathology*, **440**, 111–122.
  77. Skinner, M., Cohen, A.S. (1988) Amyloid P component, *Methods in enzymology*, **163**, 523–536.
  78. Ancsin, J.B. (2003) Amyloidogenesis: historical and modern observations point to heparan sulfate proteoglycans as a major culprit, *Amyloid: the international journal of experimental and clinical investigation: the official journal of the International Society of Amyloidosis*, **10**, 67–79.
  79. Gallo, G., Wisniewski, T., Choi-Miura, N.H., Ghiso, J., Frangione, B. (1994) Potential role of apolipoprotein-E in fibrillogenesis, *The American journal of pathology*, **145**, 526–530.
  80. Tennent, G.A., Lovat, L.B., Pepys, M.B. (1995) Serum amyloid P component prevents proteolysis of the amyloid fibrils of Alzheimer disease and systemic amyloidosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 4299–4303.
  81. Husby, G., Natvig, J.B. (1974) A serum component related to nonimmunoglobulin amyloid protein AS, a possible precursor of the fibrils, *The Journal of clinical investigation*, **53**, 1054–1061.
  82. Husby, G., Husebekk, A., Skogen, B., Sletten, K., Marhaug, G., Magnus, J., Syversen, V. (1988) Serum amyloid A (SAA)--the precursor of protein AA in secondary amyloidosis, *Advances in experimental medicine and biology*, **243**, 185–192.
  83. Westermark, P., Wernstedt, C., Wilander, E., Hayden, D.W., O'Brien, T.D., Johnson, K.H. (1987) Amyloid fibrils in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat are derived from a neuropeptide-like protein also present in normal islet cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**, 3881–3885.
  84. Masters, C.L., Multhaup, G., Simms, G., Pottgiesser, J., Martins, R. N., Beyreuther, K. (1985) Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels, *The EMBO journal*, **4**, 2757–2763.
  85. Oesch, B., Westaway, D., Wälchli, M., McKinley, M.P., Kent, S.B., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.B., Hood, L.E. (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein, *Cell*, **40**, 735–746.
  86. Vidal, R., Frangione, B., Rostagno, A., Mead, S., Révész, T., Plant, G., Ghiso, J. (1999) A stop-codon mutation in the BRI gene associated with familial British dementia, *Nature*, **399**, 776–781.
  87. Glenner, G.G. (1980) Amyloid deposits and amyloidosis. The beta-fibrilloses (first of two parts), *The New England journal of medicine*, **302**, 1283–1292.
  88. Glenner, G.G., Wong, C.W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein, *Biochemical and biophysical*



- cal research communications*, **120**, 885–890.
89. Gruys, E., Snel, F.W. (1994) Animal models for reactive amyloidosis, *Baillière's clinical rheumatology*, **8**, 599–611.
90. Solomon, A., Weiss, D.T., Schell, M., Hrnčić, R., Murphy, C.L., Wall, J., McGavin, M.D., Pan, H.J., Kabalka, G.W., Paulus, M.J. (1999) Transgenic mouse model of AA amyloidosis, *The American journal of pathology*, **154**, 1267–1272.
91. Liu, Y., Cui, D., Hoshii, Y., Kawano, H., Une, Y., Gondo, T., Ishihara, T. (2007) Induction of murine AA amyloidosis by various homogeneous amyloid fibrils and amyloid-like synthetic peptides, *Scandinavian journal of immunology*, **66**, 495–500.
92. Johan, K., Westermark, G., Engström, U., Gustavsson, A., Hultman, P., Westermark, P. (1998) Acceleration of amyloid protein A amyloidosis by amyloid-like synthetic fibrils, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 2558–2563.
93. Lundmark, K., Westermark, G.T., Olsén, A., Westermark, P. (2005) Protein fibrils in nature can enhance amyloid protein A amyloidosis in mice: Cross-seeding as a disease mechanism, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 6098–6102.
94. Korenaga, T., Fu, X., Xing, Y., Matsusita, T., Kuramoto, K., Syumiya, S., Hasegawa, K., Naiki, H., Ueno, M., Ishihara, T., Hosokawa, M., Mori, M., Higuchi, K. (2004) Tissue distribution, biochemical properties, and transmission of mouse type A AApoAII amyloid fibrils, *The American journal of pathology*, **164**, 1597–1606.
95. Xing, Y., Nakamura, A., Chiba, T., Kogishi, K., Matsushita, T., Li, F., Guo, Z., Hosokawa, M., Mori, M., Higuchi, K. (2001) Transmission of Mouse Senile Amyloidosis, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, **81**, 493–499.
96. Elliott-Bryant, R., Cathcart, E.S. (1998) Amyloid enhancing factor and dietary transmission in accelerated amyloid A amyloidosis, *Clinical immunology and immunopathology*, **88**, 65–69.
97. Yan, J., Fu, X., Ge, F., Zhang, B., Yao, J., Zhang, H., Qian, J., Tomozawa, H., Naiki, H., Sawashita, J., Mori, M., Higuchi, K. (2007) Cross-seeding and cross-competition in mouse apolipoprotein A-II amyloid fibrils and protein A amyloid fibrils, *The American journal of pathology*, **171**, 172–180.
98. Bales, K.R., Verina, T., Dodel, R.C., Du, Y., Altstiel, L., Bender, M., Hyslop, P., Johnstone, E.M., Little, S.P., Cummins, D.J., Piccardo, P., Ghetti, B., Paul, S.M. (1997) Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition, *Nature genetics*, **17**, 263–264.
99. Wisniewski, T., Castaño, E.M., Golabek, A., Vogel, T., Frangione, B. (1994) Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro, *The American journal of pathology*, **145**, 1030–1035.
100. Holtzman, D.M. (2004) In vivo effects of ApoE and clusterin on amyloid-beta metabolism and neuropathology, *Journal of molecular neuroscience: MN*, **23**, 247–254.
101. Vidal, J., Verchere, C.B., Andrikopoulos, S., Wang, F., Hull, R.L., Cnop, M., Olin, K.L., LeBoeuf, R.C., O'Brien, K.D., Chait, A., Kahn, S.E. (2003) The effect of apolipoprotein E deficiency on islet amyloid deposition in human islet amyloid polypeptide transgenic mice, *Diabetologia*, **46**, 71–79.
102. Kindy, M.S., Rader, D.J. (1998) Reduction in amyloid A amyloid

- formation in apolipoprotein-E-deficient mice, *The American journal of pathology*, **152**, 1387–1395.
103. Elliott-Bryant, R., Cathcart, E.S. (1997) Apolipoprotein E and apolipoprotein A-I knock-out mice readily develop amyloid A protein amyloidosis, *Clinical immunology and immunopathology*, **85**, 104–108.
  104. Botto, M., Hawkins, P.N., Bickerstaff, M.C., Herbert, J., Bygrave, A.E., McBride, A., Hutchinson, W.L., Tennent, G.A., Walport, M.J., Pepys, M.B. (1997) Amyloid deposition is delayed in mice with targeted deletion of the serum amyloid P component gene, *Nature medicine*, **3**, 855–859.
  105. Togashi, S., Lim, S.K., Kawano, H., Ito, S., Ishihara, T., Okada, Y., Nakano, S., Kinoshita, T., Horie, K., Episkopou, V., Gottesman, M.E., Costantini, F., Shimada, K., Maeda, S. (1997) Serum amyloid P component enhances induction of murine amyloidosis, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, **77**, 525–531.
  106. Castillo, G.M., Lukito, W., Wight, T.N., Snow, A.D. (1999) The sulfate moieties of glycosaminoglycans are critical for the enhancement of beta-amyloid protein fibril formation, *Journal of neurochemistry*, **72**, 1681–1687.
  107. Li, J.-P., Galvis, M.L.E., Gong, F., Zhang, X., Zcharia, E., Metzger, S., Vlodavsky, I., Kisilevsky, R., Lindahl, U. (2005) In vivo fragmentation of heparan sulfate by heparanase overexpression renders mice resistant to amyloid protein A amyloidosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 6473–6477.
  108. Ailles, L., Kisilevsky, R., Young, I.D. (1993) Induction of perlecan gene expression precedes amyloid formation during experimental murine AA amyloidogenesis, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, **69**, 443–448.
  109. Elimova, E., Kisilevsky, R., Szarek, W.A., Ancsin, J.B. (2004) Amyloidogenesis recapitulated in cell culture: a peptide inhibitor provides direct evidence for the role of heparan sulfate and suggests a new treatment strategy, *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **18**, 1749–1751.
  110. Lundmark, K., Westermark, G.T., Nyström, S., Murphy, C. L., Solomon, A., Westermark, P. (2002) Transmissibility of systemic amyloidosis by a prion-like mechanism, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 6979–6984.
  111. Solomon, I.H., Schepker, J.A., Harris, D.A. (2010) Prion neurotoxicity: insights from prion protein mutants, *Current issues in molecular biology*, **12**, 51–61.
  112. Sandberg, M.K., Al-Doujaily, H., Sharps, B., Clarke, A.R., Collinge, J. (2011) Prion propagation and toxicity in vivo occur in two distinct mechanistic phases, *Nature*, **470**, 540–542.
  113. 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, *The journal of physical chemistry. B*, **118**, 1189–1197.
  114. Chayen, N.E. (2005) Methods for separating nucleation and growth in protein crystallisation, *Progress in biophysics and molecular biology*, **88**, 329–337.
  115. Naiki, H., Hashimoto, N., Suzuki, S., Kimura, H., Nakakuki, K., Gejyo, F. (1997) Establishment of a kinetic model of dialysis-related amyloid fibril extension *in vitro*, *Amyloid*, **4**, 223–232.

116. Serio, T.R., Cashikar, A.G., Kowal, A.S., Sawicki, G.J., Moslehi, J.J., Serpell, L., Arnsdorf, M.F., Lindquist, S.L. (2000) Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant, *Science (New York, N.Y.)*, **289**, 1317–1321.
117. Uversky, V.N., Li, J., Souillac, P., Millett, I.S., Doniach, S., Jakes, R., Goedert, M., Fink, A.L. (2002) Biophysical properties of the synucleins and their propensities to fibrillate: inhibition of alpha-synuclein assembly by beta- and gamma-synucleins, *The Journal of biological chemistry*, **277**, 11970–11978.
118. Pedersen, J.S., Christensen, G., Otzen, D.E. (2004) Modulation of S6 fibrillation by unfolding rates and gatekeeper residues, *Journal of molecular biology*, **341**, 575–588.
119. Fezoui, Y., Teplow, D.B. (2002) Kinetic studies of amyloid beta-protein fibril assembly. Differential effects of alpha-helix stabilization, *The Journal of biological chemistry*, **277**, 36948–36954.
120. Tanaka, M., Chien, P., Yonekura, K., Weissman, J.S. (2005) Mechanism of cross-species prion transmission: an infectious conformation compatible with two highly divergent yeast prion proteins, *Cell*, **121**, 49–62.
121. Wright, C.F., Teichmann, S.A., Clarke, J., Dobson, C.M. (2005) The importance of sequence diversity in the aggregation and evolution of proteins, *Nature*, **438**, 878–881.
122. Krebs, M.R.H., Morozova-Roche, L.A., Daniel, K., Robinson, C.V., Dobson, C.M. (2004) Observation of sequence specificity in the seeding of protein amyloid fibrils, *Protein science: a publication of the Protein Society*, **13**, 1933–1938.
123. Harper, J.D., Lieber, C.M., Lansbury, P.T., Jr. (1997) Atomic force microscopic imaging of seeded fibril formation and fibril branching by the Alzheimer's disease amyloid-beta protein, *Chemistry & biology*, **4**, 951–959.
124. Harper, J.D., Wong, S.S., Lieber, C.M., Lansbury, P.T. (1997) Observation of metastable Abeta amyloid protofibrils by atomic force microscopy, *Chemistry & biology*, **4**, 119–125.
125. Walsh, D.M., Lomakin, A., Benedek, G.B., Condron, M.M., Teplow, D.B. (1997) Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate, *The Journal of biological chemistry*, **272**, 22364–22372.
126. Walsh, D.M., Hartley, D.M., Kusumoto, Y., Fezoui, Y., Condron, M.M., Lomakin, A., Benedek, G.B., Selkoe, D.J., Teplow, D.B. (1999) Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates, *The Journal of biological chemistry*, **274**, 25945–25952.
127. Conway, K.A., Harper, J.D., Lansbury, P.T., Jr. (2000) Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid, *Biochemistry*, **39**, 2552–2563.
128. Kaye, R., Sokolov, Y., Edmonds, B., McIntire, T.M., Milton, S.C., Hall, J.E., Glabe, C.G. (2004) Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases, *The Journal of biological chemistry*, **279**, 46363–46366.
129. Ionescu-Zanetti, C., Khurana, R., Gillespie, J.R., Petrick, J.S., Trabachino, L.C., Minert, L.J., Carter, S.A., Fink, A.L. (1999) Monitoring the assembly of Ig light-chain amyloid fibrils by atomic force microscopy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 13175–13179.
130. Quintas, A., Vaz, D.C., Cardoso, I., Saraiva, M.J., Brito, R.M. (2001) Tetramer dissociation and

- monomer partial unfolding precedes protofibril formation in amyloidogenic transthyretin variants, *The Journal of biological chemistry*, **276**, 27207–27213.
131. Gosal, W.S., Morten, I.J., Hewitt, E.W., Smith, D.A., Thomson, N.H., Radford, S.E. (2005) Competing pathways determine fibril morphology in the self-assembly of beta2-microglobulin into amyloid, *Journal of molecular biology*, **351**, 850–864.
132. Malisaukas, M., Zamotin, V., Jass, J., Noppe, W., Dobson, C.M., Morozova-Roche, L. A. (2003) Amyloid protofilaments from the calcium-binding protein equine lysozyme: formation of ring and linear structures depends on pH and metal ion concentration, *Journal of molecular biology*, **330**, 879–890.
133. Plakoutsi, G., Taddei, N., Stefani, M., Chiti, F. (2004) Aggregation of the Acylphosphatase from *Sulfolobus solfataricus*: the folded and partially unfolded states can both be precursors for amyloid formation, *The Journal of biological chemistry*, **279**, 14111–14119.
134. Bader, R., Bamford, R., Zurdo, J., Luisi, B.F., Dobson, C.M. (2006) Probing the mechanism of amyloidogenesis through a tandem repeat of the PI3-SH3 domain suggests a generic model for protein aggregation and fibril formation, *Journal of molecular biology*, **356**, 189–208.
135. Morozova-Roche, L.A., Zamotin, V., Malisaukas, M., Ohman, A., Chertkova, R., Lavrikova, M.A., Kostanyan, I.A., Dolgikh, D.A., Kirpichnikov, M.P. (2004) Fibrillation of carrier protein albebetin and its biologically active constructs. Multiple oligomeric intermediates and pathways, *Biochemistry*, **43**, 9610–9619.
136. Petty, S.A., Adalsteinsson, T., Decatur, S.M. (2005) Correlations among morphology, beta-sheet stability, and molecular structure in prion peptide aggregates, *Biochemistry*, **44**, 4720–4726.
137. Petty, S.A., Decatur, S.M. (2005) Intersheet rearrangement of polypeptides during nucleation of beta-sheet aggregates, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 14272–14277.
138. Bitan, G., Kirkitadze, M.D., Lomakin, A., Vollers, S.S., Benedek, G.B., Teplow, D.B. (2003) Amyloid beta-protein (A $\beta$ ) assembly: A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 oligomerize through distinct pathways, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 330–335.
139. Roher, A.E., Chaney, M.O., Kuo, Y.M., Webster, S.D., Stine, W.B., Haverkamp, L.J., Woods, A.S., Cotter, R.J., Tuohy, J.M., Krafft, G.A., Bonnell, B.S., Emmerling, M.R. (1996) Morphology and toxicity of A $\beta$ (1–42) dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease, *The Journal of biological chemistry*, **271**, 20631–20635.
140. Podlisny, M.B., Ostaszewski, B.L., Squazzo, S.L., Koo, E.H., Rydell, R.E., Teplow, D.B., Selkoe, D.J. (1995) Aggregation of secreted amyloid beta-protein into sodium dodecyl sulfate-stable oligomers in cell culture, *The Journal of biological chemistry*, **270**, 9564–9570.
141. Walsh, D.M., Tseng, B.P., Rydel, R.E., Podlisny, M.B., Selkoe, D.J. (2000) The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain, *Biochemistry*, **39**, 10831–10839.
142. Modler, A.J., Gast, K., Lutsch, G., Damaschun, G. (2003) Assembly of amyloid protofibrils via critical oligomers – a novel pathway of amyloid formation, *Journal of molecular biology*, **325**, 135–148.