

Санкт-Петербургский государственный университет

На правах рукописи

Матиив Антон Богданович

**Агрегация адаптерного белка синтазы оксида азота 1 и его взаимодействие с
 α -синуклеином**

Научная специальность 1.5.7. Генетика

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Бондарев Станислав Александрович

Санкт-Петербург

2023

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	7
ВВЕДЕНИЕ.....	9
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 История открытия амилоидов.....	14
1.2 Многообразие амилоидов.....	16
1.2.1 Амилоиды, связанные с развитием патологий.....	16
1.2.1.1 Системные амилоидозы.....	17
1.2.1.2 Локальные амилоидозы.....	19
1.2.1.3 Нейродегенеративные заболевания.....	20
1.2.2 Функциональные амилоиды.....	22
1.2.2.1 Амилоиды в составе клеточной стенки и процессах клеточной адгезии....	22
1.2.2.2 Амилоиды в составе волокон.....	24
1.2.2.3 Амилоиды в процессах сигналинга.....	25
1.2.2.4 Токсины и антимикробные пептиды.....	27
1.2.2.5 Амилоиды в процессах формирования памяти.....	29
1.2.2.6 Амилоиды, связанные с размножением.....	31
1.2.2.7 Гормоны и амилоиды.....	33
1.2.3 Амилоиды с неоднозначной биологической ролью.....	34
1.2.3.1 Немебранные органеллы и белковые агрегаты.....	34
1.2.3.2 Порины и ферменты, способные к агрегации.....	36
1.3 α -Синуклеин.....	37
1.3.1 Функции α -синуклеина.....	38
1.3.2 Агрегация α -синуклеина.....	38

1.3.3 Прионоподобные свойства α -синуклеина	41
1.4 Биоинформатический поиск потенциально амилоидогенных белков.....	42
1.5 Адаптерный белок синтазы оксида азота 1 (NOS1AP)	44
1.5.1 Синтез оксида азота и его роль в патофизиологии психических заболеваний.....	44
1.5.2 Функции NOS1AP	45
1.5.3 Связь NOS1AP с психическими расстройствами	49
1.6 Заключение	51
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	53
2.1 Плазмиды	53
2.2 Штаммы микроорганизмов и клеточные линии	57
2.2.1 Штаммы микроорганизмов	57
2.2.1.1 Бактериальные штаммы.....	57
2.2.1.2 Дрожжевые штаммы	58
2.2.2 Клеточные линии млекопитающих	58
2.2.3 Среды и условия культивирования	58
2.3 Генетические методы.....	60
2.3.1 Трансформация дрожжей и бактерий	60
2.3.2 Трансфекция клеток млекопитающих	60
2.4 Молекулярно-биологические методы.....	60
2.4.1 Получение конструкций, кодирующих фрагменты белков интереса.....	61
2.4.2 Получение конструкций, кодирующих варианты α -синуклеина с аминокислотными заменами	62
2.4.3 Рекомбинационное клонирование (Gateway).....	64
2.4.3.1 Реакция с набором BP Clonase	64

2.4.3.2 Реакция с набором LR Clonase.....	64
2.4.4 Получение плазмиды pDest527-nSNCA.....	65
2.4.5 Секвенирование.....	68
2.4.6 Определение выживаемости клеток с помощью МТТ-теста.....	68
2.5 Биохимические методы.....	68
2.5.1 Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле (SDS-PAGE)	68
2.5.2 Окрашивание геля красителем Кумасси.....	69
2.5.3 Полусухой перенос белков на мембрану.....	69
2.5.4 Выделение белков из клеток млекопитающих.....	69
2.5.5 Выделение белков из клеток дрожжей.....	70
2.5.6 Полуденатурирующий электрофорез в агарозном геле (SDD-AGE).....	70
2.5.7 Капиллярный перенос.....	70
2.5.8 Вестерн-блот гибридизация.....	71
2.6 Выделение и очистка рекомбинантных белков из культур <i>E.coli</i>	72
2.6.1 Выделение и очистка нативного α -синуклеина.....	72
2.6.2 Выделение и очистка фрагментов NOS1AP.....	73
2.7 Анализ агрегации исследуемых белков.....	74
2.7.1 Агрегация α -синуклеина в условиях <i>in vitro</i>	74
2.7.2 Агрегация фрагмента NOS1AP(292-390) в условиях <i>in vitro</i>	74
2.7.3 Окрашивание белка тиофлавином Т.....	74
2.7.4 Анализ кинетики агрегации белков.....	75
2.7.5 Измерение концентрации белков.....	76
2.8 Статистическая обработка.....	77
2.9 Микроскопия.....	77
2.9.1 Флуоресцентная микроскопия.....	77

2.9.2 Просвечивающая электронная микроскопия	77
2.9.3 Поляризационная микроскопия	78
2.10 Поиск потенциально амилоидогенных участков NOS1AP	78
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	79
3.1. Биоинформатический поиск участка NOS1AP, отвечающего за агрегацию ...	79
3.2 Образование агрегатов белка NOS1AP и его фрагментов в разных модельных системах.....	80
3.2.1 Исследование амилоидных свойств NOS1AP и его фрагментов в системе C-DAG	80
3.2.2 Изучение агрегации белка NOS1AP и его фрагментов в клетках дрожжей <i>S. cerevisiae</i>	83
3.2.3 Изучение агрегации NOS1AP и его фрагментов в культуре клеток млекопитающих.....	86
3.2.4 Изучение устойчивости агрегатов NOS1AP и его фрагментов к действию детергентов	88
3.2.5 Выживаемость клеток HEK293T при сверхпродукции NOS1AP	90
3.3 Взаимодействие белка NOS1AP и его фрагментов с α -синуклеином	91
3.3.1 Физическое взаимодействие NOS1AP и его фрагментов с α -синуклеином в клетках HEK293T	91
3.3.2 Колокализация NOS1AP и его фрагментов с α -синуклеином в клетках дрожжей <i>S. cerevisiae</i>	93
3.4 Коагрегация фрагментов белка NOS1AP с α -синуклеином <i>in vitro</i>	96
3.4.1 Выделение и очистка нативного α -синуклеина	96
3.4.2 Агрегация α -синуклеина <i>in vitro</i>	97
3.4.3 Выделение и очистка фрагментов NOS1AP(292-390) и NOS1AP(391-506) ..	98

3.4.4 Воспроизведение методики для анализа кинетики агрегации α -синуклеина <i>in vitro</i>	100
3.4.5 Коагрегация фрагментов NOS1AP(292-390) и NOS1AP(391-506) с α -синуклеином	103
4. ОБСУЖДЕНИЕ	106
4.1 Агрегация NOS1AP	106
4.2 Взаимодействие NOS1AP с α -синуклеином.....	112
5. ВЫВОДЫ	119
6. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	120
БЛАГОДАРНОСТИ	159

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 6xHis — метка, состоящая из шести остатков гистидина;
- AA-амилоидоз — реактивный амилоидоз;
- АМП — антимикробные пептиды;
- БАС — боковой амиотрофический склероз;
- домен РТВ — фосфотирозин-связывающий домен;
- п.о. — пара оснований;
- ЦНС — центральная нервная система;
- BF — Bright-field (проходящий свет);
- BiFC — Bimolecular Fluorescence Complementation (бимолекулярная флуоресцентная комплементация);
- BME — β -Mercaptoethanol (β -меркаптоэтанол);
- C-DAG — curli-dependent amyloid generator;
- CRES — Cystatin-related epididymal spermatogenic;
- CsgAss — сигнальный пептид белка CsgA;
- CST3 — цистатин С;
- eNOS/NOS-III — endothelial NOS (эндотелиальная NOS, эндотелиальная синтаза оксида азота);
- FL — Full-length (полноразмерный);
- FRET — Förster resonance energy transfer (Фёрстеровский перенос энергии);
- iNOS/NOS-II — inducible NOS (индуцируемая NOS, индуцируемая синтаза оксида азота);
- IPTG — isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид);
- МТТ — тиазолил синий тетразолий бромид/3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид;
- НАС — Non-amyloid Component (не- β -амилоидный компонент бляшек);
- NMDA — N-methyl-D-aspartate (N-метил-D-аспартат);

nNOS/NOS-I — neuronal NOS (нейрональная NOS, нейрональная синтаза оксида азота);

NO — Nitric oxide (оксид азота);

NOS — Nitric oxide synthase (NO-синтаза, синтаза оксида азота);

POL — Polarized light (поляризованный свет);

PrP^C — PrP normal cellular isoform (клеточная изоформа PrP);

PrP^{Sc} — PrP scrapie isoform (прионная изоформа PrP);

RHIM — Rip homotypic interaction motif;

SDD-AGE — semi-denaturing detergent agarose gel electrophoresis (полуденатурирующий электрофорез в агарозном геле);

SDS-PAGE — polyacrylamid gel electrophoresis with SDS (денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле с SDS);

SEMG1 — семеногелин 1;

ThT — Thioflavin T (тиофлавин T);

TTR — транстиретин;

v/v — volume per volume (объем к объему);

V1 и V2 — фрагменты флуоресцентного белка Venus;

w/v — weight/volume (вес к объёму);

WT — wild type (дикий тип);

α Syn — α -Synuclein (α -синуклеин);

β 2M — β 2-Microglobulin (β 2-микроглобулин)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Амилоиды – это белковые агрегаты с кросс- β -структурой, которые могут обладать рядом необычных свойств, таких как устойчивость к обработке детергентами, протеазами, а также взаимодействие с амилоид-специфическими красителями (см. обзоры [1–4]). Многочисленные исследования амилоидов сегодня особенно актуальны в связи с увеличивающейся частотой заболеваний, которые они вызывают, например, болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона, диабет второго типа и т.д. Открытие амилоидогенных белков, способных коагрегировать друг с другом, продемонстрировало наличие нового вида межмолекулярных взаимодействий. Имеющиеся данные позволяют утверждать, что такие взаимосвязи играют роль в патогенезе амилоидных заболеваний человека. Сейчас известны многочисленные примеры коагрегации белков, связанных с различными амилоидозами, в частности: амилоида- β и α -синуклеина [5], амилоида- β и амилина [6], белков Csg и α -синуклеина [7], амилоида- β и PrP [8,9]. Для выявления новых примеров коагрегации белков с уже известными патологическими амилоидами человека нами был проведен анализ с помощью алгоритма ArchCandy [10], что позволило выявить таких потенциальных белков-«партнеров» α -синуклеина, склонных к агрегации.

Согласно биоинформатическому анализу, осуществленному в нашей лаборатории, нами было предположено, что белок NOS1AP является потенциально амилоидогенным и может физически взаимодействовать с α -синуклеином. Интерес к нему связан с тем, что согласно протеомным исследованиям он может физически взаимодействовать с α -синуклеином (Рисунок 1).

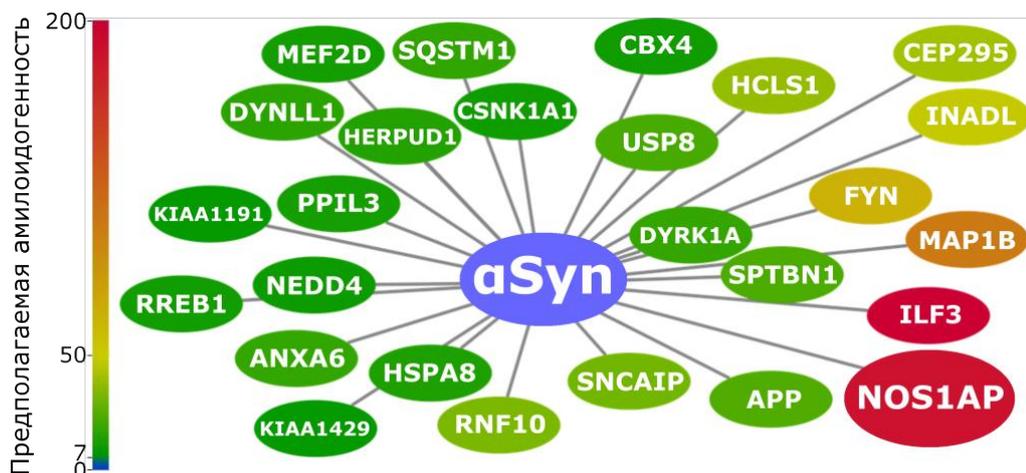


Рисунок 1. Фрагмент сети потенциально амилоидогенных белков человека, физически взаимодействующих с α -синуклеином. Представлена сеть белков, способных физически взаимодействовать с α -синуклеином (α Syn) по данным базы BioGRID. Цвет отражает оценку предполагаемой амилоидогенности, где красный соответствует максимальному уровню. Анализ проведен при помощи программы ArchCandy.

NOS1AP предположительно участвует в развитии шизофрении и некоторых других психических расстройств [11]. Учитывая имеющиеся данные о сосуществовании паркинсонизма и шизофрении [12], можно допустить возможность коагрегации белков NOS1AP и α -синуклеина, а также клиническую значимость этого взаимодействия.

Степень разработанности темы. При исследовании коагрегации амилоидов главным образом изучают уже известные белки (см. обзор [13]). В случае амилоидных белков человека зачастую обращают внимание на тем примеры, которые могут быть связаны с патологическими процессами, ведущими к различным заболеваниям. Амилоидизация α -синуклеина может запускаться сама по себе или в присутствии других внутренне-неупорядоченных белков [14]. Конформационная пластичность α -синуклеина позволяет ему взаимодействовать с различными белками-«партнерами», такими как островковый амилоидный полипептид (IAPP) [15], прионный белок (PrP) [16], пептид $A\beta$ [5,17] и tau [18,19]. В литературе описано большое количество генов, которые могут быть связаны с развитием шизофрении [20,21]. Одним из них стал ген *NOS1AP*, кодирующий адаптерный белок синтазы оксида азота 1 (NOS1AP) [22–24]. При этом, однако,

свойства этого белка агрегировать не исследованы. Стоит отметить, что было показано влияние NOS1AP на агрегацию tau и развитие нейродегенерации у мышей, что позволяет предположить роль NOS1AP в протеинопатиях [25]. С другой стороны, есть единичное упоминание того, что белок NOS1AP может физически взаимодействовать с α -синуклеином [26]. При этом прицельных проверок этого взаимодействия не проводилось.

Цель работы: изучить возможности агрегации белка NOS1AP и его фрагментов, а также его способность взаимодействовать с α -синуклеином *in vivo* и *in vitro*.

Для достижения цели были сформулированы следующие задачи:

1. Оценить способность белка NOS1AP и его фрагментов формировать агрегаты в различных модельных системах.
2. Исследовать взаимодействие белка NOS1AP и его фрагментов с α -синуклеином в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и культуре клеток человека HEK293T.
3. Оценить влияние белка NOS1AP на агрегацию α -синуклеина *in vitro*.

Научная новизна работы. В работе впервые показана способность белка NOS1AP образовывать устойчивые к детергентам агрегаты при сверхпродукции в клетках дрожжей и человека. В последовательности белка NOS1AP картированы участки, склонные к агрегации. Продемонстрирован цитотоксический эффект сверхпродукции NOS1AP в клетках HEK293T. Впервые показано физическое взаимодействие белков NOS1AP и α -синуклеина в клетках дрожжей и человека. Выявлено, что фрагмент NOS1AP(292-390) ускоряет агрегацию α -синуклеина *in vitro*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, позволяют предложить новые детали молекулярных механизмов развития таких заболеваний, как шизофрения и болезнь Паркинсона. На основе полученных данных выдвигается предположение о том, что при сверхпродукции белка NOS1AP происходит его агрегация, что, с одной стороны приводит к секвестрированию и инактивации

синтазы оксида азота, а с другой – к коагрегации с α -синуклеином и ускорению его фибриллизации.

Методология и методы исследования. В ходе выполнения работы был использован целый ряд современных методов исследования, включая молекулярно-биологические методы работы с нуклеиновыми кислотами и белками, биохимические методы анализа, флуоресцентная, поляризационная и электронная микроскопия. Эксперименты были проведены на различных модельных системах, таких как бактерии, дрожжи и культуры клеток человека. В рамках диссертационного исследования применены методы анализа белок-белковых взаимодействий, такие как бимолекулярная флуоресцентная комплементация и колокализация белков с флуоресцентными метками. Были использованы биоинформатические алгоритмы. Также был отработан и применен метод мониторинга кинетики агрегации α -синуклеина.

Основные положения выносимые на защиту. Показано, что сверхпродукция белка NOS1AP, а также его фрагментов, способна приводить к образованию стабильных агрегатов, устойчивых к действию детергентов, в клетках дрожжей *S. cerevisiae* и культуре клеток человека HEK293T. Белок NOS1AP, а также его фрагменты, физически взаимодействуют и коагрегируют с α -синуклеином в клетках дрожжей и человека. Добавление фрагмента NOS1AP(292-390) ускоряет агрегацию α -синуклеина в условиях *in vitro*.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные результаты диссертационной работы были доложены на четырех международных конференциях.

Материалы диссертации представлены в публикациях:

1. **Matiiv, A. B.**, Moskalenko, S. E., Sergeeva, O. S., Zhouravleva, G. A., & Bondarev, S. A. NOS1AP Interacts with α -Synuclein and Aggregates in Yeast and Mammalian Cells // International Journal of Molecular Sciences. 2022. Vol. 23, no. 16. P. 9102.
2. **Матиив, А.Б.**, Трубицина, Н.П., Матвеев, А.Г., Барбитов, Ю.А., Журавлева, Г.А., Бондарев, С.А. Амилоидные и амилоидоподобные

агрегаты: многообразие и кризис термина // Биохимия. 2020. Т. 85, №. 9, С. 1213–1239.

3. **Матив, А.Б.**, Трубицина, Н.П., Матвеев, А.Г., Барбитов, Ю.А., Журавлева, Г.А., Бондарев, С.А. Структура и полиморфизм амилоидных и амилоидоподобных агрегатов // Биохимия. 2022. Т. 87, №. 5, С. 587–602.

Объем и структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования, обсуждения, выводов и списка литературы, содержащего 373 ссылку. Работа изложена на 159 страницах, содержит 36 рисунков и 8 таблиц.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 История открытия амилоидов

Термин «амилоид» был введен в научную литературу немецким ботаником Маттиасом Шлейденом. Он использовал крахмал для изучения химического и анатомического состава растительной клетки. Изначально этот тест, основанный на реакции окрашивания в синий цвет крахмала в присутствии йода и серной кислоты, был описан Жан-Жак Колином и Анри-Франсуа Готье де Клаубри в 1814 г. Шлейден использовал термин «амилоид» (от латинского слова «amylum», крахмал), анализируя образцы растений с помощью этого метода (см. обзор [27]).

Термин «амилоид» в медицинской литературе впервые применил немецкий патологоанатом Рудольф Вирхов. Он использовал этот термин в 1854 г. При описании патологических отложений в нервной системе, которые показали положительный результат в цветной реакции с йодом и серной кислотой. Это позволило Вирхову предположить, что эти структуры идентичны крахмалу (см. обзор [27]). Позднее, применяя тест с использованием йода и серной кислоты, он показал амилоидные отложения в других тканях (см. обзор [28]). В дальнейшем изучение амилоидов продолжались с применением гистологических красителей: Конго красного и тиофлавина (см. обзор [29]).

При помощи дифракции рентгеновских лучей в 1930-х гг. начались структурные исследования амилоидов. Уильямом Томасом Астбери и Сильвией Дикинсон в 1935 г. Была описана характерная рентгенограмма, названная позже «кросс- β ». Алан Коэн и Эван Калкинс в 1959 г. При помощи электронной микроскопии отметили амилоидные отложения с фибриллярной структурой $\sim 7,5$ – 14 нм в ширину и ~ 100 – 1600 нм в длину в тканях кролика и человека (см. обзор [29]). В дальнейшем было продемонстрировано, что в составе агрегатов β -тяжи ориентированы перпендикулярно оси фибрилл и образуют межмолекулярные β -слои. В одном β -слое просвет между β -тяжами составляет $4,7$ – $4,8$ Å. В составе протофибриллы находится минимум два β -слоя, а расстояние между ними составляет порядка 10 Å. В исследованиях по дифракции электронов или

рентгеновских лучей такая регулярная структура образует характерную картину с двумя меридиональными и двумя экваториальными отражениями (Рисунок 2) (см. обзоры [30,31]).

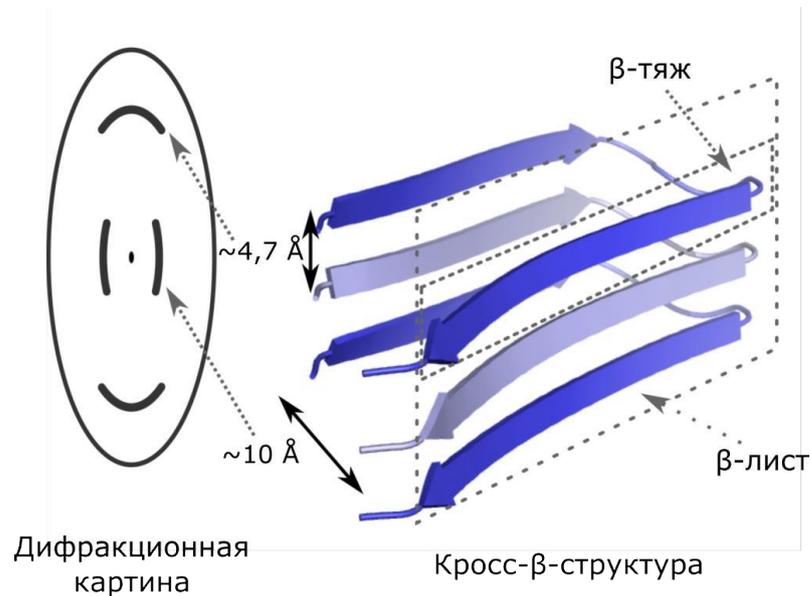


Рисунок 2. Кросс-β-структура амилоидов. Расстояния между β-тяжами и β-листами в амилоидных агрегатах с кросс-β-структурой и соответствующая схема дифракционной картины. Цветами обозначены разные молекулы белка, чередующиеся в составе фибриллы. PDB ID структуры, использованной при подготовке рисунка: 2BEG [30].

В дальнейшем были отмечены другие особенные свойства амилоидных агрегатов. К примеру, некоторые амилоиды меньше подвержены действию протеаз, чем тот же белок в нативной форме. К тому же, они очень стабильны и не растворимы в присутствии детергентов [32]. При изучении амилоидных агрегатов дрожжей был разработан ряд методов, использующих разнообразные модификации электрофореза. Сейчас они с успехом применяются для анализа устойчивости к детергентам или протеазам у агрегатов различного происхождения [33].

Большое количество амилоидов способно индуцировать агрегацию растворимых молекул того же белка, из которого они состоят. В динамике этот процесс чаще всего исследуют *in vitro*, используя очищенный белок и амилоид-специфические красители [34]. Эта характерная черта является неотъемлемой для

инфекционных амилоидов, или прионов, примером которых является PrP [35]. Идентификацию новых амилоидов *in vivo* возможно осуществлять при помощи метода C-DAG (curli-dependent amyloid generator), в котором агрегацию исследуемого белка оценивают по появлению на поверхности клеток бактерий фибрилл [36].

1.2 Многообразие амилоидов

1.2.1 Амилоиды, связанные с развитием патологий

В клинической практике под термином «амилоид» зачастую подразумевают гомогенное внеклеточное отложение, которое специфическим образом окрашивается Конго красным и демонстрирует яблочно-зеленое свечение при двойном лучепреломлении в поляризованном свете, а также имеет характерную тонко-фибрилярную ультраструктуру [37]. В то же время многие авторы не делают различий между внеклеточными и внутриклеточными агрегатами, демонстрирующими амилоидные свойства. При этом даже тельца включения, которые окрашиваются Конго красным, часто тоже называют амилоидами. Такими примерами могут быть внутриядерные агрегаты при болезни Хантингтона и тельца Леви при болезни Паркинсона [38].

В настоящее время обнаружено около 50 различных белков и пептидов, формирующих амилоиды и амилоидоподобные агрегаты, приводящие к заболеваниям человека, среди которых болезни Альцгеймера, Хантингтона и Паркинсона, диабет второго типа и ряд системных и локальных амилоидозов [37,39]. Многие из этих заболеваний являются смертельными и неизлечимыми, а риск их развития возрастает с возрастом [40].

Развитие патологий при амилоидогенезе белка связано с тем, что агрегаты накапливаются в виде внеклеточных бляшек и внутриклеточных включений [31]. Наличие большого количества амилоидного материала способно разрушить структуру ткани и механически влиять на функции пораженных органов [41]. В то

же время существует предположение, что олигомеры и нефибриллярные амилоидные отложения также могут быть токсичны [42].

Амилоидозы представляют собой гетерогенную группу заболеваний, при которых происходит аномальное отложение нерастворимых белков с неправильной укладкой во внеклеточном пространстве, что приводит к дисфункции органов [43]. Можно выделить различия в патогенезе между локализованными и системными амилоидозами: в первом случае амилоидогенный белок синтезируется близко к месту отложения, во втором – белок синтезируется в одном или нескольких органах, а затем транспортируется плазмой крови к месту образования амилоидных фибрилл [42]. Отдельно можно выделить обширную группу нейродегенеративных заболеваний, которые связаны с образованием амилоидных и амилоидоподобных агрегатов.

1.2.1.1 Системные амилоидозы

Амилоидные фибриллы могут образовываться из цепей иммуноглобулинов. Амилоидоз легкой цепи иммуноглобулина (AL-амилоидоз) является наиболее распространенной формой системного амилоидоза (около 70% всех случаев) [44]. Это заболевание часто наблюдается у людей с моноклональной гаммапатией – классом заболеваний, характеризующихся пролиферацией клонов плазматических клеток, и как следствие, наличием моноклональных легких цепей иммуноглобулина (Ig-LC). К повреждению органов приводит образование амилоидов, обусловленное повышенной продукцией Ig-LC [45]. Менее известно о более редком амилоидозе легкой и тяжелой цепей (AL-амилоидоз) и амилоидозе тяжелой цепи (AH-амилоидоз) [46], которые по клиническим симптомам сходны с AL-амилоидозом.

Наиболее распространенным наследственным заболеванием в этой группе является транстретиновый амилоидоз, который обусловлен мутациями, дестабилизирующими тетрамер транстретина (TTR), отвечающий за транспорт гормона тироксина и витамина А [47]. Это приводит к отложению агрегатов TTR в миокарде, нервах и других тканях. К этому заболеванию также относят

старческий системный амилоидоз – приобретенное расстройство, вызванное отложениями TTR, проявляющееся в основном у мужчин старше 60 лет [47]. Другой распространенной патологией является реактивный амилоидоз (AA-амилоидоз) – заболевание, связанное с устойчивыми высокими концентрациями сывороточного амилоида А (SAA) в плазме или специфических тканях при воспалительных процессах. Это приводит к внеклеточным отложениям белка с последующим поражением в основном почек, селезенки, печени, надпочечников и лимфоузлов [48].

У пациентов с почечной недостаточностью, или находящихся на диализе, наличие амилоидных отложений обусловлено повышением уровня циркулирующего в крови β 2-микроглобулина (β 2M) [49]. Эта патология, которую также называют диализным амилоидозом, вызвана отложениями полноразмерного β 2M преимущественно дикого типа. Однако существует и наследственная форма заболевания, возникающая в результате мутаций в гене, кодирующем β 2M, из-за чего синтезируется склонный к агрегации белок [49].

Большую группу системных амилоидозов составляют заболевания, связанные с отложениями аполипопротеинов. Например, амилоидоз, ассоциированный с аполипопротеином А-I (ApoA-I), может быть представлен как в ненаследственной форме с отложениями белка дикого типа, так и в виде наследственной формы с отложениями вариантов белка с заменами [50]. В редких случаях наследственные амилоидозы могут быть вызваны агрегацией мутантных форма гельзолина, α -цепи фибриногена (FGA), цистатина С (CST3) и лизоцима [37,39,42]. Агрегацию и наличие токсичных отложений неправильно свернутых A β , Ig-LC, TTR, α -1-антитрипсина, альбумина и церулоплазмина в плаценте и физиологических жидкостях обнаруживают при преэклампсии – осложнении беременности, которое является частой причиной материнской и внутриутробной смертности [51,52]. Однако неизвестно, какой белок играет ключевую роль в развитии этого заболевания [52].

Семейная британская деменция является аутосомно-доминантным заболеванием, которое характеризуется отложениями амилоида Abri [53],

основным компонентом которого является пептид, кодируемый геном *BRI2*. Мутация в этом гене приводит к замене стоп-кодона на аргинин и вследствие этого к удлинению белка [54]. Интересно, что другая мутация в этом гене (дупликация 10-ти нуклеотидов перед стоп-кодоном) приводит к образованию амилоидного пептида *Adan*, накопление и отложение которого связано уже не с системным, а с локальным амилоидозом – семейной датской деменцией [55,56].

1.2.1.2 Локальные амилоидозы

В этом разделе будут рассмотрены примеры локальных амилоидозов, не затрагивающих центральную нервную систему (ЦНС). Наиболее распространенным случаем является амилоидоз аорты, вызванный агрегацией медиана – продукта расщепления гликопротеина лактадгерина [57].

Локализованные амилоидные и амилоидоподобные агрегаты находят и в опухолевых тканях. Медулярная карцинома щитовидной железы связана с трансформацией парафолликулярных С-клеток и увеличением уровня кальцитонина, гормона щитовидной железы, и как следствие, к образованию амилоидных отложений этого белка [58]. В опухолях также идентифицируют нефункциональные амилоидоподобные олигомеры p53, который является онкосупрессором [59], сферические отложения пролактина [60] и отложения одонтогенного амелобласт-ассоциированного белка (ODAM) [37]. Другими гормоном, агрегация которого приводит к патологии, является островковый амилоидный полипептид (IAPP) или амилин. Образование нерастворимых амилоидных фибрилл этого белка является особенностью островков Лангерганса у большинства людей с диабетом второго типа [61].

Вероятность развития ряда локальных амилоидозов может быть связана с процессами старения. Примером возрастного заболевания является изолированный амилоидоз предсердия, характеризующийся наличием амилоидных фибрилл предсердного натрийуретического пептида (ANF) [62]. При старческом амилоидозе может происходить агрегация семеногелина 1 (SEMG1) в эпителиальных клетках семенных пузырьков [63]. У мужчин среднего и старшего

возраста в предстательной железе обнаруживают амилоидные тельца, компонентами которых являются гетеродимеры белков S100A8 и S100A9 (S100A8/A9) [64].

Амилоидные отложения корнеодесмосина (CDSN) [65], галектина-7 [66] и кератинов (СК5, СК14) приводят к заболеваниям кожи [67]. Мутации в гене *TGFBI*, кодирующем кератоэпителин (TGFBI), связывают с различными формами дистрофии роговицы [68]. К такой же патологии приводит агрегация лактоферрина – железо-связывающего гликопротеина [69].

Инсулин способен образовывать амилоидные фибриллы в месте инъекций лекарств у пациентов с диабетом, вызывая инъекционный амилоидоз [70]. Инъекции энфувиртида – синтетического пептида, блокирующего слияние ВИЧ-1 с клеткой-хозяином могут приводить к похожему эффекту [71].

1.2.1.3 Нейродегенеративные заболевания

Амилоидозы, затрагивающие ЦНС, изучены наиболее подробно. Пептид А β , фрагмент белка-предшественника β -амилоида (APP), был впервые выделен в качестве основного компонента амилоидных отложений у пациентов с болезнью Альцгеймера. Несмотря на то, что функция самого APP до конца не изучена, его процессинг детально исследован: за него отвечают β - и γ -секретазы. Разрезание γ -секретазой является неточным, в результате чего образуются пептиды длиной 36–43 аминокислоты, включая амилоидогенные А β 40, А β 42 и А β 43 [61,72]. Самую многочисленную фракцию (~80–90%) представляет вариант А β 40, а вторую по численности – вариант А β 42 (около 5–10% всех вариантов). А β 42 является наиболее гидрофобным и более склонен к агрегации [73]. При этом пептиды А β проявляют различную токсичность. Так, вариант А β 43 оказывается самым цитотоксичным, в то время как А β 40 проявляет меньший эффект на жизнеспособность клеток [61]. Примечательно, что А β 40 и А β 42 способны образовывать полиморфные фибриллы, от структуры которых может зависеть скорость прогрессирования болезни Альцгеймера [74]. С этим заболеванием также связаны амилоиды, которые формирует нейрон-специфический белок

tau [75]. В головном мозге пациентов с болезнью Альцгеймера tau отделяется от микротрубочек, с которыми ассоциирован в норме, теряет способность их стабилизировать и образует нейрофибриллярные клубки [76].

Белок α -синуклеин формирует внутриклеточные амилоидные агрегаты, обнаруживаемые в тельцах Леви при болезни Паркинсона и деменции с тельцами Леви, в глиальных цитоплазматических включениях у пациентов с множественной системной атрофией и в аксональных сфероидах при нейроаксональных дистрофиях [61,77]. Включения α -синуклеина также выявляют у пациентов с болезнью Альцгеймера [78]. Свойства α -синуклеина будут более подробно описаны в разделе 1.3.

Болезнь Хантингтона является наследственным нейродегенеративным заболеванием, вызванным мутациями в гене, кодирующем белок гентингтин (*htt*). Эти мутации приводят к увеличению количества полиглутаминовых (PolyQ) повторов, вызывающих агрегацию белка [79,80]. Для прогрессирования заболевания важна длина PolyQ повторов. Гентингтин с 6-35 повторами PolyQ не вызывает заболевание. Однако *htt* с более чем 36 повторами PolyQ приводит к развитию болезни Хантингтона [81,82].

Способность амилоидов индуцировать собственную сборку, передаваться от клетки к клетке или даже от организма к организму, вызывая распространение болезни, является характерной чертой прионов. Важным условием их передачи является фрагментация. У человека они связаны с накоплением в ткани прионной изоформы (PrP^{Sc}) клеточного прионного белка PrP^{C} . К этим заболеваниям относят болезнь Крейтцфельдта–Якоба, куру, фатальную семейную бессонницу и синдром Герстмана–Штраусслера–Шейнкера (наследственный вариант болезни Крейтцфельдта–Якоба) [31,83]. Наследственные прионные заболевания вызваны мутациями в гене прионного белка (*PRNP*). В частности, известно более 60 мутаций, которые связаны с разнообразными клиническими синдромами [84]. У животных к прионным инфекциям относят скрепи овец, губчатую энцефалопатию крупного рогатого скота, а также хроническую изнуряющую болезнь оленей и лосей [31].

Боковой амиотрофический склероз (БАС) является прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием. Известно более 180 мутаций в гене *SOD1*, кодирующем цитоплазматическую супероксиддисмутазу [85], которые обуславливают около 20% наследственных случаев БАС [61]. Токсичность мутантных форм *SOD1* при БАС объясняют неправильным сворачиванием и склонностью к агрегации. Стоит отметить, что при некоторых случаях БАС также регистрируют присутствие цитоплазматических агрегатов белков TDP-43 и FUS [61].

1.2.2 Функциональные амилоиды

Образование амилоидных агрегатов изначально рассматривали в связи с патологическими процессами, однако позднее было обнаружено, что амилоидные фибриллы могут выполнять различные физиологические функции в организмах от прокариот до млекопитающих. Например, было предположено, что у человека функциональные амилоиды участвуют в пигментации, хранении пептидных гормонов, оплодотворении яйцеклеток, противомикробном действии, а также в других физиологических процессах.

1.2.2.1 Амилоиды в составе клеточной стенки и процессах клеточной адгезии

Некоторые белки, входящие в состав клеточной стенки, либо ассоциированные с ней, способны формировать амилоидные и амилоидоподобные агрегаты. Такие белки способствуют поддержанию структуры и целостности клеточной стенки, или иных структур оболочки клетки, а также участвуют в адгезии клеток друг к другу или к субстрату.

Белки клеточной стенки дрожжей *S. cerevisiae* способны образовывать амилоидные и амилоидоподобные агрегаты. Одним из таких белков является глюкантрансфераза *Bgl2*. Для этого белка было показано формирование амилоидных фибрилл *in vitro* [86]. В дальнейшем было обнаружено, что белки клеточной адгезии *Flo1* и *Muc1* также формируют фибриллы. В системе *in vivo*

для этих белков были продемонстрированы амилоидные свойства. Протеомный скрининг позволил обнаружить и другие белки, формирующие детергент-устойчивые агрегаты в клеточной стенке: Gas1, Gas3, Gas5, Toh1 и Ygp1. Детально проанализированы были лишь три из них: Gas1, Toh1 и Ygp1. Ген *GAS1* кодирует бета-1,3-глюканозилтрансферазу, в то время как функции белков Toh1 и Ygp1 не установлены. Белок Toh1 связан с мембраной клетки благодаря GPI-якорю и, предположительно, способствует стабилизации структуры клеточной стенки за счет образования фибрилл [2].

Другой пример функциональных амилоидов, локализованных в клеточной стенке, связан с образованием воздушных гиф *Streptomyces coelicolor*. Первые восемь белков, которые были идентифицированы в составе этих структур, были названы чаплинами (chaplins), а отдельные белки получили обозначения ChpA-H. Для белков ChpD-H показаны амилоидные свойства *in vivo*, однако эти результаты были получены на смесях белков из детергент-устойчивых фракций. Белки RdlA и RdlB, которые образуют дополнительный белковый слой поверх чаплинов, также участвуют в формировании воздушных гиф *S. coelicolor*. Несмотря на высокое сходство последовательностей двух этих белков (>90%), только RdlB может образовывать фибриллы *in vitro* [87].

Амилоиды отвечают за гидрофобные свойства поверхности воздушных гиф грибов. Белки гидрофобины (hydrophobins) способны выполнять аналогичную функцию: среди них белки EAS (у *Neurospora crassa*) и SC3 (у *Schizophyllum commune*), которые являются наиболее известными примерами амилоидов [2,88]. Другие белки из разных видов грибов (RodA, MPG1, NC2, DewA, Rep1) обладают следующими свойствами: показано их участие в формировании фибриллярных структур на поверхности клеток, высокая устойчивость к детергентам, а также взаимодействие с тиофлавином Т [89–92]. Среди эукариот подобные примеры найдены также у *Candida albicans* (Als1, Als5, Ear1) [93,94].

Обнаружен ряд белков бактерий, агрегация которых связана с формированием биопленок и адгезией к субстрату. Наиболее известными

примерами являются белок CsgA *Escherichia coli* и его многочисленные ортологи [95]. Эти белки необходимы для образования фибрилл, названных керли (curli), на поверхности клеток и формирования внеклеточного матрикса в бактериальных биопленках [88,96]. Аналогичная функция была предложена и для других белков. На поверхности бактерий фибриллы также образуют белки TasA *Bacillus subtilis*, War *Staphylococcus aureus* и FapC *Pseudomonas fluorescens*. Для них показаны амилоидные свойства [88,96,97]. Белок MTP образует фибриллярные агрегаты на поверхности *Mycobacterium tuberculosis* [98]. Ингибирование фибриллизации белков P1, WarA и SMU_63с бактерии *Streptococcus mutans* препятствует формированию биопленок [99]. Детергент-устойчивые агрегаты в клетках *Salmonella enteritidis* образуют белки AgfA и AgfB [100,101]. Было также предположено, что белок Sbp *Staphylococcus epidermidis* также является амилоидом, поскольку он образует фибриллы, которые окрашиваются амилоид-специфическими красителями [102].

1.2.2.2 Амилоиды в составе волокон

В 1968 году при исследовании шелка златоглазок рода *Chrysopa* с помощью дифракции рентгеновских лучей было показано, что расстояние между β -тяжами вдоль оси фибриллы составляет $\sim 4,7 \text{ \AA}$ [31], что является свойством, характерным для кросс- β -структуры. Фиброин, выделяемый тутовым шелкопрядом *Bombyx mori*, в условиях *in vitro* формирует амилоидоподобные фибриллы с необычной структурой, в которой β -тяжи параллельны оси фибриллы [103]. Паучьи шелка, или спидроины являются природными полимерами, которые характеризуются исключительной прочностью и эластичностью. Для них был отмечен переход от конформации на основе α -спиралей и неупорядоченных участков к структуре, обогащенной β -листами, что схоже с образованием амилоидных фибрилл. С помощью электронной микроскопии у *Nephila edulis* были обнаружены фибриллы спидроина (см. обзор [2]). Миниспидроин eADF-4(C16), основанный на повторяющихся регионах ADF-4 *Araneus diadematus*, образует фибриллы с кросс- β -структурой [2] и способен запускать

образование амилоидоподобных фибрилл в условиях *in vitro* [104]. Стоит добавить, что один из белков латекса из гевеи бразильской (*Hevea brasiliensis*), REF (Hevb1), в физиологических условиях *in vitro* образует агрегаты, обладающие амилоидными свойствами [105,106].

1.2.2.3 Амилоиды в процессах сигналинга

В основе передачи внутриклеточных сигналов лежат конформационные изменения белков. Образование амилоидов – это также изменение конформации. Наглядным примером функциональных амилоидов, участвующих в передаче сигнала, является пара белков человека RIPK1 и RIPK3, совместная агрегация которых (коагрегация) необходима для запуска некроптоза [107,108]. Для этих белков показаны многие амилоидные свойства *in vitro* и *in vivo*. В участках, необходимых для агрегации и осуществления сигнального каскада, находятся последовательности RHIM (от Rip homotypic interaction motif) [107].

Похожие мотивы были обнаружены и в других белках различных организмов [109], в том числе в хорошо изученном амилоиде HET-s *Podospora anserina*. Инфекционные агрегаты этого белка приводят к появлению приона [*Het-s*]. Этот цитоплазматический фактор необходим для запуска реакции несовместимости гетерокарионов. Слияние гиф разных организмов, один из которых несёт этот прион, а второй – нет, приводит к запрограммированной клеточной гибели. Этот процесс запускается при взаимодействии амилоидных агрегатов HET-s с мономерным белком HET-S (продукты разных аллелей одного гена), которые оказались в одном гетерокарионе после слияния клеток (см. обзор [110]). Последующая агрегация HET-S приводит к изменению его конформации, он получает возможность встраиваться в мембрану клетки, нарушая её целостность [111].

Дальнейший поиск RHIM среди других белков *P. anserina* выявил еще одного участника этого сигнального каскада – белок NWD2. Этот белок способен запускать агрегацию HET-s, что впоследствии приводит к гибели клеток [112]. Белки HELLP, SBP и PNT1 гриба *Chaetomium globosum*, также несут RHIM и,

возможно, являются функциональными аналогами системы HET-s, HET-S, NWD2 [113].

В белках PGRP-LC, PGRP-LE и Imd *Drosophila melanogaster*, которые участвуют в запуске антимикробного ответа, были обнаружены скрытые RHIM (сRHIM, от cryptic RHIM). Согласно предложенной модели, агрегация этих белков является ключевым событием в передаче сигнала [114]. Поскольку RHIM найдены среди разных белков, связанных с процессами сигналинга [115], можно ожидать описания новых функциональных амилоидов.

Распознавание клеткой вирусной РНК инициирует каскад передачи сигнала, который приводит к запуску противовирусного ответа. Белок MAVS стал одним из недавно обнаруженных участников такого сигналинга. Этот белок выполняет свою функцию в агрегированной форме. В составе MAVS выделяют С-терминальный трансмембранный домен, благодаря которому он связан с митохондриальной мембраной, N-терминальный каспазо-рекрутирующий прионогенный домен CARD, экспонированный внутрь цитозоля, а также промежуточный участок, который рекрутирует сигнальные молекулы нижележащего пути передачи сигнала. Домен CARD взаимодействует с таким же участком рецепторных белков RIG-1 и MDA5, которые распознают чужеродную РНК, запуская каскад противовирусного ответа. При этом MAVS образует комплексы, которые инициируют агрегацию других молекул MAVS [116].

Агрегаты MAVS демонстрируют ряд свойств, характерных для амилоидов, но обладают особой структурой, поэтому они не взаимодействуют с красителями Конго красным и тиофлавином Т. Белок MAVS, переходя в агрегированную форму, не претерпевает конформационных переходов α -спиралей в β -листы (Рисунок 3). На основании данных криоэлектронной микроскопии были предложены две модели агрегатов этого белка. В обоих случаях филаменты MAVS состоят из отдельных субъединиц белка, уложенных друг на друга и образующих центральную пору [116].

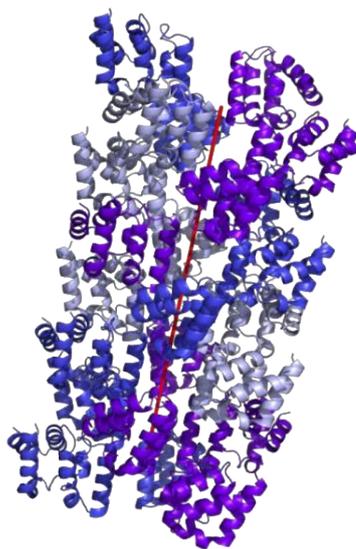


Рисунок 3. Модель агрегата MAVS. Красной линией отмечена условная ось фибриллы. Цветами выделены чередующиеся молекулы белка. Идентификатор структуры, использованной при подготовке рисунка, в базе данных PDB ID: 3J6C [30].

1.2.2.4 Токсины и антимикробные пептиды

Антимикробные пептиды (АМП) – это защитные пептиды, обнаруженные во многих организмах, являющиеся частью врожденного иммунитета. Большинство АМП представляют собой катионные и амфифильные α -спиральные белковые молекулы. Принцип их работы заключается в связывании с негативно заряженной бактериальной мембраной и нарушении ее целостности [117]. Для некоторых АМП показаны амилоидные свойства, которые, предположительно, важны для их функционирования.

LL-37 стал первым открытым антимикробным катионным пептидом человека [118]. При бактериальной инвазии протеазы разрезают предшественник hCAP-18, в результате чего появляется пептид LL-37, который образует волокнистые агрегаты *in vitro*. Эти комплексы окрашиваются Конго красным и характеризуются яблочно-зеленым свечением при двойном лучепреломлении в кросс-поляризованном свете [118]. Фибриллы, образованные коротким фрагментом LL-37, не связывают тиофлавин Т и имеют нехарактерное для амилоида строение: они состоят из плотно упакованных амфипатических

α -спиралей [119]. Показано, что агрегация белка LL-37 может быть напрямую связана с его цитотоксичностью [118].

Из кожи лягушек были выделены дермасептины Drs S9 и aDrs PD-3-7. Они образуют фибриллы, обогащенные β -слоями, для которых показан ряд амилоидных свойств [120–122], однако, как и для многих АМП, для них нет подтверждения *in vivo*. В коже лягушки *Xenopus laevis* были обнаружены магайнины, обладающие противомикробным [123,124] и противоопухолевым действием [125,126], а также демонстрирующие амилоидные свойства. Для них впервые был предложен антимикробный механизм с образованием тороидальных пор. Магайнины связываются с мембраной и, достигнув пороговой концентрации, приводят к ее деформации и дестабилизации. После этого пептиды встраиваются в мембрану, образуя тороидальную пору [127]. Протегрин-1 (PG-1), АМП человека, формирует фибриллы *in vitro*, которые специфически окрашиваются тиофлавином Т. Протегрины находятся в нерастворимом состоянии в гранулах нейтрофилов и макрофагов. При попадании патогена в клетку, гранулы сливаются с вакуолью, что приводит к высвобождению пептидов, которые образуют каналы в мембране патогена, приводя к его гибели [128]. К известным протегринам с амилоидными свойствами относят также PG-4, выделенный из лейкоцитов свиней. Было показано, что в условиях *in vitro* он образует фибриллярные агрегаты, которые окрашиваются Конго красным и тиофлавином Т. Мономеры и агрегаты PG-4 проявляют антимикробную активность в отношении *B. subtilis* [129]. Микроцин E492 является известным порообразующим бактериальным токсином, продуцируемым *Klebsiella pneumoniae* RYC492. Показано, что он способен формировать амилоидоподобные фибриллы, богатые β -слоями *in vivo* и *in vitro* [130]. Другим примером бактериального токсина служит белок PSM α 3 *S. aureus*, который образует фибриллы с кросс- α -структурой, связывающие тиофлавин Т. При этом есть свидетельства токсичности фибрилл по отношению к клеткам человека [131].

Клетки Панета тонкого кишечника человека продуцируют α -дефензин 6 (HD6), который обеспечивает защиту от заражения патогенными

микроорганизмами кишечника [132]. Связываясь с поверхностными белками бактерий, HD6 подвергается упорядоченной самосборке с образованием фибрилл и наносеток, которые окружают и запутывают патогены. Это создает препятствие для физического контакта бактерий с эпителиальными клетками, необходимое для прикрепления или инвазии [132].

Амилоидоподобные АМП также были обнаружены у растений. Cn-AMP2, выделенный из жидкого эндосперма кокосового ореха *Cocos nucifera*, образует видимые агрегаты в водном буфере, которые связывают Конго красный, тиофлавин Т, а также имеют фибриллярную морфологию. Однако в настоящее время нет прямых доказательств того, что Cn-AMP2 обладает антибактериальным эффектом исключительно в агрегированной форме [133].

Стоит отметить, что белки, ассоциированные с человеческими амилоидозами, также могут вести себя как токсины. Например, Аβ проявляет антимикробные свойства, которые нацелены на патогенные бактерии и грибы *in vitro* и в модельных системах: у нематоды *Caenorhabditis elegans* и мыши [134,135]. Антимикробные свойства продемонстрированы для других амилоидогенных белков, например, лизоцима. Его антимикробная активность приводит к пермеабиллизации клеточной мембраны патогена, предположительно через образование пор [136].

1.2.2.5 Амилоиды в процессах формирования памяти

Наличие амилоидов в центральной нервной системе (ЦНС) долгое время ассоциировалось исключительно с патологиями. Однако многое изменилось с обнаружением функциональных амилоидов белка СРЕВ моллюска *Aplysia californica* и его гомологов: Orb2 *D. Melanogaster* и СРЕВ3 мыши. Белки СРЕВ являются РНК-связывающими, причём они лучше связывают РНК, находясь в олигомеризованном состоянии [137]. Олигомеризация СРЕВ в мозге исследованных животных происходит в ответ на нейрональную стимуляцию [138,139]. Если белки СРЕВ не формируют агрегаты, это отрицательно сказывается на поддержании долгосрочной памяти у *A. californica* и

D. melanogaster [137,138]. Эти данные позволяют предположить, что белки СРЕВ функциональны именно в агрегированном состоянии. Исследователи также называют эти белки функциональными прионами [139], что, вероятно, не имеет достаточных оснований, так как инфекционность СРЕВ *A. californica* и СРЕВ3 мыши была *in vivo* продемонстрирована только в дрожжевой системе [139,140]. До недавнего времени не было прямых доказательств того, что эта группа белков формирует амилоидные агрегаты непосредственно в живых организмах без искусственной сверхпродукции. Однако недавно амилоидная природа была доказана для фибрилл Orb2, выделенных из голов дрозофил. С помощью криоэлектронной микроскопии была воссоздана структура амилоидных фибрилл *ex vivo* в высоком разрешении [141]. Фибриллы Orb2 демонстрируют трёхлучевую симметрию, сходную со структурой A β 40 [141]. Таким образом, очевидно, что амилоидная структура сама по себе может и не являться причиной развития патологий ЦНС, и для понимания реальных причин развития нейродегенеративных амилоидозов необходимо глубокое изучение факторов, влияющих на амилоидогенез того или иного белка.

СРЕВ/Orb2 представляет собой не единственный пример амилоидов, связанных с процессами памяти. Было показано, что белок FXR1, участвующий в развитии долгосрочной памяти, присутствует в мозге крыс в составе амилоидных агрегатов. Более того, его практически не удавалось детектировать в мономерном состоянии. Обнаруженные агрегаты демонстрировали амилоидные свойства. FXR1 представляет собой РНК-связывающий белок, для которого показано, что в амилоидной форме он способен связывать мРНК, защищая её от действия РНКаз [142]. Вероятно, таким образом он влияет на трансляцию определённых мРНК и, как следствие, на дифференциальную экспрессию в нейронах. Учитывая то, что в мозге крысы FXR1 обнаруживается исключительно в составе detergent-устойчивых агрегатов, а также то, что FXR1 важен для регуляции памяти и эмоций, можно предположить, что FXR1 также является функциональным амилоидом. Амилоидогенный фрагмент FXR1 является высококонсервативным у

млекопитающих [142], что позволяет экстраполировать полученные результаты на ортологи этого белка у других организмов.

По всей вероятности, амилоиды участвуют в процессах памяти не только в нервной системе у животных. Альтернативная амилоидная конформация может нести определенную информацию, которая может так или иначе быть «дешифрована» на клеточном уровне, поэтому использование подобных агрегатов для долгосрочного хранения информации может быть универсальным механизмом, который мог многократно и независимо реализовываться в эволюции. Примером такого механизма клеточной памяти может являться существование так называемых «мнемонов». Это агрегаты белка Whi3 у дрожжей, возникающие в ответ на неудачное слияние клеток противоположных типов спаривания и остающиеся в клетках дрожжей на всю жизнь, как память о прошедшем событии [143]. В отличие от прионов, мнемоны не передаются в дочерние клетки при делениях. Впрочем, возможно, что известные прионы низших эукариот также могут являться единицами наследования такой «памяти», которые, однако, уже переносят информацию, не ограничиваясь жизнью одной клетки, на протяжении многих клеточных поколений.

1.2.2.6 Амилоиды, связанные с размножением

В структурах, связанных с половым размножением, например, в акросоме сперматозоидов, были также обнаружены амилоиды. Полагают, что эти фибриллы способствуют контролируемому высвобождению белков во время акросомной реакции, ключевого события в оплодотворении ооцитов, в процессе которого содержимое акросомы изливается наружу. Амилоиды, образованные белками подгруппы CRES (Cystatin-related epididymal spermatogenic), такими как CRES, CRES2, CRES3 и цистатин E2 (mCST E2), присутствуют в эпидидимисе мыши [144–146]. У человека в этом же органе обнаружены агрегаты цистатина С (CST3) [146,147]. Роль амилоидных агрегатов белков CRES до конца не изучена, однако есть предположение, что они функционально значимы. Например, обладают антимикробной активностью, необходимы для акросомной реакции, нормального

функционирования лизосом в эпидидимисе, а также играют роль в созревании сперматозоидов. В семенной жидкости содержатся амилоиды и амилоидоподобные фибриллы, образованные фрагментами пептида фосфатазы простатической кислоты (PAP) [148] и белков семеногелина (SEMG1 и SEMG2) [149,150]. Такие фибриллы, которые первоначально были идентифицированы как усилители вирусной инфекции, связываются с поврежденными сперматозоидами и иммобилизуют их для уничтожения иммунными клетками. Амилоиды, образованные белком SEMG1, также обнаружены при некоторых патологиях.

В ооцитах многих позвоночных обнаруживают тела Бальбиани – амилоидоподобные органеллы, состоящие из митохондрий, эндоплазматического ретикулума и РНК. Белок Xvelo образует фибриллярные сети, из которых состоит матрикс этого компартмента у *X. laevis*. Такие фибриллы связывают тиофлавин Т и устойчивы к обработке детергентами [151]. Для белков, участвующих в формировании оболочки ооцита у насекомых, рыб и млекопитающих, также показаны амилоидные свойства. Результаты экспериментов по рассеянию рентгеновских лучей позволяют предположить, что амилоидные структуры присутствуют в составе хориона бабочки *Antheraea polyphemus* [152]. Стоит заметить, что значительная часть амилоидных свойств была продемонстрирована для отдельных пептидов данных белков, соответствующих участку тандемных повторов (сА-пептидов) [153,154]. В хорионе костистых рыб присутствуют белки группы ZPB, отдельные пептиды которых также склонны к формированию амилоидных агрегатов [155]. Амилоидные свойства показаны и для белков в составе блестящей оболочки (zona pellucida) ооцита млекопитающих. Белки, входящие в состав этой оболочки у мышей, демонстрируют характерную морфологию агрегатов *in vivo*, а также типичный для кросс- β -структуры паттерн дифракции рентгеновских лучей, и способны связывать амилоид-специфические красители [156]. Аналогичные свойства были показаны для агрегатов пептидных фрагментов белков ZP1– ZP4 человека *in vitro* [157]. Полагают, что образование амилоидных фибрилл в оболочках ооцитов и эмбрионов у различных животных способствует защите от повышенной температуры, механического давления и

других внешних воздействий. В литературе также описаны структурные компоненты куриных ооцитов и оболочки яйца *D. melanogaster*, окрашивающиеся амилоид-специфичными красителями [158].

Амилоидоподобные белки могут действовать в качестве регуляторов клеточного цикла и влиять на половое размножение дрожжей. Так, детергент-устойчивые агрегаты во время фазы G1 мейоза формирует белок Rim4 у *S. cerevisiae*. Это приводит к репрессии трансляции циклина Clb3 и последующему запуску деления. Разборка агрегатов Rim4 запускается путем фосфорилирования этого белка [159].

1.2.2.7 Гормоны и амилоиды

Обнаружение белковых фибрилл в меланосомах, сформированных белком Pmel17, позволило связать гормоны с функциональными амилоидами млекопитающих. Стало известно, что Pmel17 в амилоидной форме участвует в синтезе меланина [160]. При протеолитическом расщеплении этого белка образуется фрагмент M α , для которого показаны амилоидные свойства. К тому же его конверсия в амилоидную форму происходит на несколько порядков быстрее, нежели у A β или α -синуклеина [160–162]. До сих пор неизвестно, какие домены Pmel17 непосредственно участвуют в формировании амилоидных фибрилл в клетке [161–163]. Можно предположить, что различные продукты протеолиза Pmel17 подвергаются процессу амилоидогенеза на разных этапах формирования меланосом. Присутствующие в клетке фибриллы, таким образом, представляют собой сложные коагрегаты из разных фрагментов Pmel17 [164]. Формирование комплексных агрегатов из амилоидных фибрилл Pmel17, по-видимому, обеспечивает максимальную эффективность синтеза меланина.

Сами пептидные гормоны также могут формировать амилоидные агрегаты, которые, как полагают, хранятся в таком виде в секреторных гранулах. В исследованиях пептидных гормонов *in vitro* 10 пептидов демонстрировали спонтанное формирование амилоидных фибрилл, а 31 гормон приводил к образованию фибрилл в присутствии гликозаминогликана гепарина [165].

Важным свойством амилоидов некоторых гормонов является их способность отделять мономеры в условиях, соответствующих высвобождению пептидов из секреторных гранул. К тому же амилоиды только семи гормонов оказывают токсический эффект на клетки [165]. Эти наблюдения позволяют предположить, что амилоиды некоторых гормонов действительно могут выполнять запасующую функцию в клетке. Влияние амилоидов глюкагона на токсичность оказалось в два раза сильнее Аβ40 [165], что подтверждает данные о том, что амилоиды глюкагона могут быть патологическими [166]. Другой гормон, пролактин, обнаруживают в составе амилоидов у пациентов с аденомой [167]. Ранее были рассмотрен белок семеногелин, агрегаты которого обнаруживают как при амилоидозах, так и в нормальных сперматозоидах. Таким образом, не исключено что и амилоиды некоторых других белков, обнаруженные при различных патологиях, в действительности могут также являться и функциональными амилоидами.

1.2.3 Амилоиды с неоднозначной биологической ролью

В настоящий момент нет единого мнения по поводу роли прионов дрожжей, ведь существуют мнения как в пользу, так и против их возможной функциональности [168,169]. Белки в составе немембранных органелл тоже способны образовывать амилоидные агрегаты, однако не всегда ясно, является ли эта особенность необходимой для функционирования этих белков. Так, многие белки, входящие в состав немембранных органелл могут быть связаны с патологическими состояниями, например, с БАС и некоторыми видами деменции. Существуют сведения об агрегации некоторых ферментов и поринов, однако функциональная значимость этого явления не ясна.

1.2.3.1 Немембранные органеллы и белковые агрегаты

Немембранные органеллы представляют собой динамические структуры в ядре или цитоплазме клетки, которые образованы скоплением большого количества взаимодействующих биологических молекул, выполняющих

специфический набор функций. Описано большое количество таких компартментов с разнообразными клеточными функциями [170]. Примерами ядерных немембранных органелл являются ядрышко, тельца Кахаля, ядерные спеклы и тельца гистонового локуса. Эти органеллы играют важную роль в процессах транскрипции, созревания различных видов РНК, а также биогенезе рибосом [171]. Цитоплазматические немембранные органеллы связаны с такими явлениями, как процессинг, хранение и деградация белков и мРНК. Примерами таких органелл служат Р-тельца и стресс-гранулы [170], а также недавно обнаруженные А-тельца [172].

Многие немембранные органеллы образуются в результате фазового разделения жидкость-жидкость, и поэтому обладают жидкостными свойствами. Такое фазовое разделение происходит при взаимодействии белковых молекул и приводит к формированию структур типа «жидкая капля». Белки немембранных органелл, взаимодействующие с РНК, включают мотивы распознавания РНК. Важную роль в формировании немембранных органелл играют внутренне неупорядоченные участки, которые определяют способность этих белков вступать в разнообразные межмолекулярные взаимодействия, приводящие к фазовым переходам [173–178]. Такие фрагменты зачастую обладают специфическим аминокислотным составом с низким разнообразием и называются LC-доменами. Аминокислотный состав участков, вносящих вклад в фазовое разделение, обычно характерен для прионных доменов. Поэтому такие участки обозначаются как прионоподобные [170].

Полагают, что обычно немембранные органеллы на первых этапах формирования не содержат агрегатов с амилоидной структурой. В дальнейшем в процессе созревания этих органелл появляются сначала лабильные амилоидоподобные агрегаты, а затем – стабильные амилоидные фибриллы [179–181]. Стоит отметить, что при БАС и лобно-височной деменции наблюдают образование амилоидных фибрилл компонентов немембранных органелл. Вопрос о том, является ли формирование амилоидных фибрилл необходимым или побочным свойством рассматриваемых белков, до сих пор актуален. К тому же,

агрегаты, образуемые немембранными органеллами, отличаются от типичных амилоидных фибрилл (в частности, агрегаты ряда таких белков чувствительны к воздействию высокой температуры и детергентов [182,183]).

РНК-связывающий белок FUS, чьи мутантные формы связаны с БАС, участвует в формировании Р-телец, а также способен агрегировать и активно взаимодействовать с агрегатами других белков [184]. За формирование агрегатов FUS отвечает его LC-домен. Этот фрагмент (и некоторые его участки) обозначают RAC (от Reversible Amyloid Core). Показано, что он формирует амилоидные агрегаты с фибриллярной структурой *in vitro* и взаимодействует амилоид-связывающими красителями [185,186].

Ядерные рибонуклеопротеины hnRNPA1 и hnRNPA2B1 участвуют в процессинге гетероядерной РНК и регуляции экспрессии генов [187]. Мутантные формы этих белков, а также дикий тип, фибриллизуются *in vitro*. К тому же мутации в прионоподобных доменах, ассоциированные с БАС, ускоряют агрегацию белков hnRNPA1 и hnRNPA2B1 [188].

При исследованиях образцов мозга пациентов с БАС и лобно-височной лобарной дегенерацией (ЛВЛД) были обнаружены агрегаты РНК-связывающего белка TDP-43. Этот белок не формирует длинных амилоидных фибрилл, образуя при этом лишь небольшие олигомеры, способные индуцировать агрегацию других амилоидогенных белков, например, Аβ [189]. При стрессовых воздействиях TDP-43 обнаруживают в составе стресс-гранул. Стоит отметить, что TDP-43 олигомеризоваться путем взаимодействия мономеров через их N-концевые участки. Этот процесс необходим для осуществления биологической функции TDP-43 [189].

1.2.3.2 Порины и ферменты, способные к агрегации

Порины могут формировать амилоидные и амилоидоподобные агрегаты. Такими прокариотическими поринами являются белки PorA, PorB, OmpA и OmpC [190–193]. У эукариот в качестве примера можно привести белок MSP2 [88]. На данный момент трудно сказать, насколько распространен процесс

агрегации поринов, а также то, к какому эффекту это приводит. Результаты биоинформатических исследований позволяют предположить, что последовательности белков, образующих внутреннюю часть поры, могут приводить к формированию амилоидных структур [194].

Существуют сведения об агрегации таких ферментов, как, например, протеазы YghJ [195] и трансклутаминазы TGZ [196]. К агрегации также способны белки CarD, HelD и RepA [197–202].

Таким образом, можно сказать, что амилоиды и амилоидоподобные белки встречаются у самых разных организмов, при этом спектр их функций довольно обширен. С другой стороны, амилоиды по-прежнему являются причиной большого количества заболеваний животных и человека. Поэтому можно заключить, что изучение как уже известных амилоидов, так и поиск новых, склонных к агрегации белков, являются важными задачами в современной биологии и медицине.

Материалы о многообразии амилоидов опубликованы в обзорной статье «Амилоидные и амилоидоподобные агрегаты: многообразие и кризис термина» вместе с Трубициной Н.П., Барбитовым Ю.А., Матвеевко А.Г., Журавлевой Г.А. и Бондаревым С.А.

1.3 α -Синуклеин

Синуклеины представляют собой небольшие и растворимые белки, присутствующие в основном в нервной ткани и в некоторых опухолях. В отличие от многих других белков, они обнаружены только у позвоночных [203]. К настоящему времени идентифицированы три члена семейства синуклеинов: α -, β - и γ -синуклеин [203,204]. Интерес к этим белкам вырос после того, как была обнаружена связь (как генетическая, так и нейропатологическая) между α -синуклеином и болезнью Паркинсона [205].

α -Синуклеин является хорошо растворимым белком, состоящим из 140 аминокислотных остатков, и имеющим развернутую нативную конформацию [206,207]. В составе этого белка выделяют три домена: N-концевую область

(остатки 1-60), которая слабо связывается с клеточной мембраной, гидрофобную область (остатки 61-95) и С-концевую гидрофильную область, богатую пролином (остатки 96-140) [207,208]. В структуре α -синуклеина выделяют домен NAC (неамилоидный компонент) в позициях 61-95, который был идентифицирован в амилоидных бляшках в головном мозге с болезнью Альцгеймера [209]. NAC участвует в агрегации и формировании кросс- β -структур. α -Синуклеин широко распространен в мозге и локализован в пресинаптических терминалях [207,208].

1.3.1 Функции α -синуклеина

Известно, что α -синуклеин представляет собой белок, который синтезируется в клетке в физиологических условиях, однако все функции этого белка до конца не изучены. Наиболее важными известными функциями являются снижение апоптоза в дофаминергических нейронах [210], предотвращение окисления ненасыщенных жирных кислот [211], регуляция транспорта синаптических везикул на пресинаптических терминалях [212], участие в формировании комплекса SNARE [213] и клатрин-зависимом эндоцитозе [214].

1.3.2 Агрегация α -синуклеина

Несмотря на многочисленные исследования, структура α -синуклеина в физиологических условиях остается неясной. Считается, что α -синуклеин преимущественно встречается в цитозоле в виде неупорядоченного мономера [215]. Было показано, что к неправильному сворачиванию и агрегации α -синуклеина *in vitro* могут приводить различные условия, такие как кислотность среды [216], повышение температуры [217], «молекулярный краудинг» [218], наличие ионов металлов (таких как алюминий, медь, железо, кобальт и марганец [219]), органических растворителей [220], пестицидов [221] и α -синуклеин-связывающих белков [222,223]. Кроме того, на нейротоксичность и склонность к агрегации α -синуклеина могут влиять посттрансляционные модификации. К таким модификациям относят фосфорилирование [224,225], убиквитинирование

[226], нитрование [227], сумоилирование [228], протеолиз [229] и N-концевое ацетилирование [230]. Среди агрегатов α -синуклеина, обнаруженных в тельцах Леви, около 90% фосфорилированы по остатку серина 129 (Рисунок 4), поэтому гиперфосфорилирование S129 α -синуклеина рассматривается как патологический признак болезни Паркинсона и других синуклеинопатий [231]. Однако неясно, стимулирует или препятствует фосфорилирование α -синуклеина его агрегации, а также способствует ли оно его нейротоксичности [232].

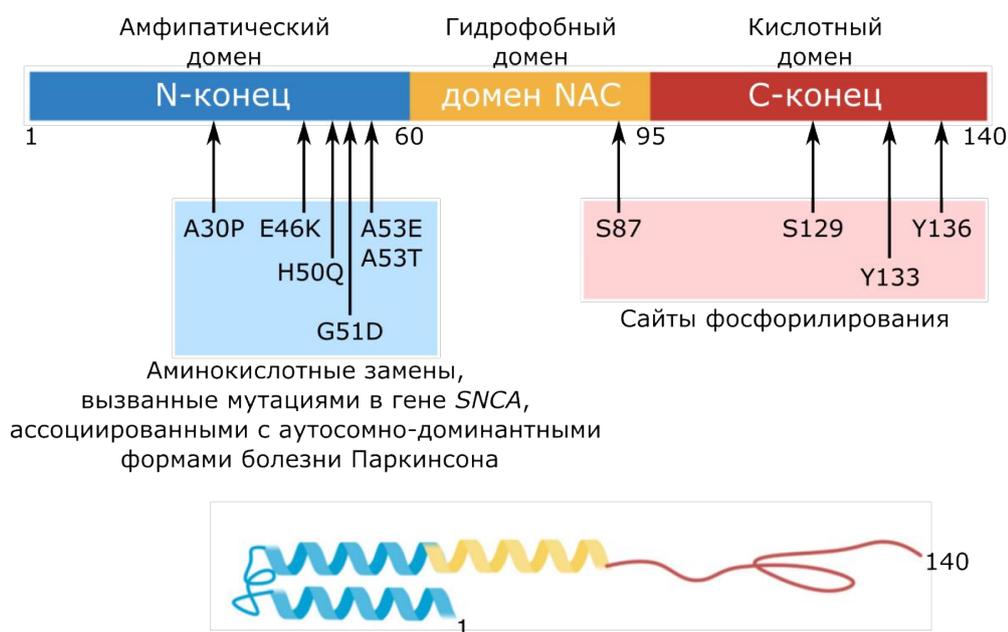


Рисунок 4. Структура α -синуклеина. Последовательность белка из 140 аминокислотных остатков можно разделить на три отдельных домена. N-концевой амфипатический домен (синий) содержит аминокислотные замены (A30P, E46K, H50Q, G51D, A53T, A53E), вызванные основными мутациями в гене *SNCA*, связанными с аутосомно-доминантными формами болезни Паркинсона. N-концевая область склонна к образованию спирали и отвечает за связывание с мембраной. Гидрофобный домен, соответствующий не- β -амилоидному компоненту бляшек (NAC), отвечает за агрегацию α -синуклеина (желтый). C-концевой домен (красный) образует кислый «хвост», содержащий основной сайт фосфорилирования S129. C-концевой домен модулирует агрегацию α -синуклеина. Адаптировано по [233].

Миссенс-мутации, приводящие к аминокислотным заменам в N-конце (A53E, A53T, A30P, E46K, H50Q и G51D) (Рисунок 4), коррелируют с аутосомно-доминантными формами болезни Паркинсона, в то время как дупликация и

трипликация гена *SNCA*, как было показано, вызывают паркинсонизм с ранним началом [234]. Варианты α -синуклеина с заменами различаются только несколькими аминокислотными остатками, но это приводит к значительным изменениям их конформации и типу образующихся агрегатов [235].

Олигомерные агрегаты могут быть разделены на активные и неактивные, в зависимости от того, приводят ли они к образованию зрелых амилоидных фибрилл, или формируют аморфные, нефибриллярные образования [236] (Рисунок 5). К тому же, неясно, являются ли низкомолекулярные олигомеры α -синуклеина более токсичными, нежели зрелые фибриллы. Так, известно о сильном поражении дофаминергических нейронов черной субстанции у трансгенных животных, продуцирующих варианты α -синуклеина, которые образуют кольцевые/порообразные олигомеры (например, E57K и E35K), тогда как варианты белка, быстро формирующие фибриллы, были сравнительно менее токсичными [237]. Можно предположить, что варианты, образующие фибриллы, могут активно рекрутироваться в тельца Леви в агресомоподобные структуры, что предотвращает их взаимодействие с другими цитоплазматическими белками, а также вредное воздействие на клетку [238,239]. Стоит также отметить, что в головном мозге и спинномозговой жидкости пациентов с синуклеинопатиями обнаруживают повышение уровня олигомеров α -синуклеина по сравнению со здоровыми людьми [240].

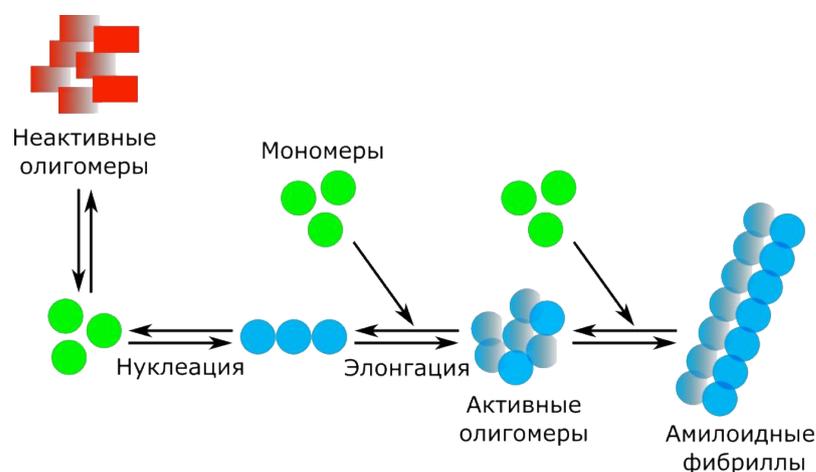


Рисунок 5. Схема образования активных и неактивных олигомеров α -синуклеина. Модифицировано из [236].

Результаты экспериментов на животных моделях и культурах клеток, включая культуры нейронов, указывают на патогенную роль агрегации α -синуклеина, которая приводит к нарушению синаптической передачи, работе митохондрий, стрессу эндоплазматического ретикулума, вызывает дефектную аутофагию, нейровоспаление и окислительный стресс [241,242]. Также было высказано предположение, что агрегация α -синуклеина в пресинаптических окончаниях влияет на сборку комплексов SNARE, снижая, таким образом, эффективность высвобождения дофамина [243]. Более того, некоторые синаптические белки и рецепторы нейротрансмиттеров (например, NMDA-рецепторы) были идентифицированы как предполагаемые партнеры взаимодействия α -синуклеина [244], что позволяет допустить участие α -синуклеина в различных заболеваниях, связанных с нарушениями нейротрансмиссии. Так, нами было показано, что α -синуклеин коагрегирует с белком NOS1AP, опосредованно взаимодействующим с NMDA-рецепторами [245].

1.3.3 Прионоподобные свойства α -синуклеина

Прионы представляют собой инфекционные агенты, в которых белок PrP^{Sc} с измененной конформацией рекрутирует и преобразует свой нормальный аналог PrP^C, создавая таким образом самораспространяющиеся белковые частицы с неправильной укладкой, которые могут передаваться от клетки к клетке [35,246]. В последние годы было выдвинуто предположение, что некоторые амилоидные белки, по-видимому, имеют аналогичный прионоподобный механизм распространения, среди которых α -синуклеин [247,248], β -амилоид [249], tau [250] и хантингтин [251].

В соответствии с моделью Браака, нейропатологическая стадия болезни Паркинсона следует строго стереотипному и пространственно-временному прогрессированию патологии Леви, предполагая распространение неправильно свернутого α -синуклеина через уязвимые нейроанатомически связанные пути [252]. Первоначально доказательства, подтверждающие прионоподобное

распространение α -синуклеина, были получены в результате наблюдения за агрегацией α -синуклеина в трансплантированных эмбриональных мезэнцефальных предшественниках нейронов через несколько лет после трансплантации и предполагали передачу патологии Леви от хозяина к трансплантату [253,254]. С тех пор накопленные данные показали, что небольшие агрегаты (семена) α -синуклеина, полученные из рекомбинантного белка или лизатов, полученных из пораженного болезнью мозга, могут распространяться в прионоподобной манере в нейрональных клетках и в грызунах [247,248,255].

Некоторые исследования показывают, что α -синуклеин может передаваться от клетки в клетку. Белок с помощью везикул может транспортироваться из клетки путем экзоцитоза с последующим высвобождением [256]. Есть также некоторые исследования, в которых утверждается, что α -синуклеин может распространяться между клетками подобно прионам [257,258].

1.4 Биоинформатический поиск потенциально амилоидогенных белков

В литературе отмечают, что специфические последовательности в амилоидных белках, называемые «горячими точками», могут действовать как семена амилоидогенеза [259,260]. Идентификация этих областей может помочь понять биологическую функцию этих белков. Аналогичным образом изучение эффектов точечных мутаций на амилоидогенные белки или пептиды представляет интерес с биологической точки зрения [259]. Учитывая решающую роль амилоидных белков во многих заболеваниях, очень важна правильная идентификация и прогнозирование амилоидных белков, их «горячих точек» и влияние мутаций на их амилоидогенность.

Идентификация белков, способных образовывать амилоиды, с помощью биологических и биохимических методов требует много времени и средств [261]. Для упрощения поиска новых амилоидов можно использовать биоинформатические подходы. Тем не менее, вычислительное прогнозирование амилоидогенных белков и их специфических «горячих точек», ответственных за агрегацию, а также влияние точечных мутаций на амилоидогенность представляет

собой сложную задачу, потому что белки, образующие амилоиды, мало схожи в последовательности и структуре.

В литературе описаны разнообразные методы идентификации амилоидогенных белков. В общих чертах их можно разделить на две группы, основанные на анализе структурных данных, или последовательности белков. Методы первой группы, такие как Aggrescan 3D [262] и AggScore [263] используют третичную 3D-структуру белка для предсказания. Однако они имеют недостаток, связанный с тем, что третичная структура белка должна быть доступна, а получение ее требует больших затрат времени и средств. Прогнозирование амилоидогенности белков с использованием структуры может стать бутылочным горлышком при крупномасштабном отборе кандидатов амилоидных белков. Следовательно, более широко используются методы, основанные на последовательности белков.

Алгоритмы AGGRESKAN [264,265], FoldAmyloid [266] предсказывают амилоидогенность, полагаясь на склонность к агрегации отдельных остатков в полипептидной цепи. Zyggregator и TANGO используют в анализе склонность к агрегации индивидуальных аминокислотных остатков для прогнозирования амилоидогенных белков. Waltz использует информацию из оценочных матриц, специфичных для позиции (PSSM, position specific scoring matrices), физико-химических свойств аминокислот и структур, полученных из программы FoldX для оценки гексапептидов на основе их амилоидогенности [267,268]. APPNN – основанный на нейронной сети амилоидный предсказатель, который использует биохимические и физико-химические свойства аминокислот [269].

Программа ArchCandy принимает во внимание геометрию образования фибриллы [10]. Ядро амилоидной фибриллы формирует β -аркаду – большое количество сложенных друг на друга β -арок, которые стабилизированы водородными связями и образованы двумя β -цепями, сообщающихся посредством петли. ArchCandy определяет вероятность образования таких мотивов с учетом аминокислотной последовательности. В амилоидных агрегатах β -арки могут образовывать либо одиночные β -аркадные структуры, либо серпантины –

β -структуры с несколькими соседними β -арками. Результатом разработки для воссоздания возможных β -серпантинов из отдельных β -арок, предсказанных программой ArchCandy, стал инструмент BetaSerpentine [270].

1.5 Адаптерный белок синтазы оксида азота 1 (NOS1AP)

1.5.1 Синтез оксида азота и его роль в патофизиологии психических заболеваний

В нашей лаборатории был проведен биоинформатический анализ с помощью программы ArchCandy, в результате которого было предсказано, что белок NOS1AP (также известный как CAPON) может являться потенциальным амилоидом, взаимодействующим с α -синуклеином. Адаптерный белок синтазы оксида азота 1 (NOS1AP) является цитозольным. Он связывает нейрональную синтазу оксида азота 1 (nNOS/NOS-I), и тем самым участвует в регуляции образования оксида азота (NO). NO представляет собой газообразный химический мессенджер, выполняющий несколько функций в организме человека [271]. Считается, что в центральной нервной системе NO участвует в нейротрансмиссии, например, регулируя биосинтез нейротрансмиттеров и действуя в качестве ретроградного мессенджера в глутаматергических синапсах для облегчения длительного потенцирования [272,273].

NO синтезируется из L-аргинина NO-синтазами (NOS). Существуют три основные формы этого фермента: нейрональная NOS (nNOS/NOS-I), индуцируемая NOS (iNOS/NOS-II) и эндотелиальная NOS (eNOS/NOS-III). Они кодируются генами *NOS1*, *NOS2* и *NOS3*, соответственно [274,275]. Показано, что nNOS взаимодействует с адаптерным белком NOS1AP (кодируемым геном *NOS1AP*) [276,277], который связывает nNOS с другими эффекторами, такими как Dexas1 и синапсин [278]. Продукция и активность различных форм NOS считается высокоспецифичной в зависимости от типа клетки, а также она дополнительно подвержена влиянию условий окружающей среды, что позволяет объяснить широкий спектр функций NO [279,280]. Из-за короткого периода

полураспада NO *in vivo*, показателями активности NOS считают его более устойчивые метаболиты, такие как нитриты (NO_2^-) и нитраты (NO_3^-), которые часто объединяют как NO-метаболиты (NO_x^-) [281].

В последние годы передачу сигналов NO изучали с точки зрения ее роли в патофизиологии некоторых психических заболеваний, включая большое депрессивное расстройство (БДР) [282], биполярное аффективное расстройство (БАР) [283] и шизофрению [284]. Для всех трех заболеваний наблюдали значительные изменения концентрации периферических NO_x^- , хотя данные противоречили друг другу [277]. Например, некоторые исследователи сообщали о снижении концентрации NO_x^- [284] у пациентов с шизофренией, тогда как в других исследованиях не выявляли существенных различий концентрации NO_x^- в плазме и сыворотке крови между пациентами с шизофренией и здоровым контролем [285]. К тому же, обычно исследования, как правило, сосредоточены только на каком-нибудь одном психическом заболевании, а размеры выборки часто ограничены. Таким образом, связь между концентрацией периферических NO_x^- и психическими расстройствами в настоящее время остается неясной.

1.5.2 Функции NOS1AP

Ген *NOS1AP* расположен на хромосоме 1 человека в регионе 1q22. NOS1AP состоит из 506 аминокислотных остатков и включает два домена: N-концевой фосфотирозин-связывающий домен (PTB) и C-концевой PDZ-связывающий домен (PDZ-BD) [286]. Описано несколько альтернативных транскриптов для *NOS1AP* [287,288]. NOS1AP посредством PDZ-BD взаимодействует с nNOS. Благодаря домену PTB NOS1AP соединяется с Dexas1, что приводит к образованию тройного комплекса белков NOS1AP, Dexas1 и nNOS, который необходим nNOS при активации Dexas1 [289]. С помощью домена PTB NOS1AP взаимодействует с синапсами I, II и III, образуя комплекс, необходимый для локализации nNOS в пресинаптических окончаниях [290]. Более того, с помощью этого же домена NOS1AP объединяется с белком Scribble, позволяя NOS1AP стать связующим звеном между Scribble и сигналингом Rho ГТФазы через β -Pix и

Git1 [291]. Известно, что NOS1AP колокализуется как с белком Scribble, так и с Vangl1 в клетках рака молочной железы, чего, однако, не наблюдается в здоровых клетках. Это позволяет допустить, что NOS1AP может вносить вклад в развитие этого вида рака [292]. Все это делает возможным предположить, что NOS1AP является важным адаптерным белком, входящим в ряд различных сигнальных комплексов.

NOS1AP взаимодействует с nNOS, что позволяет предположить его опосредованную роль в продукции NO [293]. Это предположение косвенно подтверждается обнаружением двух SNP в гене *NOS1AP*, которые связаны со значительным повышением концентрации NO_x^- у пациентов с БАП [294]. Что касается других NOS, показано, что NOS1AP в кардиомиоцитах не взаимодействует с eNOS [293], а в центральной нервной системе – с iNOS или eNOS [276].

NOS1AP связывает nNOS со специфическими белками-мишенями. Например, Dexas1 (в большом количестве присутствующий в мозге), активность которого зависит от NO. Показано, что nNOS способна воздействовать на Dexas1 в комплексе Dexas1/NOS1AP/nNOS. Кроме этого, активность Dexas1 может регулироваться N-метил-D-аспарататом (NMDA) в NO-зависимой манере [289].

NOS1AP участвует в регуляции активности NMDA-рецептора, возможно, снижая ее. Это является одним из предполагаемых механизмов, лежащих в основе развития шизофрении. Существуют различные модели, описывающие взаимодействие NOS1AP и nNOS [295]. Например, комплекс nNOS/PSD95 может рассматриваться как димеризация доменов PDZ, а лиганды nNOS-PDZ, такие как NOS1AP, будут конкурировать с PSD95 за взаимодействие (Рисунок 6, А). Другая модель допускает возможность того, что лиганд-связывающий карман домена PDZ остается доступным для дальнейшего рекрутирования своих собственных специфических мишеней (Рисунок 6, Б).

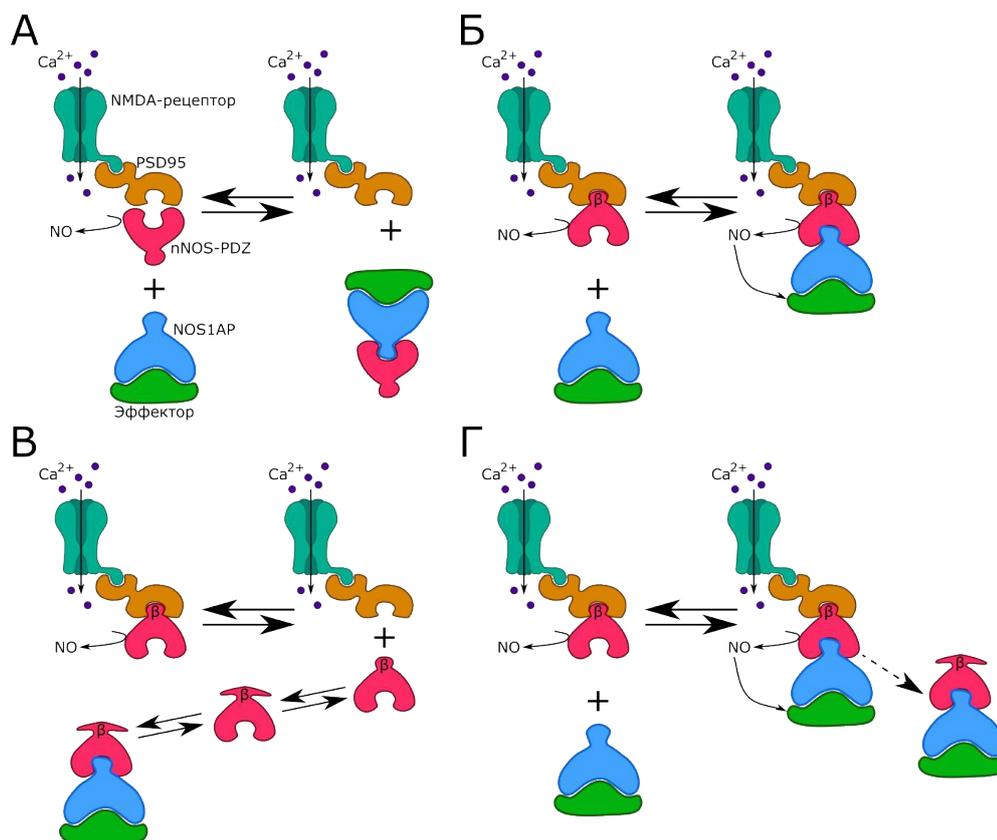


Рисунок 6. Различные модели взаимодействия NOS1AP с nNOS и их предполагаемые последствия. А – **Модель исключения.** Связывание PSD95 с nNOS исключает связывание с NOS1AP за счет взаимодействия PDZ-PDZ доменов PDZ белков PSD95 и nNOS и прямой конкуренции. При такой схеме nNOS, соединенный с NMDAR (через PSD95) производит активный NO. В этой модели комплексы nNOS/NOS1AP с эффекторами, такими как Dexas1, не будут непосредственно локализованы на рецепторе. Б – **Модель скаффолда.** Связывание nNOS посредством β-пальца (фланкирующий мотив вне основного домена PDZ) с PSD95 облегчает образование крупного комплекса, включающего NOS1AP (или другие лиганды с С-концевыми мотивами). Эта модель помещает nNOS вблизи к месту притока кальция, а эффекторы NOS1AP – близко к продуцируемому NO. В – **Модель с двумя состояниями.** Предполагается, что домен PDZ nNOS может существовать в двух конформационных состояниях. В одном он может связывать PSD95, но не NOS1AP, в другом – NOS1AP, но не PSD95. Это может объяснить конкуренцию между PSD95 и NOS1AP. В этой модели комплекс nNOS-NOS1AP располагается на расстоянии от рецептора NMDA, что ограничивает активацию nNOS в комплексе nNOS-NOS1AP. Г – **Модель отсроченного высвобождения.** В этой модели NOS1AP может взаимодействовать с незанятым карманом PDZ, но пока неопределенные механизмы постепенно приводят к потере связывания PSD95 с β-пальцем, предположительно, посредством конформационных изменений, что приводит к замедленной диссоциации комплекса nNOS/NOS1AP от рецептора. При этом эффекторный комплекс nNOS/NOS1AP локализуется рядом с рецептором и связанным с ним притоком кальция только в течение ограниченного времени. Адаптировано по [295].

Согласно еще одной модели, если С-конец NOS1AP будет закрепляться в кармане связывания домена PDZ nNOS, способом, отличным от упомянутых выше, стабилизируя аллостерическое конформационное изменение, которое препятствует связыванию PSD95 с β -пальцем nNOS, это может объяснить ингибирование взаимодействия PSD95/nNOS с помощью NOS1AP (Рисунок 6, В). Наконец, возможно, что NOS1AP действует как ингибитор взаимодействия nNOS/PSD95 только после некоторой задержки для того, чтобы отключить передачу сигнала, как только она была активирована (Рисунок 6, Г).

NOS1AP способен влиять на процессы, связанные с NMDA-рецепторами. Продемонстрировано, что NOS1AP регулирует нейрональную гибель клеток, опосредованную NMDA-рецептором [296]. Таким образом, предполагается, что NOS1AP способствует нейротрансмиссии и эксайтотоксичности. С другой стороны, сообщают, что NOS1AP ингибирует поступление Ca^{2+} через NMDA-рецепторы в нейроны [276]. Было продемонстрировано, что сверхпродукция NOS1AP ухудшает ток через кальциевые каналы L-типа, что приводит к укорочению продолжительности потенциала действия в желудочковых миоцитах [293]. Показано, что NOS1AP регулирует высвобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума [297].

Существует ряд свидетельств о взаимосвязи NOS1AP с развитием диабета. Показано, что повышенный уровень Ca^{2+} в островках Лангерганса активирует nNOS в поверхностном слое секреторных гранул инсулина и участвует в процессе секреции инсулина [298]. Кроме того, введение холестерина для ингибирования активности nNOS может препятствовать процессу секреции инсулина, что указывает на биологическую роль фермента в этом процессе [299,300]. Было обнаружено, что полиморфизм *NOS1AP* связан с предрасположенностью к первичному появлению диабета у пациентов, получавших блокаторы кальциевых каналов. Фармакогеномные исследования показали, что варианты гена *NOS1AP* являются одним из важных факторов, влияющих на различия в эффективности гипогликемических средств, в частности, производных сульфонилмочевины [301,302]. Одно клиническое исследование показало, что вариант гена *NOS1AP*

был связан с повышенной предрасположенностью к сахарному диабету 2 типа в китайской популяции [303]. Также есть сведения, что полиморфизм гена *NOS1AP* может влиять на терапевтическую эффективность натеглинида у пациентов с сахарным диабетом 2 типа [304].

Было показано, что сверхпродукция *NOS1AP* повышает чувствительность печени к инсулину и блокирует p-p38MAPK в печени мутантных мышей, гомозиготных по гену *ob*, кодирующему лептин [305]. В другом исследовании продукция *NOS1AP* в печени обратно коррелировала с образованием активных форм nNOS. Связывание *NOS1AP* с nNOS в нейронах способствовало активности nNOS в отношении белка-мишени. Таким образом можно предположить, что *NOS1AP* оказывает свое действие на печень посредством инактивации nNOS [306].

На клеточном уровне *NOS1AP* также регулирует динамику актина, формирование нейрональных дендритов и миграцию раковых клеток [11,287,288,291,292]. Мутантные мыши, гомозиготные по гену *NOS1AP*, жизнеспособны во взрослом возрасте, однако они склонны к сердечной аритмии и дисфункции при воздействии агентов, вызывающих окислительный стресс [286,297]. Это согласуется с литературными данными, демонстрирующими, что распространенные варианты *NOS1AP* связаны с аритмиями у взрослых людей [307,308]. Выявлено, что рецессивные варианты *NOS1AP* нарушают CDC42/DIAPH-зависимое ремоделирование актина, вызывают aberrантный органоидный гломерулогенез и приводят к гломерулопатии у людей и мышей [286].

1.5.3 Связь *NOS1AP* с психическими расстройствами

Существует связь *NOS1AP* с различными психическими расстройствами. Некоторые исследования сообщают, что полиморфизм гена *NOS1AP* связаны с шизофренией и другими психическими расстройствами [23,277]. Например, у больных шизофренией в крови [309] и дорсолатеральной префронтальной коре (длПФК) [22] увеличен уровень мРНК гена *NOS1AP*. В случае, если уровень

мРНК, и как следствие, белка, повышен вследствие болезни, может оказаться верной предполагаемая связь NOS1AP с глутаматной гипотезой шизофрении, обуславливающей развитие заболевания недостаточной активацией NMDA-рецептора [22,310,311] (Рисунок 7).

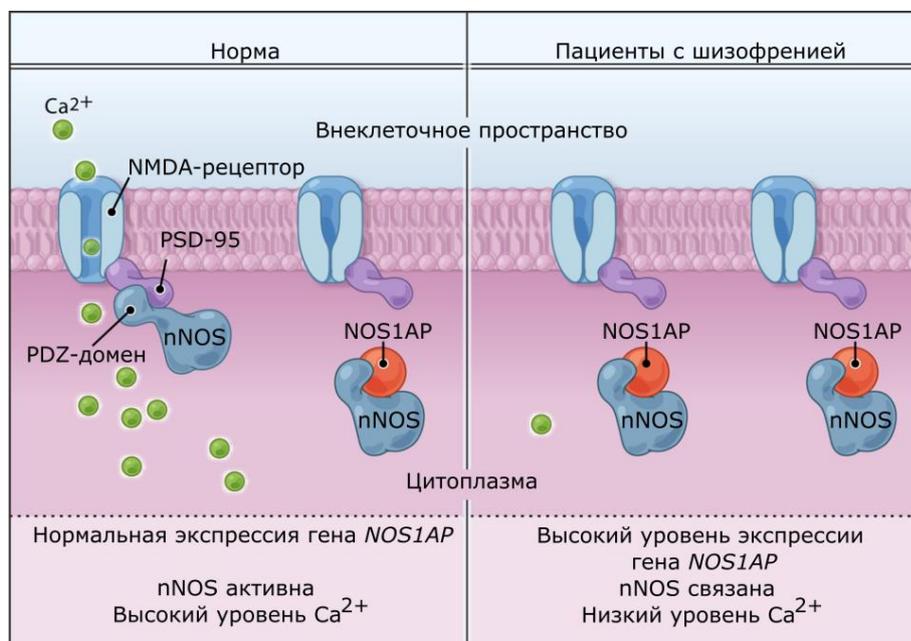


Рисунок 7. NOS1AP связывает синтазу оксида азота и таким образом регулирует нейротрансмиссию глутамата, опосредованную NMDA-рецептором. Связывание NOS1AP приводит к уменьшению количества комплексов NMDA-рецептора с синтазой оксида азота (nNOS), результатом чего является снижению притока кальция, контролируемого NMDA-рецептором, а также каталитическая инактивация синтаза оксида азота. Этот процесс, как предполагают, может связывать повышенный уровень экспрессии *NOS1AP* с глутаматной гипотезой развития шизофрении (модифицировано по [310]).

У пациентов с большим депрессивным расстройством отмечается повышенная иммунореактивность NOS1AP в длПФК и передней поясной коре [312]. Варианты гена *NOS1AP* ассоциированы с эндофенотипами шизофрении [313–315] и фенотипами депрессии при шизофрении [316]. Кроме того, варианты *NOS1AP* связаны с тяжестью симптомов, а также симптомами депрессии и тревоги при посттравматическом стрессовом расстройстве (ПТСР) [317,318]. Помимо ассоциации с шизофренией, было показано, что две редкие несинонимичные замены позволяют разделить обсессивно-компульсивное

расстройство (ОКР) и расстройство аутистического спектра (РАС) [319], что может говорить о плейотропном эффекте NOS1AP на психические заболевания.

Показано, что NOS1AP активирован в пирамидальных клетках CA1 в головном мозге больных Альцгеймером [320]. Экспрессия NOS1AP индуцирует повышенный уровень фосфорилированного, олигомерного и нерастворимого белка tau. Напротив, дефицит NOS1AP облегчает связанные с болезнью Альцгеймера патологические фенотипы на моделях таупатии [25]. Эти сведения показывают, что NOS1AP может играть важную роль в патогенезе болезни Альцгеймера.

1.6 Заключение

Развитие различных нейродегенеративных заболеваний связано с появлением белковых агрегатов, зачастую обладающих амилоидными свойствами. Амилоиды представляют собой белковые агрегаты с кросс- β -структурой [1,2,30,321]. Открытие коагрегации белков с амилоидами выявило новый тип межмолекулярных взаимодействий. В настоящее время становится все более очевидно, что такие взаимодействия могут играть важную роль в патогенезе амилоидозов человека и животных [13].

Болезнь Паркинсона – второе по распространенности нейродегенеративное заболевание. Оно характеризуется аномальным накоплением и агрегацией α -синуклеина в тельцах Леви и нейритах Леви [322]. Имеются данные о том, что α -синуклеин способен коагрегировать с другими амилоидами [13]. Таким образом, исследование коагрегации α -синуклеина с другими белками может помочь понять механизмы болезни Паркинсона и разработать новые стратегии лечения этого заболевания.

Одним из белков, с которым физически взаимодействует α -синуклеин, является NOS1AP. На это указывают результаты протеомного скрининга, основанного на ко-иммунопреципитации с последующей масс-спектрометрией [26]. Белок NOS1AP связывают с развитием различных психическим расстройств, главным образом шизофрении [23,277]. Таким образом, можно сказать, что

изучение способности белка NOS1AP образовывать стабильные агрегаты и взаимодействовать с α -синуклеином может помочь понять возможные молекулярные механизмы развития таких заболеваний, как шизофрения и болезнь Паркинсона.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Плазмиды

Плазмиды, использованные в работе, перечислены в таблице 1. Плазмиды серии pDONR221 (pDONR221-NOS1AP, pDONR221-SNCA) являются коммерческими плазмидами Thermo Fisher Scientific. Плазмиды этой же серии, кодирующие фрагменты NOS1AP (pDONR221-NOS1AP-1-291, pDONR221-NOS1AP-292-390, pDONR221-NOS1AP-391-506), были получены в ходе работы с помощью ПЦР с праймерами (Таблица 4, а также раздел 2.4) к этим последовательностям и последующей вставкой ПЦР продукта в вектор pDONR221 с помощью клонирования (GateWay).

Плазмиды для системы C-DAG получены в результате использования плазмид серии pDONR221 с кодирующими последовательностями изучаемых белков, в качестве целевого вектора был использован pVSGW. Для работы с клетками дрожжей были получены плазмиды на основе векторов pAG416GPD-EGFP, pAG416GPD-EYFP и pAG415GPD-Cerulean. Для работы с культурами клеток млекопитающих плазмиды pDONR221 применялись для получения вектором на основе pGLAP1, pDEST-V1-ORF и pDEST-V2-ORF. Плазмиды для наработки белка были получены на основе pDest-527. При получении этих конструкций была использована методика рекомбинационного клонирования. Плазида pDest-527-nSNCA была получена с помощью рестрикции и лигирования.

Полученные плазмиды проверяли либо с помощью рестрикционного анализа ферментами BglI, EcoRV, PvuI, NsiI, PvuII, NcoI, HincII (в зависимости от плазмиды), либо секвенированием (раздел 2.4.5).

Таблица 1 – Плазмиды, использованные в работе. CsgAss – сигнальный пептид белка CsgA, необходимый для экспорта белка на поверхность клетки. araBAD – арабинозный оперон. GAP – промотор гена *GAPDH* (глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы). CMV – цитомегаловирусный промотор. T7 – промотор фага T7.

Название	Белок интереса	Маркер	Промотор	Источник
pDONR221	—	<i>kanR</i>	—	Thermo Fisher Scientific (Ultimate ORF Clones) (12536017)
pDONR221-NOS1AP	NOS1AP	<i>kanR</i>	—	Thermo Fisher Scientific (Ultimate ORF Clones)
pDONR221-SNCA	α Syn	<i>kanR</i>	—	Thermo Fisher Scientific (Ultimate ORF Clones)
pDONR221-SNCA(A53T)	α Syn(A53T)	<i>kanR</i>	—	Получены в этой работе
pDONR221-SNCA(A53E)	α Syn(A53E)	<i>kanR</i>	—	
pDONR221-SNCA(E46K)	α Syn(E46K)	<i>kanR</i>	—	
pDONR221-SNCA(A30P)	α Syn(A30P)	<i>kanR</i>	—	
pDONR221-NOS1AP-1-291	NOS1AP(1-291)	<i>kanR</i>	—	
pDONR221-NOS1AP-292-390	NOS1AP(292-390)	<i>kanR</i>	—	
pDONR221-NOS1AP-391-506	NOS1AP(391-506)	<i>kanR</i>	—	
pVS72	CsgAss-Sup35NM	<i>ampR</i>	araBAD	[36]
pVS105	CsgAss-Sup35M	<i>ampR</i>	araBAD	[36]
pVSGW-ccdB		<i>ampR</i>	araBAD	[323]
pVSGW-NOS1AP	CsgAss-NOS1AP	<i>ampR</i>	araBAD	Получены в этой работе
pVSGW-NOS1AP-1-291	CsgAss-NOS1AP(1-291)	<i>ampR</i>	araBAD	
pVSGW-NOS1AP-292-390	CsgAss-NOS1AP(292-390)	<i>ampR</i>	araBAD	
pVSGW-NOS1AP-391-506	CsgAss-NOS1AP(391-506)	<i>ampR</i>	araBAD	

Продолжение таблицы 1

Название	Белок интереса	Маркер	Промотор	Источник
pAG416GPD-EGFP- ccdB	EGFP	<i>URA3</i>	GAP	Addgene (Plasmid #14196)
pAG416GPD-EGFP- NOS1AP-1-291	EGFP-NOS1AP(1-291)	<i>URA3</i>	GAP	Получены в этой работе
pAG416GPD-EGFP- NOS1AP-292-390	EGFP-NOS1AP(292-390)	<i>URA3</i>	GAP	
pAG416GPD-EGFP- NOS1AP-391-506	EGFP-NOS1AP(391-506)	<i>URA3</i>	GAP	
pgLAP1	EGFP	<i>hygR</i>	CMV	Addgene (Plasmid #19702)
pgLAP1-SNCA	EGFP- α Syn	<i>hygR</i>	CMV	Получены в этой работе
pgLAP1-NOS1AP	EGFP-NOS1AP	<i>hygR</i>	CMV	
pgLAP1-NOS1AP- 1-291	EGFP-NOS1AP(1-291)	<i>hygR</i>	CMV	
pgLAP1-NOS1AP- 292-390	EGFP-NOS1AP(292-390)	<i>hygR</i>	CMV	
pgLAP1-NOS1AP- 391-506	EGFP-NOS1AP(391-506)	<i>hygR</i>	CMV	
pDEST-V1-ORF	V1	<i>bleoR</i>	CMV	Addgene (Plasmid #73635)
pDEST-V1-SNCA	V1- α Syn	<i>bleoR</i>	CMV	Получены в этой работе
pDEST-V1-NOS1AP	V1-NOS1AP	<i>bleoR</i>	CMV	
pDEST-V1-NOS1AP- 1-291	V1-NOS1AP(1-291)	<i>bleoR</i>	CMV	
pDEST-V1-NOS1AP- 292-390	V1-NOS1AP(292-390)	<i>bleoR</i>	CMV	
pDEST-V1-NOS1AP- 391-506	V1-NOS1AP(391-506)	<i>bleoR</i>	CMV	
pDEST-V2-ORF	V2	<i>bleoR</i>	CMV	Addgene (Plasmid #73636)
pDEST-V2-SNCA	V2- α Syn	<i>bleoR</i>	CMV	Получены в этой работе
pDEST-V2-NOS1AP	V2-NOS1AP	<i>bleoR</i>	CMV	
pDEST-V2-NOS1AP- 1-291	V2-NOS1AP(1-291)	<i>bleoR</i>	CMV	
pDEST-V2-NOS1AP- 292-390	V2-NOS1AP(292-390)	<i>bleoR</i>	CMV	
pDEST-V2-NOS1AP- 391-506	V2-NOS1AP(391-506)	<i>bleoR</i>	CMV	
pAG416GPD-EYFP- ccdB	EYFP	<i>URA3</i>	GAP	Addgene (Plasmid #14220)

Окончание таблицы 1

Название	Белок интереса	Маркер	Промотор	Источник
pAG416GPD-EYFP-SNCA	EGFP- α Syn	<i>URA3</i>	GAP	Получены в этой работе
pAG416GPD-EYFP-NOS1AP	EYFP-NOS1AP	<i>URA3</i>	GAP	
pAG416GPD-EYFP-NOS1AP-1-291	EYFP-NOS1AP(1-291)	<i>URA3</i>	GAP	
pAG416GPD-EYFP-NOS1AP-292-390	EYFP-NOS1AP(292-390)	<i>URA3</i>	GAP	
pAG416GPD-EYFP-NOS1AP-391-506	EYFP-NOS1AP(391-506)	<i>URA3</i>	GAP	
pAG415GPD-Cerulean-ccdB	Cerulean	<i>LEU2</i>	GAP	Addgene (Plasmid #14410)
pAG415GPD-Cerulean-SNCA	Cerulean- α Syn	<i>LEU2</i>	GAP	Получены в этой работе
pAG415GPD-Cerulean-SNCA(A53T)	Cerulean- α Syn(A53T)	<i>LEU2</i>	GAP	
pAG415GPD-Cerulean-SNCA(A53E)	Cerulean- α Syn(A53E)	<i>LEU2</i>	GAP	
pAG415GPD-Cerulean-SNCA(A30P)	Cerulean- α Syn(A30P)	<i>LEU2</i>	GAP	
pAG415GPD-Cerulean-SNCA(E46K)	Cerulean- α Syn(E46K)	<i>LEU2</i>	GAP	
pAG415GPD-Cerulean-NOS1AP	Cerulean-NOS1AP	<i>LEU2</i>	GAP	
pDest-527	—	<i>ampR</i>	T7	
pDest-527-SNCA	α Syn-6xHis	<i>ampR</i>	T7	Получены в этой работе
pDest-527-nSNCA	α Syn	<i>ampR</i>	T7	
pDest-527-NOS1AP(292-390)	NOS1AP(292-390)-6xHis	<i>ampR</i>	T7	
pDest-527-NOS1AP(391-506)	NOS1AP(391-506)-6xHis	<i>ampR</i>	T7	

2.2 Штаммы микроорганизмов и клеточные линии

2.2.1 Штаммы микроорганизмов

2.2.1.1 Бактериальные штаммы

Для рутинной наработки плазмид были использованы штамм *Escherichia coli* TOP10 и DH5 α . Для получения плазмиды pDest527-nSNCA использовали штамм *E. coli* XL10-Gold.

Для работы в системе C-DAG использовали штамм VS39 *E. coli* [36]. Штамм VS39 является производным штамма MC4100, который способен образовывать керли. У VS39 делетированы гены керли *csgA*, *csgB* и *csgC* с заменой на ген *neo*, обеспечивающий устойчивость к канамицину. VS39 дополнительно включает плазмиду pVS76, которая содержит ген, кодирующий белок керли CsgG.

Для сверхпродукции гетерологичных белков использовали штаммы *E. coli*: NiCo21(DE3), BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, Origami и T7 (Таблица 2) (New England Biolabs).

Таблица 2 – Бактериальные штаммы, использованные для продукции плазмид и белков

Штамм	Генотип
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>
XL10-Gold	Tet ^r Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacI^fZDM15 Tn10</i> (Tet ^r) <i>Amy Cam^r</i>]
DH5 α	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20</i> ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (<i>r_K⁻m_K⁺</i>), λ ⁻
NiCo21(DE3)	<i>can::CBD fhuA2 [lon] ompT gal</i> (λ DE3) [<i>dcm</i>] <i>arnA::CBD slyD::CBD glmS6Ala</i> Δ <i>hsdS</i> λ DE3 = λ <i>sBamHIo</i> Δ <i>EcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21</i> Δ <i>nin5</i>
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B⁻, m_B⁻</i>) <i>gal dcm</i> (DE3)
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B⁻, m_B⁻</i>) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS(Cam ^R)

Продолжение таблицы 2

Штамм	Генотип
Origami	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1 ahpC gor522:: Tn10 trxB (Kan^R, Tet^R)</i>
T7	<i>fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10-Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10-Tet^S) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10</i>

2.2.1.2 Дрожжевые штаммы

В работе использовали штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* 74-D694 (*MATa ade1-14(UGA) trp1-289(UAG) ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 [psi⁻] [PIN⁺]*) [324] и 2-74-D694 (*MATa ade1-14(UGA) trp1-289(UAG) ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 [psi⁻] [pin⁻]*) (любезно предоставлен Андреем Георгиевичем Матвеевко).

2.2.2 Клеточные линии млекопитающих

Клеточная линия HEK293T была любезно предоставлена Католиковой Натальей Викторовной. Линия HEK293T является вариантом линии HEK293, полученной из эмбриональных почек человека. HEK293T экспрессирует мутантный температурно-чувствительный вариант SV40 Т-антигена [325]. Применяется для временной трансфекции и экспрессии белков.

Клеточная линия IMR-32 была любезно предоставлена Качкиным Даниилом Валерьевичем. Клетки IMR-32 были исходно получены из тканей нейробластомы головного мозга [326].

2.2.3 Среды и условия культивирования

При рутинном культивировании бактериальных штаммов использовали стандартные среды LB (жидкую и твёрдую) [327]. Для получения твердых сред добавляли агар до конечной концентрации 2,5-3% (w/v). Штаммы инкубировали при 37 °С. Для селекции использовали ампициллин (100 мкг/мл) или канамицин (50 мкг/мл). При культивировании в жидкой среде использовали перемешивание со скоростью 200 об/мин.

Для метода C-DAG трансформантов штамма VS39 выращивали на твёрдой среде LB с добавлением ампициллина (100 мкг/мл), хлорамфеникола (25 мкг/мл), 0,2% (w/v) L-арабинозы, 1 мМ IPTG (изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид) и красителя Конго красный (10 мкг/мл) в комбинации, зависящей от назначения среды (Таблица 3) [36]. Клетки инкубировали при 22 °С, 26 °С и 37 °С для подбора оптимальных условиях, при которых положительный и отрицательный контроль будут давать явные отличия.

Клетки дрожжей растили на полной среде YEPD. Дрожжевых трансформантов культивировали на синтетических средах (SC), с добавлением необходимых аминокислот и азотистых оснований, за исключением урацила и/или лейцина (SC-U и SC-UL) при 30 °С [328].

Таблица 3 – Состав сред для бактериальной системы C-DAG

Компонент среды	Среда для контроля	Среда для индукции	Среда для индукции с Конго красным
ампициллин	100 мкг/мл	100 мкг/мл	100 мкг/мл
хлорамфеникол	25 мкг/мл	25 мкг/мл	25 мкг/мл
L-арабиноза	0	0,2% (w/v)	0,2% (w/v)
IPTG	0	1 мМ	1 мМ
Конго красный	0	0	10 мкг/мл

Культуры клеток HEK293T выращивали на среде DMEM, культуры клеток IMR-32 – на среде RPMI (Thermo Fisher Scientific). В среду добавляли эмбриональную бычью сыворотку до 10% (w/v) и антибиотики (пенициллин и стрептомицин до конечных концентраций 100 ед/мл и 100 мкг/мл, соответственно). Клетки культивировали при температуре 37 °С в атмосфере 5% CO₂.

2.3 Генетические методы

2.3.1 Трансформация дрожжей и бактерий

Трансформацию бактериальных штаммов TOP10 и XL10-Gold осуществляли по стандартной методике с использованием заранее приготовленных химически компетентных клеток. Трансформацию штаммов VS39, NiCo21(DE3), BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, Origami и T7 проводили по стандартной методике с использованием CaCl_2 [329]. Дрожжевую трансформацию осуществляли по стандартной методике с использованием ацетата лития [330].

2.3.2 Трансфекция клеток млекопитающих

Трансфекцию клеток HEK293T и IMR-32 осуществляли с помощью TurboFect Transfection Reagent (Thermo Scientific) или TransIntro EL Transfection Reagent (TransGen Biotech) согласно протоколам производителей. Для исследования физического взаимодействия двух белков клетки трансфицировали одновременно двумя плазмидами, каждая из которых содержала последовательность, кодирующую один из белков интереса.

2.4 Молекулярно-биологические методы

В ходе работы использовали стандартные методы работы с нуклеиновыми кислотами: электрофорез ДНК в агарозном геле, рестрикцию, лигирование [327]. При постановке реакций рестрикции и лигирования также были учтены рекомендации производителей соответствующих ферментов. Для очистки ПЦР-продуктов, плазмид, выделения ДНК из геля использовали соответствующие наборы реактивов, согласно методике, рекомендованной производителем (Thermo Fisher Scientific).

2.4.1 Получение конструкций, кодирующих фрагменты белков интереса

Для получения плазмид, кодирующих фрагменты белка NOS1AP, осуществляли реакцию ПЦР с использованием в качестве матрицы плазмидной ДНК pDONR221-NOS1AP. Для синтеза ДНК мы использовали полимеразу Taq (SibEnzyme). При подготовке реакционной смеси использовали стандартную методику [327]. При амплификации использовали праймеры, перечисленные в таблице 4. Для проведения реакции использовали программу, представленную в таблице 5. Температура отжига праймеров была подобрана экспериментально.

Таблица 4 – Праймеры для амплификации последовательностей, кодирующих фрагменты NOS1AP. В последовательностях праймеров подчеркнуты attB-сайты.

Название	Последовательность	Аmplифицируемый фрагмент
NOS1AP-F-292-390	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG</u> <u>GCTACCAGATGCAGCTCC</u>	NOS1AP(292-390)
R_NOS1AP(HindIII)_attB2	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG</u> <u>GGTAAGCTTCTAGTCACAGAGCACGG</u> GCAG	
NOS1AP_1_291_ NAR_attB1_forward_primer	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG</u> <u>GCTTCATGCCTAGCAAAACCAAG</u>	NOS1AP(1-291)
NOS1AP_1_291_ NAR_attB2_reverse_primer	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG</u> <u>GGTTCTAGTGGTGAGTGGACAG</u>	
NOS1AP_391_506_ NAR_attB1_forward_primer	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG</u> <u>GCTTCCCCACGACCCCTAAGCC</u>	NOS1AP(391-506)
NOS1AP_391_506_ NAR_attB2_reverse_primer	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG</u> <u>GGTTCTACACGGCGATCTCATC</u>	

Таблица 5 – Программа ПЦР для амплификации последовательностей, кодирующих фрагменты белков интереса

Денатурация ДНК	Амплификация ДНК				Завершение синтеза ДНК
	Денатурация ДНК	Отжиг праймеров	Синтез ДНК	Количество циклов амплификации	
5 мин, 94 °С	30 сек, 94 °С	30 сек, 55 °С	90 сек, 72 °С	30	5 мин, 72 °С

Далее смесь после ПЦР подвергали обработке рестриктазой DpnI (Thermo Scientific). К 15 мкл ПЦР-продукта добавляли 3 мкл буфера 10x Buffer Tango (Thermo Scientific), 0,2 мкл фермента DpnI и 11,8 мкл воды. Смесь инкубировали при 37 °С в течение 6 часов, после чего использовали для рекомбинационного клонирования с набором BP Clonase II (раздел 2.4.3.1). Затем осуществляли трансформацию штамма *E. coli* DH5 α с использованием смеси после клонирования. Бактериальные клетки высевали на селективную среду, культивировали 12-16 часов при 37 °С, после чего отбирали трансформантов.

2.4.2 Получение конструкций, кодирующих варианты α -синуклеина с аминокислотными заменами

Для получения плазмид, кодирующих варианты α -синуклеина с заменами, осуществляли реакцию ПЦР с использованием в качестве матрицы плазмидной ДНК pDONR221-SNCA. Для синтеза ДНК мы использовали полимеразу AccuPrime Pfx (Invitrogen). При амплификации использовали праймеры, перечисленные в таблице 6.

Таблица 6 – Праймеры для амплификации последовательностей, кодирующих варианты α -синуклина с заменами. Вносимые нуклеотидные замены подчеркнуты.

Название	Последовательность	Вносимая замена
SNCA_Ala53Thr_Forward	GGTGCATGGTGTG <u>CA</u> ACAGTGGCTGAGAAGA CC	Ala53Thr
SNCA_Ala53Thr_Reverse	GGTCTTCTCAGCCACTGTTG <u>T</u> CACACCATGCAC C	
SNCA_Ala53Glu_Forward	GGTGCATGGTGTGG <u>A</u> AACAGTGGCTGAGAAGA CC	Ala53Glu
SNCA_Ala53Glu_Reverse	GGTCTTCTCAGCCACTGTT <u>T</u> CCACACCATGCAC C	
SNCA_Ala30Pro_Forward	GGTGTGGCAGAAGCACCAGGAAAGACAAAAGA GG	Ala30Pro
SNCA_Ala30Pro_Reverse	CCTCTTTTGTCTTTCCTGGTGTCTTCTGCCACACC	
SNCA_Glu46Lys_Forward	GGCTCCAAAACCAAGA <u>A</u> AGGGAGTGGTGCATGG	Glu46Lys
SNCA_Glu46Lys_Reverse	CCATGCACCACTCCCT <u>T</u> CTTGGTTTTGGAGCC	

Для проведения реакции использовали программу, представленную в таблице 7. Температуру отжига праймеров подбирали экспериментально.

Таблица 7 – Программа ПЦР для амплификации последовательностей, кодирующих варианты α -синуклина с заменами

Денатурация ДНК	Амплификация ДНК				Завершение синтеза ДНК
	Денатурация ДНК	Отжиг праймеров	Синтез ДНК	Количество циклов амплификации	
5 мин, 95 °C	30 сек, 95 °C	30 сек, 63 °C	15 мин, 68 °C	18	30 мин, 68 °C

Далее смесь после ПЦР подвергали обработке рестриктазой DpnI (Thermo Scientific). К 10 мкл ПЦР-продукта добавляли 2 мкл буфера 10x Buffer Tango (Thermo Scientific), 1 мкл фермента DpnI и 7 мкл воды. Смесь инкубировали при 37 °С в течение 6 часов. Затем осуществляли трансформацию штамма *E. coli* DH5 α с использованием смеси после инкубации. Бактериальные клетки высевали на селективную среду, культивировали 12-16 часов при 37 °С, после чего отбирали трансформантов.

2.4.3 Рекомбинационное клонирование (Gateway)

2.4.3.1 Реакция с набором BP Clonase

Для проведения клонирования использовали набор BP Clonase™ II Enzyme mix (Thermo Fisher Scientific). Компоненты реакционной смеси:

- 1) ПЦР-фрагмент с *att* сайтами – 1 мкл;
- 2) Вектор назначения (pDONR221) – 150 нг;
- 3) BP-клоназа 2 – 1 мкл;
- 4) Буфер TE – до 9 мкл.

Смесь инкубировали при 25 °С в течение 2 часов, после чего добавляли 1 мкл раствора протеиназы К из набора и инкубировали 10 минут при 37 °С.

2.4.3.2 Реакция с набором LR Clonase

Для проведения клонирования использовали набор LR Clonase™ II Enzyme mix (Thermo Fisher Scientific). Компоненты реакционной смеси:

- 1) pDONR221 с геном интереса – 150 нг;
- 2) Вектор назначения (pDest527, pVSGW-ccdB, pAG416GDP-EGFP, pAG416GPD-EYFP-ccdB, pAG415GPD-Cerulean-ccdB) – 150 нг;
- 3) LR-клоназа 2 – 1 мкл;
- 4) Буфер TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)) – до 9 мкл.

Смесь инкубировали при 25 °С в течение 2 часов, после чего добавляли 1 мкл раствора протеиназы К из набора и инкубировали 10 минут при 37 °С.

2.4.4 Получение плазмиды pDest527-nSNCA

Для продукции нативного α -синуклеина (α Syn) в клетках бактерий *E.coli* была сконструирована плаزمида pDest527-nSNCA (n — от native). Для этого мы вырезали фрагмент длиной 72 п.о., несущий участок, кодирующий метку 6xHis, с помощью рестрикции с использованием ферментов NdeI (Fermentas) и NcoI (Fermentas) из плазмиды pDest527-SNCA (Рисунок 8).

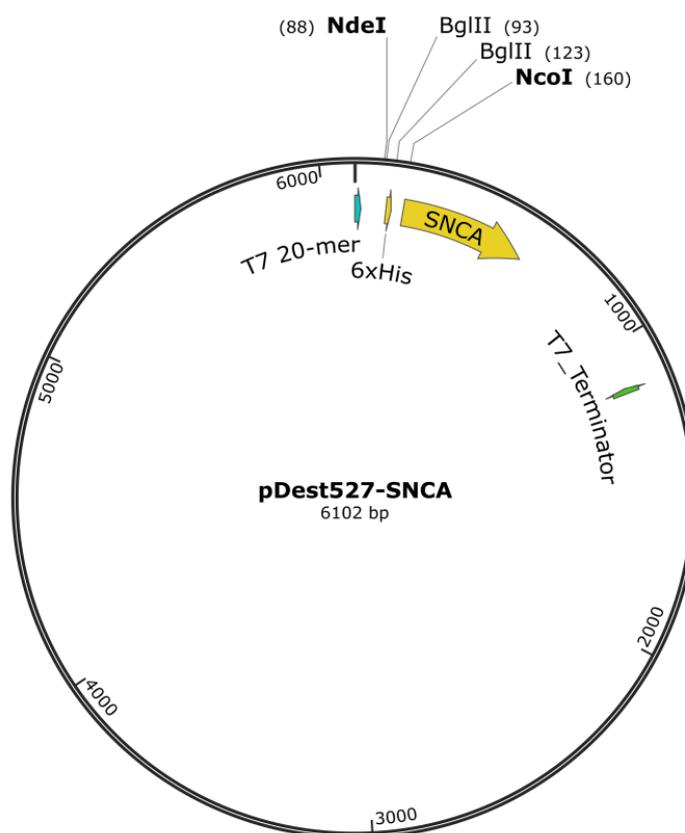


Рисунок 8. Физическая карта плазмиды pDest527-SNCA. NdeI, NcoI и BglII указывают на расположение одноименных сайтов рестрикции. T7 20-mer и T7_Terminator обозначают места посадки праймеров, используемых для ПЦР с колоний.

Фрагменты плазмиды после обработки рестриктазами NdeI и NcoI разделяли в 2% (w/v) агарозном геле. ДНК выделяли из геля, измеряли концентрацию на спектрофотометре NanoDrop 2000C, а затем подвергали обработке фрагментом Кленова (Thermo Scientific) по методике производителя. Полученную смесь инкубировали 10 минут при 37 °C, затем 10 минут при 75 °C

для циклизации плазмиды. После этого осуществляли лигазную реакцию с помощью ДНК-лигазы T4 (Thermo Scientific). Затем трансформировали компетентные клетки бактериального штамма *E. coli* XL10-Gold смесью после лигазной реакции. Трансформантов высевали на чашки со средой LB с добавлением ампициллина до концентрации 100 мкг/мл. На следующий день (примерно через 12-16 часов) отбирали с чашки колонии трансформантов и проверяли наличие нужной колонии при помощи метода ПЦР. Для этого с чашки стерильной палочкой отбирали колонии, каждую из них ресуспендировали в 20 мкл стерильной воды, и затем пробу инкубировали 5 минут при 95 °С. Смесью центрифугировали при скорости 14000 об/мин в течение 5 минут. Отбирали 1 мкл надосадочной фракции и использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами T7_Terminator (GCTAGTTATTGCTCAGCG) и T7 20-mer (TAATACGACTCACTATAGGG). Для синтеза ДНК использовали Taq полимеразу (SibEnzyme) согласно рекомендациям производителя. Программа ПЦР представлена в таблице 8. Всего было проанализировано 53 трансформанта.

Таблица 8 – Программа амплификации ДНК, кодирующей α -синуклеин

Денатурация ДНК	Амплификация ДНК				Завершение синтеза ДНК
	Денатурация ДНК	Отжиг праймеров	Синтез ДНК	Количество циклов амплификации	
5 мин, 94 °С	30 сек, 94 °С	30 сек, 55 °С	60 сек, 72 °С	30	5 мин, 72 °С

Наличие и размер ПЦР-продуктов проверяли при помощи электрофореза в 2% (w/v) агарозном геле. При вырезании из плазмиды pDest527-SNCA фрагмента, несущего метку 6xHis, размер плазмиды уменьшается на 72 п.о. Мы детектировали ПЦР-продукт ожидаемого размера (на 72 п.о. меньше по сравнению с исходной плазмидой).

Дополнительной проверкой отсутствия в плазмиде фрагмента, кодирующего метку 6xHis, является обработка рестриктазой BglII, т.к. в исходной

плазмиде сайты рестрикции этого фермента находятся только в вырезаемом фрагменте (Рисунок 8). Из отобранных клонов выделяли плазмиды, которые затем обрабатывали ферментом BglII, чтобы проверить, произошло ли разрезание плазмиды. Конструкции, которые не были гидролизованы BglII, использовали для трансформации бактериального штамма *E. coli* NiCo21(DE3).

Еще одной проверкой успешного вырезания фрагмента, несущего метку 6xHis, являлась вестерн-блот гибридизация с антителами к метке 6xHis, т.к. при потере этой метки белок, синтезирующийся в клетках трансформантов, не должен связывать эти антитела. При этом необходимо было убедиться, что клетки сверхпродуцируют белок нужного размера. Трансформантов бактериального штамма *E. coli* NiCo21 засеивали в селективную жидкую среду LB с добавлением ампициллина и инкубировали в течение ночи. На следующий день эти культуры разводили до $OD(600 \text{ нм}) = 0,3$, отбирали 1 мл аликвоты «до индукции» и добавляли к оставшейся культуре 1 mM IPTG для индукции сверхпродукции α -синуклеина. Через два часа отбирали пробы для проверки наличия α -синуклеина с использованием метода SDS-PAGE. Перед нанесением осажденные клетки инкубировали при 100 °C в течение 5 минут, а затем центрифугировали полученную смесь на максимальной скорости в течение 30 секунд. Электрофорез проводили в двух повторностях. Белки из одного геля элюировали на мембрану с помощью полусухого переноса. Вестерн-блот гибридизацию проводили согласно методике, описанной в разделе 2.5.8. Для идентификации α -синуклеина с меткой 6xHis были использованы антитела Anti-His (GE Healthcare) в разведении 1:4000 в буфере TTBS с добавлением Blocking Agent (Amersham) до 1% (w/v), в качестве вторичных – антитела к IgG мыши (Amersham) в разведении 1:20000 в буфере TTBS с добавлением Blocking Agent (Amersham) до 0,2% (w/v). Второй гель использовали для окраски Кумасси для контроля нанесения белка.

2.4.5 Секвенирование

Секвенирование плазмид, полученных в ходе работы, проведено на базе ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ. Полученные хроматограммы анализировали при помощи программ Unipro UGENE [331] и Chromas (version 2.6.6 (2018)). Для секвенирования плазмид использовали стандартные праймеры: EGFP-C, BGH Reverse, CMV Forward, T7, T7 Terminal, M13 Fwd(GW) и M13 Rev(GW).

2.4.6 Определение выживаемости клеток с помощью МТТ-теста

96-луночный культуральный планшет засеивали клетками HEK293T в количестве 5000 клеток на лунку в 100 мкл среды и инкубировали при температуре 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Через 24 часа клетки трансфицировали конструкциями, содержащими последовательности, кодирующие белки интереса. В качестве отрицательного контроля служили клетки, трансфицированные вектором рgLAP1, продуцирующие EGFP. Через 24 часа после трансфекции в лунки к клеткам добавляли по 10 мкл раствора МТТ и инкубировали 4 часа, затем к клеткам добавляли 100 мкл раствора для растворения формазана (FineTest) и инкубировали еще 4 часа. Оптическое поглощение измеряли при помощи мультимодального ридера CLARIOstar Plus (BMG LABTECH) в диапазоне от 560 до 600 нм. Для измерения количества выживших клеток значение поглощения в опытных лунках делили на значение в контрольных лунках с нетрансфицированными клетками.

2.5 Биохимические методы

2.5.1 Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле (SDS-PAGE)

Электрофорез проводили по стандартной методике [327,332] при 180V в течение 50-60 минут. В работе использовали 5% (w/v) концентрирующий и 15% (w/v) разделяющий гели. К образцу белка добавляли четырехкратный буфер для нанесения (8% (w/v) SDS, 0,25 М Tris-HCl (pH 6,8), 20% (w/v) глицерин, 8% (w/v)

β -меркаптоэтанол (BME), 0,2% (w/v) бромфеноловый синий) и кипятили 5 минут при 100 °С. Если необходимо было оценить агрегацию белка, пробы готовили в двух повторностях: одну кипятили 5 минут, вторую инкубировали при комнатной температуре.

2.5.2 Окрашивание геля красителем Кумасси

После SDS-PAGE гель промывали водой и затем помещали в раствор Кумасси (0,25% (w/v) Кумасси Brilliant blue, 40% (v/v) этанол, 10% (v/v) уксусная кислота) и кипятили в течение 1 минуты. Излишки красителя отмывали кипячением в воде.

2.5.3 Полусухой перенос белков на мембрану

Для переноса белков на мембрану по методике [333] использовали систему быстрого переноса Trans-Blot Turbo (Bio-Rad), PVDF мембрану Amersham и ватман Whatman International Ltd. Мембрану перед использованием предварительно активировали в метаноле и промывали в буфере для переноса (20% (v/v) метанол, 0,2 М Tris, 25 мМ глицин). На нижний электрод последовательно выкладывали: специальную губку; 1 лист ватмана, соответствующий размерам мембраны и геля, мембрану; гель; 1 лист ватмана и вторую губку. Каждый компонент перед использованием предварительно смачивали в буфере для переноса. Перенос проводили при 25В в течение 30 минут.

2.5.4 Выделение белков из клеток млекопитающих

Клетки HEK293Т через сутки после трансфекции смывали с чашек раствором трипсина-Версена (Биолот). Клетки осаждали центрифугированием при 1200 об/мин в течение 5 минут. К осадку клеток добавляли равный объем RIPA буфера (150 мМ NaCl, 1% (w/v) Triton X-100, 0,5% (w/v) дезоксихолат натрия, 0,1% (w/v) SDS, 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 2 мМ PMSF, 10 мг/мл лейпептина, 20% (v/v) ингибиторов протеаз (Sigma P8340-5ML)). Клетки

инкубировали в буфере в течение 30 минут во льду. Затем раствор обрабатывали ультразвуком (10 секунд при мощности 50% ультразвукового гомогенизатора Bandelin SONOPULS HD 2070). Клеточный дебрис собирали центрифугированием на скорости 2000 об/мин при 4 °С в течение 10 минут. Супернатант использовали для приготовления проб для SDD-AGE.

2.5.5 Выделение белков из клеток дрожжей

Клетки дрожжей *S. cerevisiae* культивировали на селективной среде до OD(600 нм) = 0,4 и собирали центрифугированием на скорости 5000 об/мин. Экстракцию белков проводили в соответствии с опубликованным протоколом [33], за исключением модифицированного лизирующего буфера (100 мМ Tris-HCl (pH 7,6), 2 мМ PMSF, 10 мМ BME, 4% (v/v) ингибиторов протеаз (Sigma, P8215)). Полученный белковый лизат использовали для полуденатурирующего электрофореза в агарозном геле (SDD-AGE).

2.5.6 Полуденатурирующий электрофорез в агарозном геле (SDD-AGE)

Для электрофореза готовили 1,5% (w/v) агарозный гель в однократном TAE (40мМ Tris, 20 мМ уксусная кислота, pH 8.3, 1 мМ EDTA) буфере с добавлением 0,1% (w/v) SDS. Гель заливали на подложку и давали застыть. Камеру для электрофореза устанавливали во льду. Электрофорез проводили 4 часа при напряжении 30 В. Для оценки агрегации готовили две пробы. К образцам добавляли четырехкратный буфер для нанесения (8% (w/v) SDS, 2X TAE, 20% (w/v) глицерин, 0,2% (w/v) бромфеноловый синий). К одной пробе добавляли BME до 2% (v/v), к другой – воду. Пробы инкубировали 5 минут при комнатной температуре [334].

2.5.7 Капиллярный перенос

Для переноса использовали PVDF мембрану Amersham и ватман Whatman International Ltd. Система состояла из следующих компонентов, соответствующих размеру геля: стопка фильтровальной бумаги высотой 2–3 см; три сухих листа

ватмана; два листа ватмана, смоченные в буфере TBS (30 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl). Сверху размещали мембрану, гель и два листа ватмана, смоченных в TBS. Систему сверху накрывали “фитилём” – полоской ватмана, шириной равной ширине геля – и опускали его концами в кюветы с TBS, находящимися выше системы. Перед использованием мембрану предварительно активировали в метаноле и промывали в буфере TBS. На верх системы помещали груз и инкубировали при 4 °C в течение ночи.

2.5.8 Вестерн-блот гибридизация

Вестерн-блот гибридизацию проводили согласно описанной методике [335]. Мембрану после переноса инкубировали при перемешивании в буфере TTBS (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween-20) с добавлением Blocking Agent (Amersham) до 1% (w/v) в течение 15 минут. Затем мембрану инкубировали с первичными антителами 1 час и после этого отмывали буфером TTBS три раза по 15 минут. Для детекции белков с меткой EGFP в качестве первичных антител использовали Anti-Tag(CGYP)FP (Евроген) в разведении 1:4000 в буфере TTBS с добавлением Blocking Agent (Amersham) до 1% (w/v), в качестве вторичных – антитела к IgG кролика (Cytiva) в разведении 1:20000 в буфере TTBS с добавлением Blocking Agent (Amersham) до 0,2% (w/v). Для детекции белков с меткой 6xHis в качестве первичных антител использовали Anti-His (GE Healthcare) в разведении 1:4000 в буфере TTBS с добавлением Blocking Agent (Amersham) до 1% (w/v), в качестве вторичных – антитела к IgG мыши (Amersham) в разведении 1:20000 в буфере TTBS с добавлением Blocking Agent (Amersham) до 0,2% (w/v). После отмывки мембрану инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена в течение 1 часа. Далее мембрану снова отмывали буфером TTBS три раза по 15 минут. Затем мембрану обрабатывали смесью реагентов (раствором люминола и раствором перекиси водорода в соотношении 1:1) (Amersha ECL Select Western Blotting Detection Reagent). Детекцию хемилюминесценции проводили на приборе GeneGnome (SynGene).

2.6 Выделение и очистка рекомбинантных белков из культур *E. coli*

2.6.1 Выделение и очистка нативного α -синуклеина

Для наработки препаративного количества белка ночную культуру бактериального штамма *E. coli* NiCo21(DE3), трансформированного плазмидой pDest527-nSNCA, разводили в 100 раз и культивировали примерно два часа при температуре 37 °С. По достижении OD(600 нм) = 0,3 осуществляли индукцию добавлением IPTG до концентрации 1 мМ и растили клетки в течение 5 часов.

Выделение и очистку препаративных количеств белка α -синуклеина из бактериального штаммов проводили на основании ранее опубликованного протокола [336]. Осадок клеток с 1 л культуры ресуспендировали в 100 мл буфера для осмотического шока (30 мМ Tris-HCl (pH 7,2), 40% (w/v) сахарозы, 2 мМ ЭДТА) и инкубировали 10 минут при комнатной температуре и перемешивании. Супернатант, содержащий периплазматический белок, собирали центрифугированием при 13500 g в течение 20 минут при 4 °С и диализировали в специальных кассетах (Thermo Scientific) против буфер А (20 мМ Tris-HCl (pH 8,0)) в соотношении 1:50 в течение ночи. Осадок, оставшийся после центрифугирования, сохраняли при 4 °С для контроля выделения белка.

Надосадочную фракцию, содержащую периплазматический белок в буфере А, наносили на колонку HiTrap Q HP (5 мл) (GE Healthcare), уравновешенную буфером А, и элюировали градиентом NaCl 0–1 М в буфере А с помощью прибора NGC (Bio-Rad). Скорость потока на всех стадиях составляла 5 мл/мин. Элюированные фракции собирали на коллекторе фракций BioFrac (Bio-Rad) и анализировали при помощи SDS-PAGE с использованием 15% (w/v) разделяющего полиакриламидного геля. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и концентрировали при помощи центрифужного концентратора Amicon Ultra-15 с диаметром пор 3 кДа (Merck).

Дополнительную очистку α -синуклеина осуществляли методом гель-фильтрации на колонке HiLoad 16/600 Superdex 75 pg (GE Healthcare) с помощью прибора NGC (Bio-Rad). Сконцентрированный белок в буфере А в объеме 0,5 мл

наносили на колонку при скорости потока 0,5 мл/мин и элюировали 1,5 объемами колонки этим же буфером при скорости потока 0,5 мл/мин. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и концентрировали при помощи центрифужного концентратора Amicon Ultra-15 с диаметром пор 3 кДа (Merck), а затем хранили при -80 °С.

2.6.2 Выделение и очистка фрагментов NOS1AP

Для наработки препаративного количества белка ночную культуру бактериального штамма *E. coli* T7, трансформированного плазмидами pDest527-NOS1AP(292-390) и pDest527-NOS1AP(391-506), разводили в 100 раз и культивировали примерно два часа при температуре 37 °С. По достижении OD(600 нм) = 0,5 осуществляли индукцию добавлением IPTG до концентрации 1 мМ и культивировали клетки при 26 °С в течение 5 часов.

Клетки *E.coli* после осаждения ресуспендировали в лизирующем буфере (85 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 8 М мочевины) в соотношении 10 мл на 1 г клеток и инкубировали при 26 °С в течение 40–50 минут. Суспензию обрабатывали ультразвуком (3 цикла по 10 секунд при мощности 50% ультразвукового гомогенизатора Bandelin SONOPULS HD 2070). Клеточный дебрис собирали центрифугированием на скорости 30000 об/мин при 10 °С в течение 20 минут. Супернатант с добавлением имидазола до концентрации 5 мМ наносили на колонку HisTrap HP (5 мл) (GE Healthcare), уравновешенную промывочным буфером (85 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 8 М мочевины, 5 мМ имидазола). Для удаления неспецифически связавшихся с колонкой белков после нанесения супернатанта ее промывали тем же буфером с добавлением имидазола до 20 мМ. Белки NOS1AP(292-390) и NOS1AP(391-506) элюировали градиентом имидазола 20–400 мМ. Элюированные фракции собирали на коллекторе фракций BioFrac (Bio-Rad) и анализировали при помощи SDS-PAGE с использованием 15% (w/v) разделяющего полиакриламидного геля. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и концентрировали при помощи центрифужного концентратора Amicon Ultra-15 с диаметром пор 3 кДа (Merck). Дополнительно белок

концентрировали при помощи центрифужного концентратора Amicon Ultra-0,5 с диаметром пор 3 кДа (Merck).

2.7 Анализ агрегации исследуемых белков

2.7.1 Агрегация α -синуклеина в условиях *in vitro*

Мономеры α -синуклеина в концентрации 5 мг/мл в стерильном буфере PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄ (pH 7,4)) инкубировали при 37 °C и переворачивании «через голову» на ротаторе (BioSan). Перед началом инкубации отбирали пробу мономерного белка и сохраняли ее. Затем отбирали пробу через две недели инкубации. Пробы окрашивали с помощью тиофлавина Т и сравнивали интенсивность его флуоресценции.

2.7.2 Агрегация фрагмента NOS1AP(292-390) в условиях *in vitro*

Для исследования возможности амилоидогенного фрагмента NOS1AP(292-390) образовывать агрегаты *in vitro* очищенный белок растворяли в буфере PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄ (pH 7,4)) до концентрации 1 мг/мл и инкубировали при 37 °C на ротаторе при перемешивании «через голову» на ротаторе (BioSan). Через 7 дней к образцу белка добавляли тиофлавин Т и измеряли интенсивность его флуоресценции.

2.7.3 Окрашивание белка тиофлавином Т

К раствору белка в PBS добавляли тиофлавин Т (ThT) до концентрации 40 мкМ, перемешивали, затем 150 мкл пробы наносили в планшет (Corning 3603) с черными стенками. Флуоресценцию ThT возбуждали излучением с длиной волны 450±16 нм и регистрировали в диапазоне длин волн от 478±10 до 600±10 нм измеряли при помощи мультимодального ридера CLARIOstar Plus (BMG LABTECH).

2.7.4 Анализ кинетики агрегации белков

Для проведения реакции использовали 96-луночные планшеты с прозрачным дном и черным цветом стенок лунок (Corning 3603). В планшете лунки по периферии заполняли 150 мкл воды. Также заполняли все межлуночные пространства 100 мкл воды. В лунки добавляли мономеры исследуемого белка до концентрации 1,5 мг/мл, тиофлавин Т до концентрации 40 мкМ, азид натрия для предотвращения контаминации до концентрации 0,05% (w/v). Мономеры α -синуклеина предварительно центрифугировали в течение 30 минут при 4 °С и ускорении 21130 g. Для исследования эффекта затравки на ускорение фибриллогенеза при отработке метода анализа кинетики агрегации добавляли предварительно обработанные ультразвуком (10 секунд при мощности 50% ультразвукового гомогенизатора Bandelin SONOPULS HD 2070) агрегаты α -синуклеина. В других случаях фибриллы предварительно ультразвуком не обрабатывали. В каждую лунку помещали стеклянный шарик диаметром около 3 мм для равномерного перемешивания реакционной смеси. В лунки добавляли буфер PBS до 150 мкл. Планшет закрывали крышкой и шов заклеивали лентой Parafilm. Детекцию агрегации осуществляли при 37 °С при помощи мультимодального ридера CLARIOstar Plus (BMG LABTECH). Флуоресценцию ThT возбуждали излучением с длиной волны 448 ± 10 нм и регистрировали при длине волны 483 ± 10 нм. Длительность одного цикла измерений составляла 15 минут, перед каждым измерением осуществлялось орбитальное перемешивание со скоростью 400 об/мин в течение 30 секунд.

В ходе последующего анализа результатов для каждой реакции значения флуоресценции нормализовали, принимая за ноль минимальные значения в каждой повторности, а за единицу – медиану флуоресценции на стадии «плато», когда процесс агрегации заканчивался. Затем для каждой реакции мы подбирали параметры следующей модели (Рисунок 9) [337]:

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{(x - x_0)}{dx}}}, \quad (1)$$

где A_1 и A_2 начальный и финальный уровни флуоресценции, x_0 — время полуреакции, dx — величина обратная скорости агрегации. С учетом подобранных параметров мы также рассчитывали время lag-фазы реакции: $\text{lag} = x_0 - 2dx$.

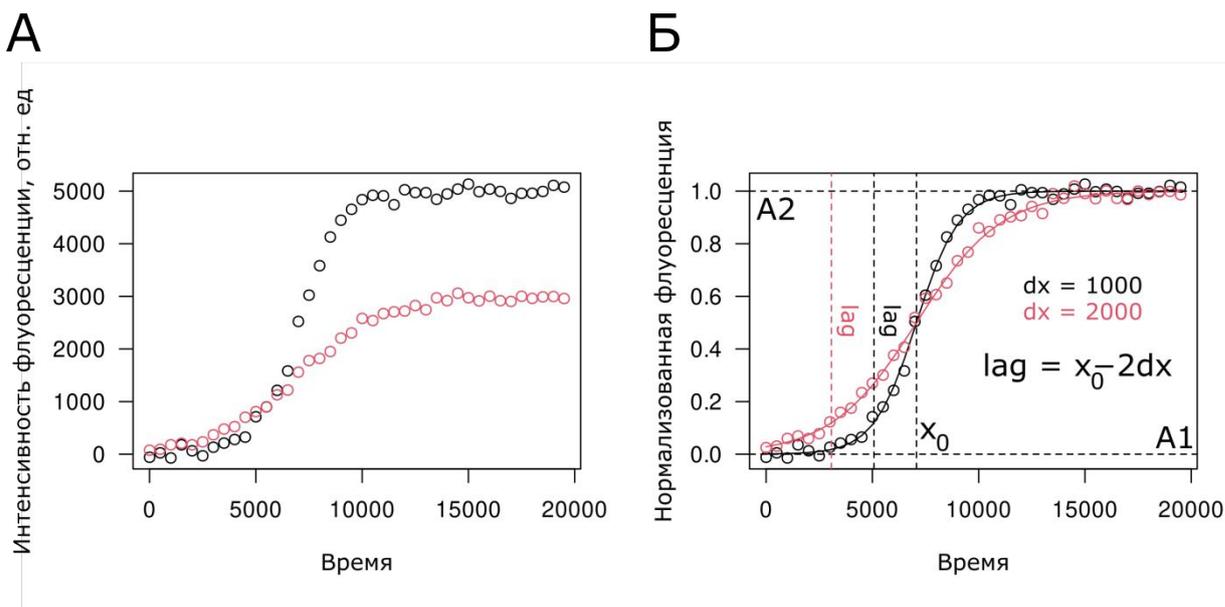


Рисунок 9. Схематичное отображение параметров модели кинетики агрегации α -синуклеина. А – кривая роста флуоресценции тиофлавина Т в двух образцах, построенная по исходным значениям. Б – кривая роста флуоресценции тиофлавина Т в двух образцах, построенная по нормализованным значениям. Указаны основные параметры модели кинетики агрегации. A_1 и A_2 — начальный и финальный уровни флуоресценции, x_0 — время, когда флуоресценция достигает половины от A_2 , dx — величина обратная скорости агрегации. Время lag-фазы реакции вычисляется как $\text{lag} = x_0 - 2dx$.

2.7.5 Измерение концентрации белков

Концентрацию белка измеряли по поглощению при 280 нм с поправкой на рассеяние раствора. При расчетах концентрации α -синуклеина использовали значение коэффициента молярной экстинкции, равное $5120 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Спектры поглощения снимали с помощью мультимодального ридера CLARIOstar Plus (BMG LABTECH) в планшете LVis (BMG LABTECH).

2.8 Статистическая обработка

Всю статистическую обработку, а также построение графиков, осуществляли с помощью пакета R v. 4.0.2 (2020-06-22) (The R Foundation for Statistical Computing). Для визуализации данных использовали пакет «ggplot2» [338]. Сравнение количественных показателей проводили с использованием критерия Вилкоксона-Манна-Уитни [339].

2.9 Микроскопия

2.9.1 Флуоресцентная микроскопия

Культуры клеток НЕК293Т анализировали в культуральном 24-луночном планшете через 24 часа после трансфекции с помощью инвертированного микроскопа Leica DMI6000 на базе ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

Для анализа клеток дрожжей *S. cerevisiae* трансформантов засеивали в селективную среду и культивировали до достижения $OD(600 \text{ нм}) = 0,5 - 0,6$. Далее 1 мл клеток собирали центрифугированием при 5000 g в течение 1 минуты, промывали водой и собирали при тех же условиях. Осадок ресуспендировали в 20 мкл воды. Суспензию клеток наносили на предметное стекло и накрывали покровным. Препараты анализировали на флуоресцентном микроскопе Axio Scope.A1 с камерой AxioCam 506 color (Zeiss).

2.9.2 Просвечивающая электронная микроскопия

Стандартные медные сеточки (100 или 200 межей) покрывали формваровой пленкой (0,3% (w/v) раствор поливинилформаль в хлороформе). Затем на сеточки наносили 10 мкл исследуемого раствора и инкубировали 30 секунд, жидкость убирали фильтровальной бумагой. Для того, чтобы убрать излишки буфера на сеточку наносили 10 мкл воды, которую затем убирали фильтровальной бумагой. В конце наносили 10 мкл 1% (w/v) раствора уранил ацетата, инкубировали 30 секунд, остатки жидкости убирали. После препарат дополнительно промывали

нанесением 10 мкл воды [340]. Препараты анализировали на электронном микроскопе Jeol JEM-1400 на базе ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ. Измерение длины фибрилл осуществляли с помощью программного обеспечения ImageJ [341].

2.9.3 Поляризационная микроскопия

Бактериальную колонию клеток, выросших на среде с Конго красным, ресуспендировали в 10 мкл воды, наносили на предметное стекло и накрывали покровным стеклом. Образец исследовали в проходящем и поляризованном свете на инвертированном флуоресцентном микроскопе Leica DMI6000 (Ресурсный центр СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий»).

2.10 Поиск потенциально амилоидогенных участков NOS1AP

Для определения амилоидогенного участка в белке NOS1AP мы воспользовались программой ArchCandy [10]. Выбор программы был основан на серии статей, в которых была продемонстрирована её высокая точность по сравнению с аналогами [10,342,343]. С помощью ArchCandy мы провели поиск потенциальных β -арок в белке NOS1AP (пороговое значение 0,575, без дополнительных встроенных фильтров). Согласно оригинальной статье [10], наличие хотя бы одной такой структуры свидетельствует о способности белка формировать амилоидные агрегаты. Мы также проанализировали аминокислотную последовательность белка NOS1AP на наличие потенциальных амилоидогенных участков с помощью других алгоритмов, таких как Waltz [268], AGGRESCAN [264] и FoldAmyloid [266].

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Биоинформатический поиск участка NOS1AP, отвечающего за агрегацию

Белок NOS1AP был предсказан как потенциальный амилоид с помощью программы ArchCandy [10]. Мы провели биоинформатический анализ с целью идентификации участка NOS1AP, вносящего вклад в агрегацию белка. В результате такого анализа все использованные нами инструменты предсказали амилоидогенный фрагмент в N-концевой части белка в позициях 1–291. Центральная область (аминокислотные позиции 292–390) NOS1AP и его C-концевая часть (позиции 391–506) являются амилоидогенными, согласно Waltz и FoldAmyloid (Рисунок 10). По результатам проведённого анализа мы выдвинули предположение, что фрагмент NOS1AP с 292 по 390 аминокислоту является амилоидогенным. Для гена *NOS1AP* экспериментально показано существование двух транскриптов, один из которых соответствует полноразмерному белку, а второй – его C-концевому участку (начиная с 295 аминокислоты), который захватывает амилоидогенный фрагмент белка (см. обзоры [277,278]).

Для дальнейшего анализа мы выбрали три участка NOS1AP: 1–291, 292–390 и 391–506. Выбор именно этих участков в первую очередь был основан на результатах программы ArchCandy. Для дальнейшей работы были получены плазмиды серии pDONR221, кодирующие последовательности этих фрагментов. Эти конструкции в дальнейшем были использованы для получения экспрессионных векторов для различных модельных систем. Все плазмиды были проверены с помощью рестрикционного анализа, а также методом ПЦР. Сводный перечень плазмид, использованных в работе, представлен в таблице 1.

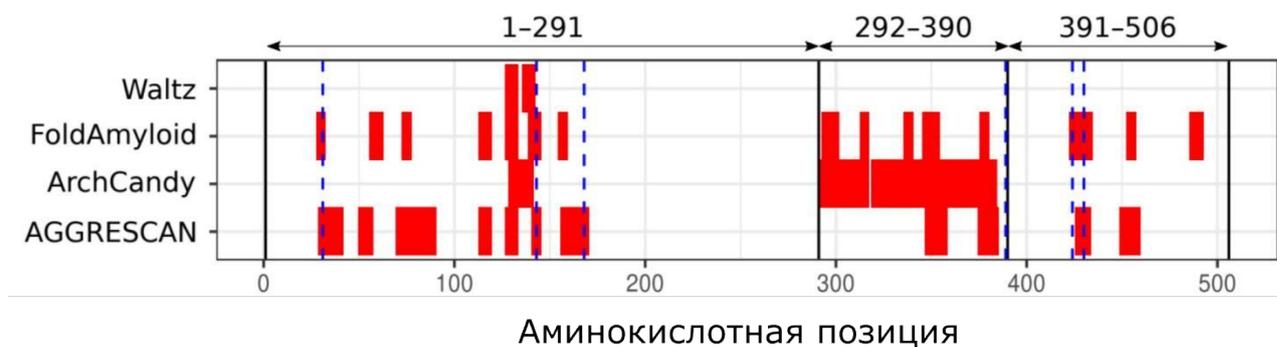


Рисунок 10. Потенциально амилоидогенные фрагменты белка NOS1AP. Красные прямоугольники соответствуют потенциально амилоидогенным участкам, предсказанным с помощью разных биоинформатических алгоритмов, указанных слева от графика. Вертикальными черными линиями отмечены три области, соответствующие фрагментам, проанализированным в работе. Синие пунктирные линии обозначают положения цистеинов.

3.2 Образование агрегатов белка NOS1AP и его фрагментов в разных модельных системах

В работе мы использовали три модельные системы для изучения агрегации NOS1AP: бактерии *E. coli* (методика C-DAG), клетки дрожжей *S. cerevisiae*, а также культуры клеток человека.

3.2.1 Исследование амилоидных свойств NOS1AP и его фрагментов в системе C-DAG

Система C-DAG позволяет проводить экспресс-проверку амилоидных свойств белков *in vivo* в клетках бактерий. С её помощью возможно детектировать образование амилоидных агрегатов с характерной фибриллярной морфологией на поверхности клеток, а также оценить их способность связывать амилоид-специфичный краситель Конго красный. Однако методу присущи и недостатки. Так, в этой системе трудно исследовать крупные белки, экспорт которых наружу бактериальной клетки может быть затруднен [36,323]. Еще одной проблемой может стать токсический эффект чужеродного белка на клетки *E. coli*. И наконец, укладка белка может протекать иным образом по сравнению с организмом, который продуцирует этот белок в естественных условиях [344].

В плаزمидах серии pVSGW, которые используются в системе C-DAG, исследуемый белок слит с последовательностью, кодирующей сигнальный пептид белка CsgA (CsgAss). Это пептид необходим для экспорта белка на поверхность клеток. Продукция химерного белка находится под контролем промотора, индуцируемого арабинозой. Плазмида pVSGW была ранее получена в нашей лаборатории и является модификацией оригинальных конструкций pVS105 и pVS72 [36]. Для последующих проверок в системе C-DAG мы использовали оригинальный бактериальный штамм *E. coli* VS39 [36], который трансформировали полученными векторами. Эти клетки также содержат вспомогательную плазмиду для сверхпродукции белков, отвечающих за экспорт CsgA на поверхность клеток. Соответствующая конструкция находится под контролем лактозного промотора, индуцируемого изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидом (IPTG). Трансформантов культивировали в жидкой среде согласно опубликованному протоколу и высевали на следующий набор сред: селективную среду для сохранения плазмиды, среду с арабинозой и IPTG для сверхпродукции исследуемых белков, а также её производную с добавлением красителя Конго красный. Клетки, несущие на поверхности амилоидные агрегаты, окрашиваются в красный цвет в результате связывания амилоидов с Конго красным. Эксперимент в каждом случае был проведён для шести независимых трансформантов. Полученные результаты позволяют предположить, что ни NOS1AP, ни его укороченные варианты не формируют амилоидных агрегатов на поверхности клеток бактерий. Цвет исследуемых колоний не отличался от отрицательного контроля (Sup35M). Клетки, сверхпродуцирующие Sup35NM (положительный контроль), окрашиваются Конго красным в тех же условиях (Рисунок 11).

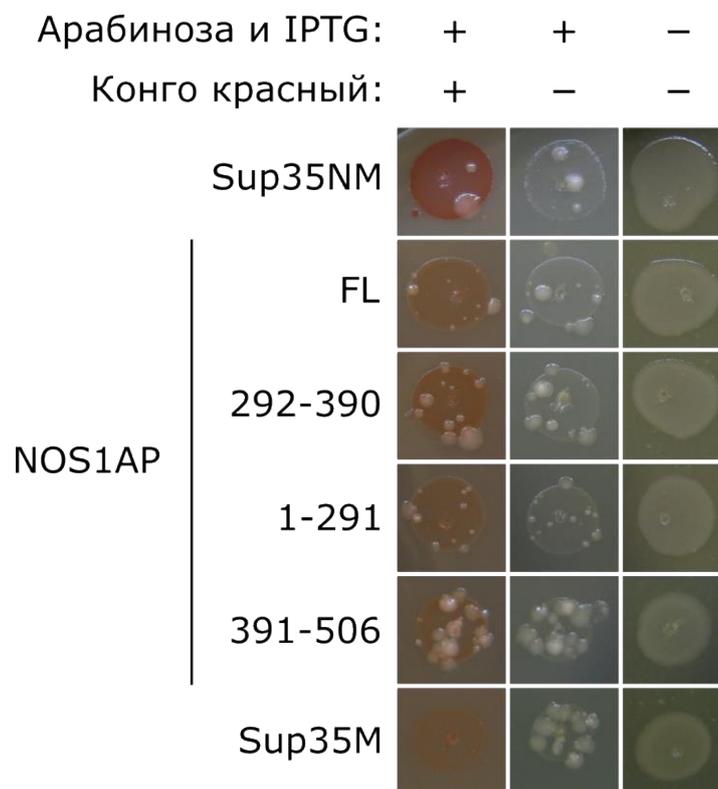


Рисунок 11. NOS1AP и его фрагменты не связывают Конго красный в бактериальной системе C-DAG. Представлены фотографии бактерий на различных средах на третий день роста при 37 °C. FL – полноразмерный белок NOS1AP, цифрами указаны границы фрагментов NOS1AP, взятых в анализ. Sup35NM и Sup35M были использованы в качестве положительного и отрицательного контроля, соответственно [36]. На фоне крупных колоний видны более мелкие белые колонии – колонии вторичного роста.

Одним из ключевых свойств амилоидных агрегатов является их взаимодействие с амилоид-специфическим красителем Конго красным с последующим яблочно-зеленым двулучепреломлением в поляризованном свете [29]. При исследовании колоний бактерий, выросших на среде с этим красителем, клетки бактерий, продуцирующих NOS1AP или его фрагменты, не продемонстрировали подобных свойств (Рисунок 12). Из-за полученных отрицательных результатов дальнейшие проверки в этой бактериальной системе были признаны нецелесообразными. Эксперимент был проведен в трех повторностях.

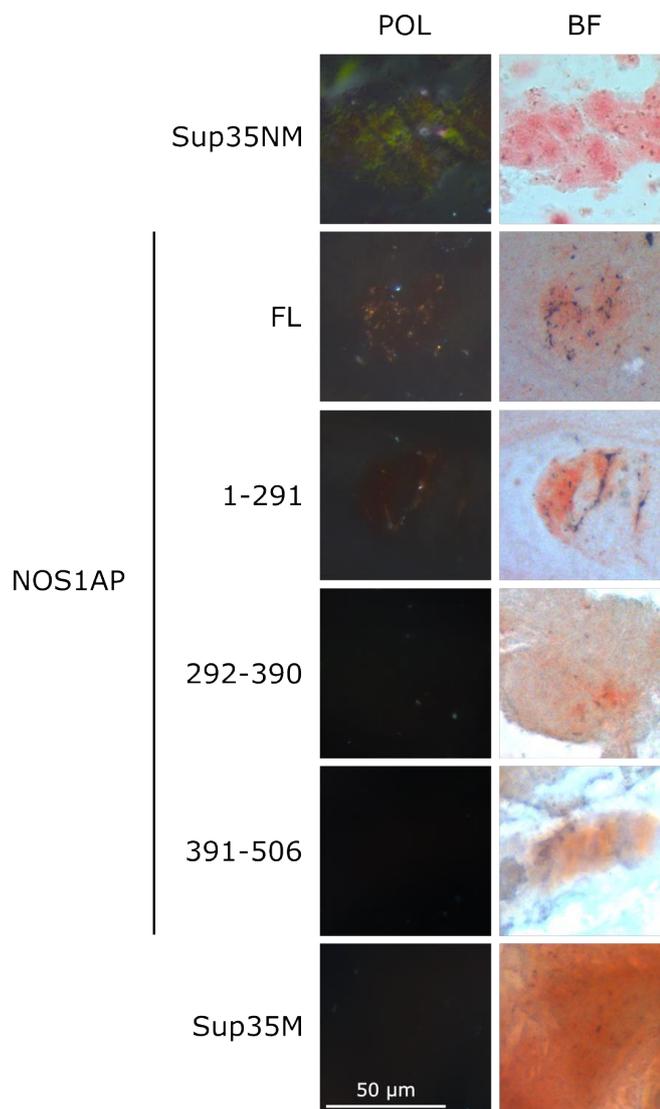


Рисунок 12. NOS1AP и его фрагменты не демонстрируют желто-зеленое свечение при двойном лучепреломлении в поляризованном свете. BF – проходящий свет; POL – поляризованный свет; FL – полноразмерный белок NOS1AP, цифрами указаны границы фрагментов NOS1AP, взятых в анализ.

3.2.2 Изучение агрегации белка NOS1AP и его фрагментов в клетках дрожжей *S. cerevisiae*

Дрожжи *S. cerevisiae* являются одной из наиболее популярных эукариотических моделей для исследований агрегации белков [9,345–347]. Именно поэтому мы использовали эту модельную систему в своей работе. Для исследования агрегации NOS1AP в клетках дрожжей мы получили набор векторов на основе pAG416-EGFP-ccdB, в котором продукция химерных белков

(NOS1AP, либо его фрагментов, слитых с EGFP) находится под контролем конститутивного дрожжевого промотора гена *GAPDH* (Таблица 1). Локализацию исследуемых белков в клетках мы проанализировали с помощью флуоресцентной микроскопии.

Согласно полученным результатам, NOS1AP и NOS1AP(1-291) образуют агрегаты в штамме дрожжей 2-74-D694 (Рисунок 13). В тоже время фрагмент NOS1AP(292-390), который является амилоидогенным, согласно ArchCandy (Рисунок 1), не образует скоплений в этих клетках (Рисунок 13). Нами было сделано наблюдение, что сверхпродукция фрагмента NOS1AP(391-506), который формирует аморфные скопления в клетках, приводит к увеличению размера клеток. Можно предположить, что С-концевой PDZ-связывающий домен, присутствующий в этом фрагменте, взаимодействует с белками с доменом PDZ. Белки с таким доменом находят у разных организмов, в том числе и у дрожжей *S. cerevisiae* [348]. Известно, что эта часть белка содержит мотивы, необходимые для взаимодействия NOS1AP с nNOS в клетках человека. Вероятно, эти последовательности могут взаимодействовать с некоторым дрожжевыми белками, что и лежит в основе наблюдаемого фенотипа.

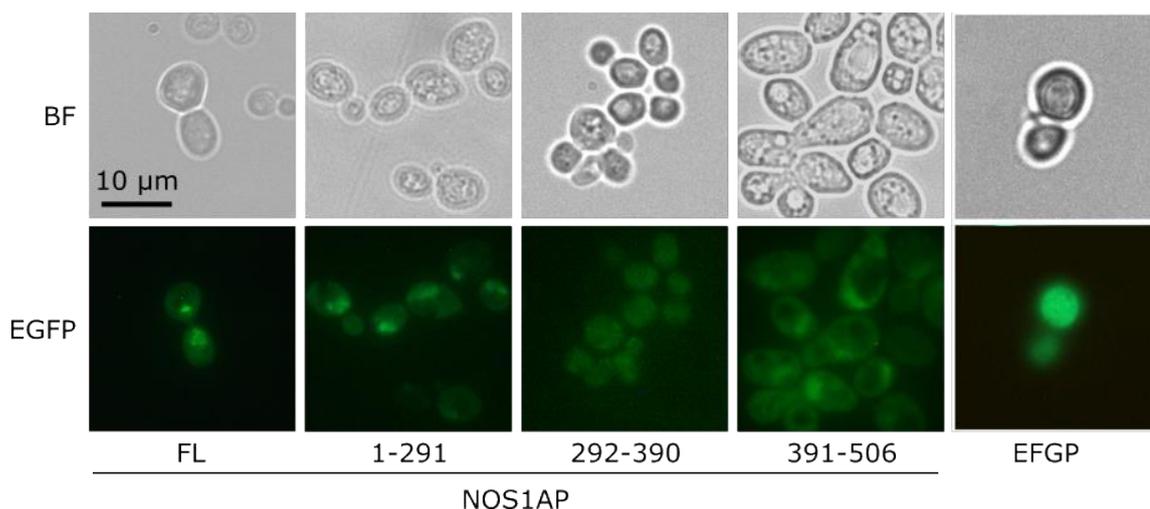


Рисунок 13. Белок NOS1AP и фрагмент NOS1AP(1-291) образуют агрегаты в клетках дрожжей. Представлены микрофотографии клеток дрожжей штамма [*pin*⁻] 2-74-D694, сверхпродуцирующие полноразмерный белок NOS1AP (FL), либо его фрагменты (цифрами указаны границы фрагментов NOS1AP). BF – проходящий свет; EGFP – флуоресцентный сигнал EGFP. Эксперимент был проведен в трех повторностях, проанализировано не менее 40 полей зрения.

Конструкциями, кодирующими NOS1AP(1-291) и NOS1AP(391-506), мы трансформировали штамм 74-D694 (Рисунок 14). Одной из особенностей этого штамма является наличие приона [PIN^+] (агрегатов белка Rnq1). Ранее было показано, что присутствие фактора [PIN^+] может способствовать агрегации некоторых белков в клетках дрожжей [349]. Мы также использовали изогенный штамм 2-74-D694, в котором отсутствует фактор [PIN^+] (Рисунок 14).

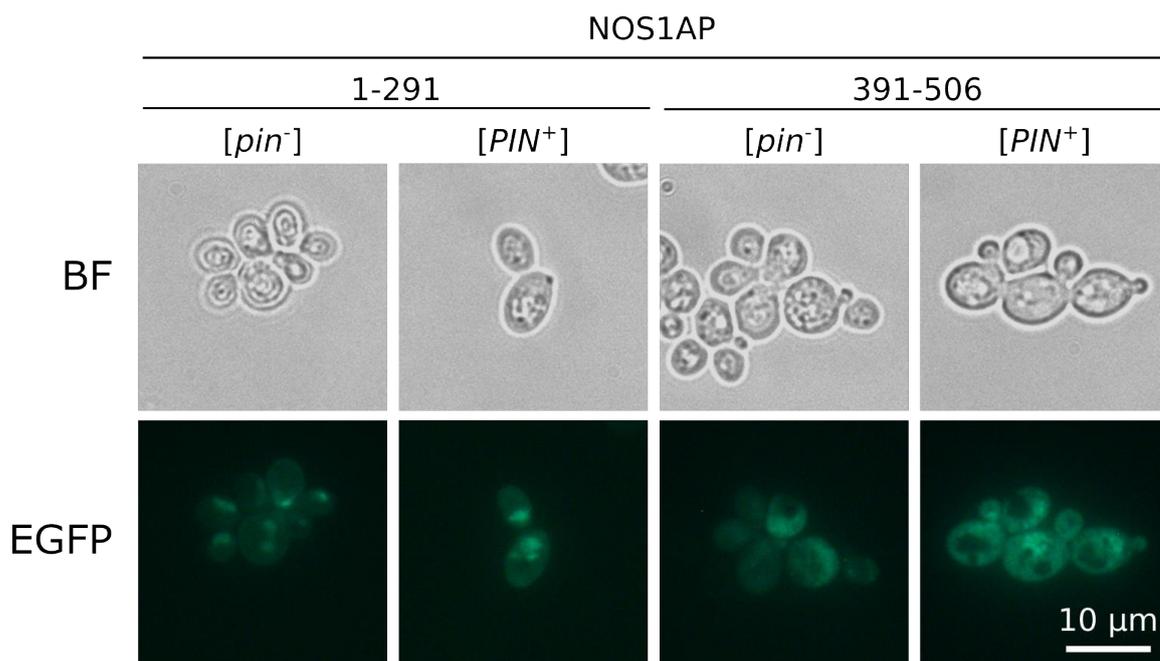


Рисунок 14. Прион [PIN^+] не влияет на агрегацию фрагментов 1-291 и 391-506 белка NOS1AP в клетках дрожжей. Представлены фотографии клеток штаммов 2-74-D694 ($[pin^-]$) и 74-D694 ($[PIN^+]$), трансформированных плазмидами серии rAG416-EGFP, в проходящем свете (BF) и флуоресценции EGFP (EGFP). Цифрами указаны границы фрагментов NOS1AP, взятых в анализ.

Присутствие агрегатов Rnq1 в клетках дрожжей по нашим данным не влияет на агрегацию NOS1AP. На рисунке 14 для сравнения представлена локализация фрагментов NOS1AP(1-291) и NOS1AP(391-506) в клетках с прионом и без приона [PIN^+]. Эксперимент был проведен в трех повторностях, проанализировано не менее 40 полей зрения для каждой конструкции.

3.2.3 Изучение агрегации NOS1AP и его фрагментов в культуре клеток млекопитающих

Бактериальные и дрожжевые системы удобны для исследования амилоидных свойств белков. Но при работе с человеческими белками это не позволяет оценить процессы, происходящие в организме человека. Удобным объектом для работы в этом случае являются культуры клеток человека. Линия НЕК293Т относительно проста в культивировании и при осуществлении трансфекции, поэтому она была использована в работе в первую очередь.

Клетки млекопитающих НЕК293Т были трансфицированы плазмидами на основе вектора рgLAP1. Этот вектор позволяет получить конструкцию, кодирующую белок интереса, слитый с флуоресцентным белком EGFP, а сама конструкция находится под контролем сильного конститутивного промотора CMV. Флуоресценцию EGFP детектировали на микроскопе через 24 часа после трансфекции (Рисунок 15).

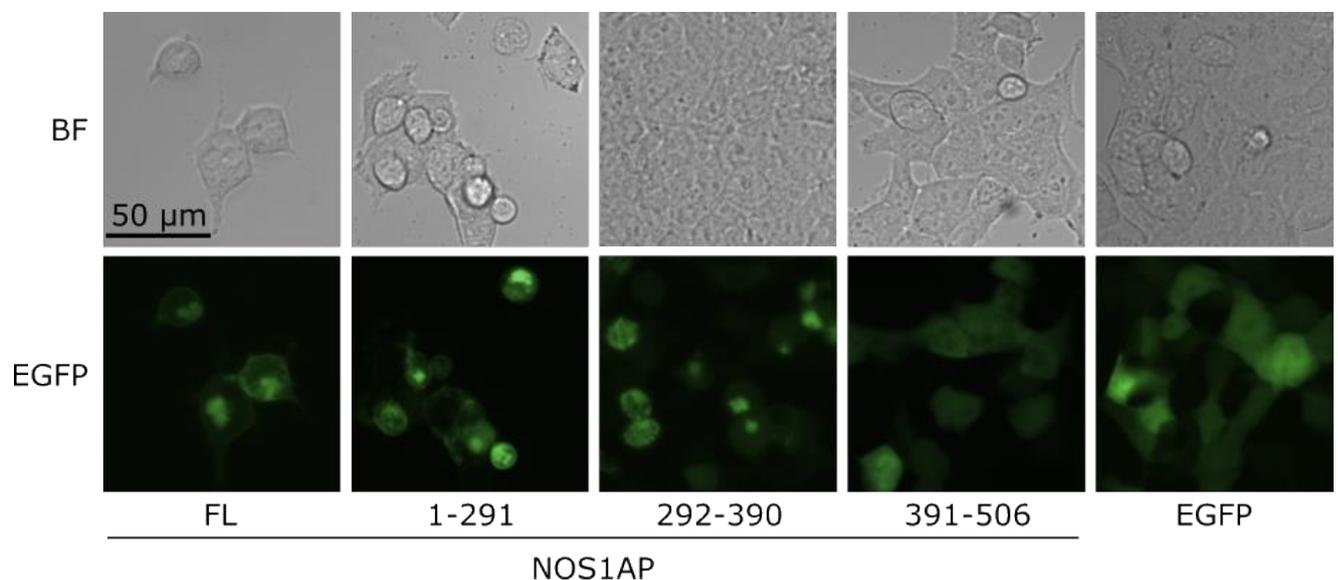


Рисунок 15. Белок NOS1AP, а также фрагменты NOS1AP(1-291) и NOS1AP(292-390) агрегируют в культуре клеток НЕК293Т. Представлены фотографии в проходящем свете (BF) и флуоресценции EGFP (EGFP). FL – полноразмерный белок NOS1AP, цифрами указаны границы фрагментов NOS1AP, взятых в анализ. Конструкция с EGFP была использована в качестве отрицательного контроля.

Сверхпродукция NOS1AP, а также фрагментов NOS1AP(1-291) и NOS1AP(292-390), приводит к их агрегации в клетках. В то же время локализация фрагмента NOS1AP(391-506) в клетке неотличима от EGFP, и, судя по данным микроскопии, он не агрегирует. Стоит отметить, что при сверхпродукции белков NOS1AP, NOS1AP(1-291) и NOS1AP(292-390) клетки становились более округлыми, что может говорить о токсическом эффекте. Более детально это наблюдение описано и проанализировано в разделе 3.2.5. Эксперимент был проведен в трех повторностях, проанализировано не менее 50 полей зрения.

При более детальном рассмотрении можно отметить различающийся характер свечения скоплений исследуемых белков (Рисунок 16), что может говорить о разной морфологии агрегатов.

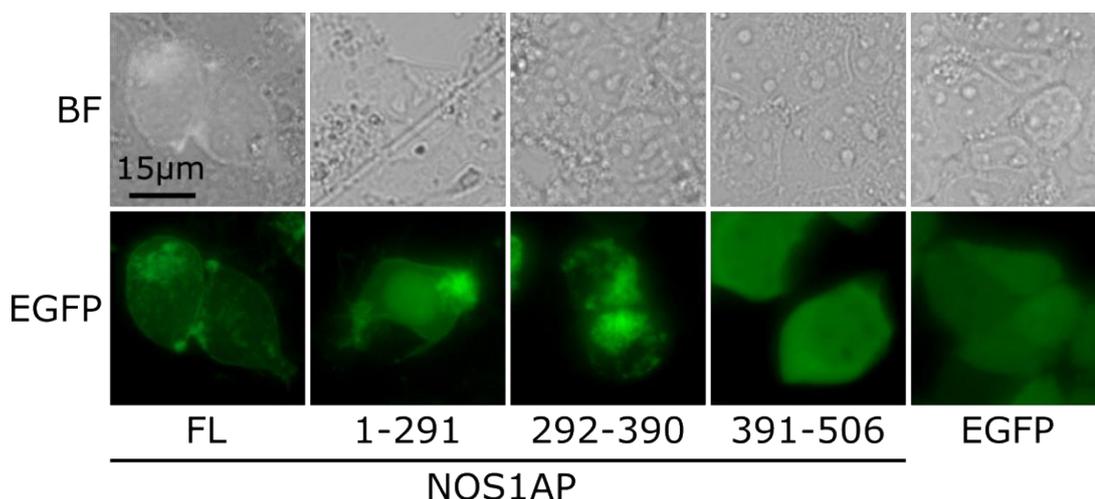


Рисунок 16. Отличающийся характер свечения агрегатов исследуемых белков. Представлены фотографии в проходящем свете (BF) и флуоресценции EGFP (EGFP). FL – полноразмерный белок NOS1AP, цифрами указаны границы фрагментов NOS1AP, взятых в анализ. Конструкция с EGFP была использована в качестве отрицательного контроля.

Аналогичные результаты были получены для полноразмерного белка NOS1AP и его фрагмента NOS1AP(292-390) в клетках IMR-32 (Рисунок 17), однако из-за низкой эффективности трансфекции этой линии дальнейшие эксперименты с ней не проводились.

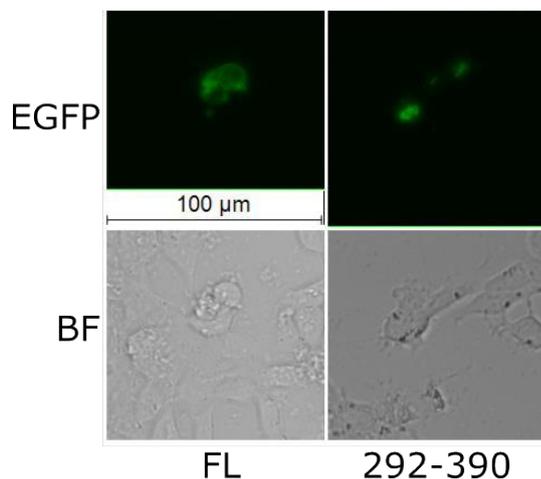


Рисунок 17. Белок NOS1AP и его фрагмент NOS1AP(292-390) агрегируют в культуре клеток IMR-32. Представлены фотографии в проходящем свете (BF) и флуоресценции EGFP (EGFP). FL – полноразмерный белок NOS1AP, цифрами указаны границы фрагмента NOS1AP(292-390).

3.2.4 Изучение устойчивости агрегатов NOS1AP и его фрагментов к действию детергентов

Наличие скоплений белка, которые наблюдают при флуоресцентной микроскопии, не говорит однозначно о том, что исследуемый белок образует агрегаты. Для решения этой проблемы можно использовать метод SDD-AGE [334], который позволяет детектировать агрегаты, а также исследовать их устойчивость к детергентам. β -меркаптоэтанол (BME) восстанавливает дисульфидные связи, что может приводить к разрушению третичной и четвертичной структуры белков. В связи с этим BME возможно использовать для перевода белка из олигомерного в мономерное состояние. Однако BME не может служить универсальным агентом, а оказывает свое действие лишь в случае наличия дисульфидных связей в белке. Сравнение размера белковых агрегатов в пробах с добавлением BME и без обработки BME позволяет делать заключение об участии дисульфидных связей в стабилизации этих комплексов.

С помощью метода SDD-AGE мы обнаружили высокомолекулярные агрегаты NOS1AP и его фрагментов 1–291 и 292–390 в клетках HEK293T, устойчивые к SDS. Судя по всему, эти комплексы стабилизированы

дисульфидными связями, т.к. добавление ВМЕ приводило к растворению этих комплексов (Рисунок 18). Мы также обнаружили небольшие агрегаты NOS1AP(391–506), которые не были идентифицированы с помощью флуоресцентной микроскопии. NOS1AP в клетках дрожжей присутствует в виде димеров и небольших олигомеров, устойчивых к обработке SDS (Рисунок 18). Таким образом можно заключить, что все агрегаты фрагментов NOS1AP демонстрируют одинаковую чувствительность к ВМЕ. Это совпадает с распределением цистеинов в белке; все проанализированные фрагменты содержат такие остатки (Рисунок 10). В совокупности наши результаты показывают, что NOS1AP может образовывать устойчивые к SDS агрегаты при сверхпродукции в разных модельных системах.

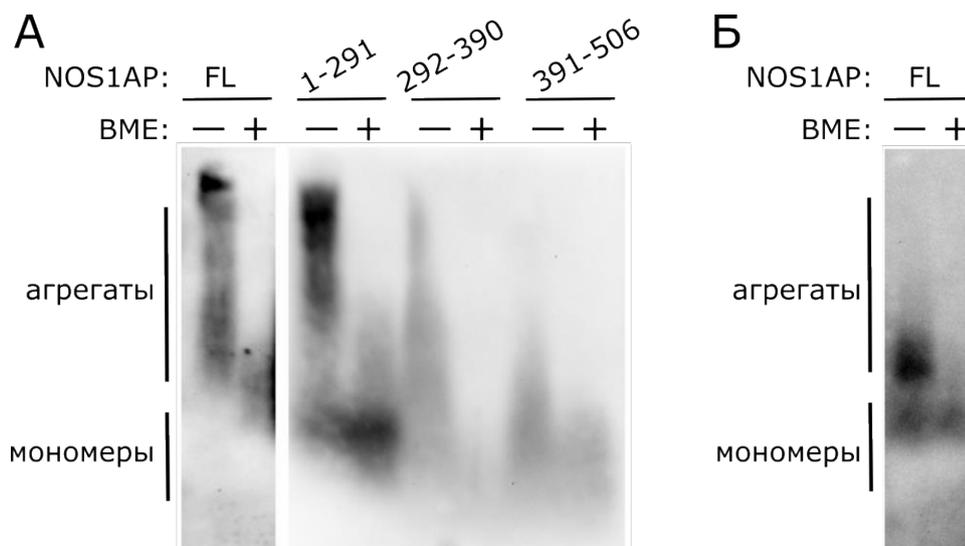


Рисунок 18. NOS1AP агрегирует в дрожжах и в клеточной линии HEK293T. А – SDD-AGE белковых лизатов клеток HEK293T, сверхпродуцирующих NOS1AP или его фрагменты. Для детекции использовали антитела к NOS1AP (полноразмерный белок) или (CGY)FP (фрагменты). Б – SDD-AGE белковых лизатов клеток дрожжей, продуцирующих NOS1AP. Для детекции использовали антитела к (CGY)FP. «+» и «-» обозначают буферы с или без β -меркаптоэтанола (ВМЕ), соответственно.

Учитывая наши данные в системе C-DAG (Рисунки 11, 12), NOS1AP, скорее всего, не является амилоидом, но способен образовывать в клетках эукариот

стабильные высокомолекулярные агрегаты, устойчивые к детергентам (Рисунок 18).

3.2.5 Выживаемость клеток НЕК293Т при сверхпродукции NOS1AP

При анализе морфологии агрегатов NOS1AP в клетках НЕК293Т с помощью флуоресцентной микроскопии было отмечено, что клетки меняют свою морфологию, становятся более округлыми (Рисунок 15). Клетки при этом оставались живыми, о чем судили по окрашиванию красителем трипановым синим (данные не представлены). С помощью МТТ-теста было выявлено, что у клеток при сверхпродукции NOS1AP снижается выживаемость относительно контроля – клеток, трансфицированных вектором (pgLAP1), которые продуцируют EGFP (Рисунок 19).

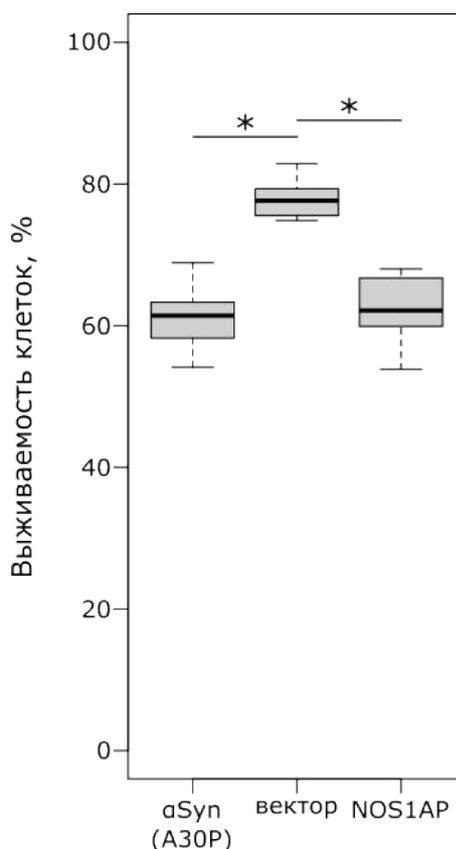


Рисунок 19. Выживаемость клеток НЕК293Т со сверхпродукцией NOS1AP в МТТ-тесте понижается. Сравнение выживаемости клеток НЕК293Т с помощью МТТ-теста при трансфекции вектором (pgLAP1), конструкцией, кодирующей α -синуклеин с заменой А30Р (α Syn(A30P)), и конструкцией, кодирующей NOS1AP. * – p-value <0,05, согласно критерию Вилкоксона.

Понижение выживаемости при сверхпродукции NOS1AP в клетках HEK293T было сопоставимо с значениями выживаемости в клетках при сверхпродукции α -синуклеина с заменой A30P (α Syn(A30P)). В литературе отмечают, что образование олигомеров и фибрилл α -синуклеина с аминокислотными заменами токсично для клеток [350], поэтому конструкция с этим белком была использована нами в качестве положительного контроля.

3.3 Взаимодействие белка NOS1AP и его фрагментов с α -синуклеином

3.3.1 Физическое взаимодействие NOS1AP и его фрагментов с α -синуклеином в клетках HEK293T

В связи с тем, что NOS1AP появился в поле нашего зрения именно как белок, способный коагрегировать с α -синуклеином, необходимо было исследовать их физическое взаимодействие. Стоит отметить, что данные о взаимодействии этих двух белков получены только методом высокопроизводительного протеомного скрининга [26], но работ, подтверждающих бы это, не проводилось.

Для исследования физического взаимодействия двух белков в культуре клеток HEK293T был использован метод бимолекулярной флуоресцентной комплементации (Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC) [351]. В этом случае полипептидную цепь флуоресцентного белка разделяют на две части, каждая из которых не способна флуоресцировать сама по себе. При реассоциации эти фрагменты формируют функциональный флуоресцентный белок. Такой метод широко применяют для изучения белок-белковых взаимодействий. Подход основан на использовании химерных белков, при этом каждый из изучаемой пары целевых белков присоединен к одной из двух частей флуоресцентного белка. При взаимодействии целевых белков друг с другом в клетке возникает флуоресцентный сигнал. Если взаимодействия двух белков интереса нет, то флуоресцентный белок не реассоциирует и не дает флуоресценции.

Клетки млекопитающих HEK293T были трансфицированы одновременно двумя плазмидами на основе векторов pDEST-V1-ORF и pDEST-V2-ORF, каждый

из которых кодировал один из двух белков интереса, слитый с половиной флуоресцентного белка Venus (V1 и V2) [352]. Сами конструкции находятся под контролем сильного конститутивного промотора CMV. Флуоресценцию Venus детектировали на микроскопе через 24 часа после трансфекции (Рисунок 20). Отдельные конструкции, как и векторы с частью флуоресцентного белка без целевого белка, к свечению не приводили. Полноразмерный белок NOS1AP при взаимодействии с α -синуклеином (α Syn) в клетках HEK293T образует яркие флуоресцентные скопления, что говорит о физическом взаимодействии двух целевых белков, а также позволяет предположить их коагрегацию. К тому же стоит отметить, что мы использовали реципрокные комбинации белка и флуоресцентной метки (V1 и V2), и получили аналогичные результаты (данные не представлены). В эксперименте было проанализировано не менее десяти полей зрения для каждого образца.

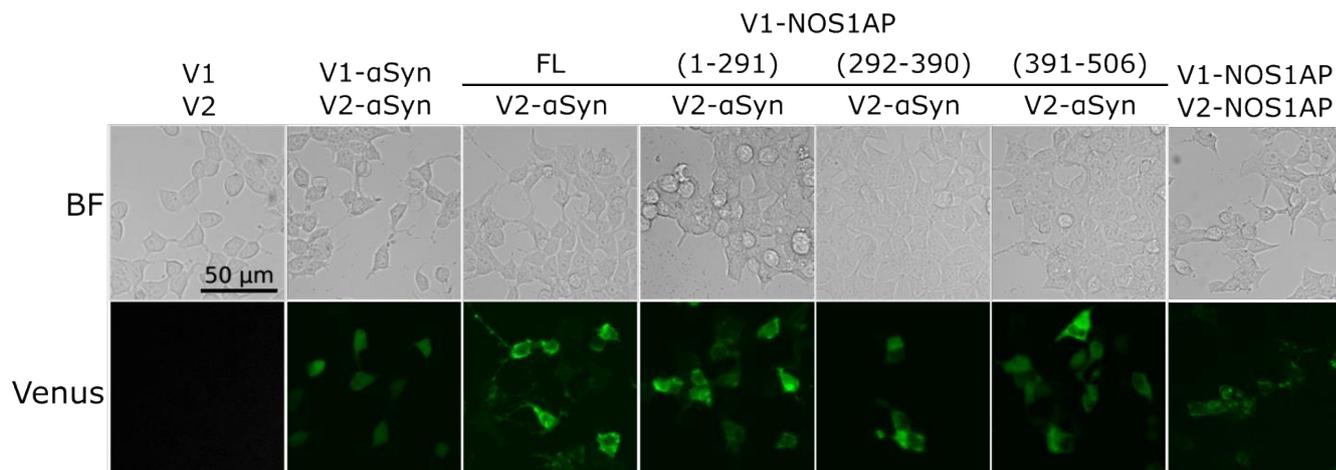


Рисунок 20. Белок NOS1AP и его фрагменты физически взаимодействует с α -синуклеином в клетках HEK293T. Представлены фотографии в проходящем свете (BF) и флуоресценция белка Venus. Клетки трансфицированы сразу двумя конструкциями с частями флуоресцентного белка Venus (V1 и V2).

При работе с конструкциями, кодирующими фрагменты NOS1AP, было также отмечено физическое взаимодействие соответствующих белков с α -синуклеином. Примечательно, что α -синуклеин взаимодействовал не только с полноразмерным белком, но и с каждым из трех исследуемых фрагментов

(Рисунок 20). Это не соответствует предположению о том, что в аминокислотной последовательности белка NOS1AP есть специфический участок, отвечающий за взаимодействие с α -синуклеином. Для того, чтобы проверить, не является ли появление в клетке сигнала флуоресценции результатом неспецифического взаимодействия белков, можно предложить несколько экспериментов. Например, в пару с α -синуклеином в эксперимент взять белок, с которым он не должен взаимодействовать. По крайней мере данные об их взаимодействии должны отсутствовать. Во-вторых, можно использовать сразу три конструкции. Две из них, как и в стандартном эксперименте BiFC, кодировали бы два целевых белка, каждый из которых слит с половиной флуоресцирующего белка (например, V1-NOS1AP и V2- α Syn). В третьей же конструкции был бы закодирован один из целевых белков, но уже без флуоресцентной метки (просто NOS1AP). Если NOS1AP и α -синуклеин действительно физически контактируют, то V1-NOS1AP и NOS1AP без метки будут конкурировать друг с другом при взаимодействии с V2- α Syn, что будет выражаться в снижении флуоресцентного сигнала по сравнению с образцом, в котором только два белка с метками – V1-NOS1AP и V2- α Syn. Мы планируем провести эти эксперименты в будущем.

3.3.2 Колокализация NOS1AP и его фрагментов с α -синуклеином в клетках дрожжей *S. cerevisiae*

Для исследования взаимодействия белков NOS1AP, а также его фрагментов, и α -синуклеина, клетки дрожжей *S. cerevisiae* были трансформированы одновременно двумя плазмидами на основе векторов pAG416GPD-EYFP и pAG415GPD-Cerulean. В этой системе в клетке синтезируются два целевых белка, один из которых слит с флуоресцентным белком EYFP, а второй – с белком Cerulean. Пара флуоресцентных белков EYFP и Cerulean подходит не только для оценки колокализации белков при помощи микроскопии, но также позволяет оценить физическое взаимодействие белков интереса при помощи метода Фёрстеровского переноса энергии (Förster resonance energy transfer, FRET).

В клетках дрожжей белок NOS1AP колокализуется с α -синуклеином. Также колокализация ярких скоплений была отмечена и для фрагментов NOS1AP(1-291) и NOS1AP(292-390) (Рисунок 21). В случае фрагмента NOS1AP(391-506) колокализация отсутствовала, что не согласуется с результатами, полученными в клетках HEK293T (Рисунок 20). Стоит отметить, что мы наблюдали эффект этого фрагмента, слитого с EGFP, на морфологию клеток дрожжей (Рисунок 13). Можно предположить, что этот фрагмент попадает в определенное клеточное окружение и взаимодействует с некоторыми белками дрожжей, что препятствует его коагрегации с α -синуклеином, отмеченному в клетках HEK293T. При этом сами флуоресцентные белки EYFP и Cerulean, не слитые с целевыми белками, фокусов флуоресценции не образуют и светятся диффузно. Для каждого образца было проанализировано не менее 100 полей зрения.

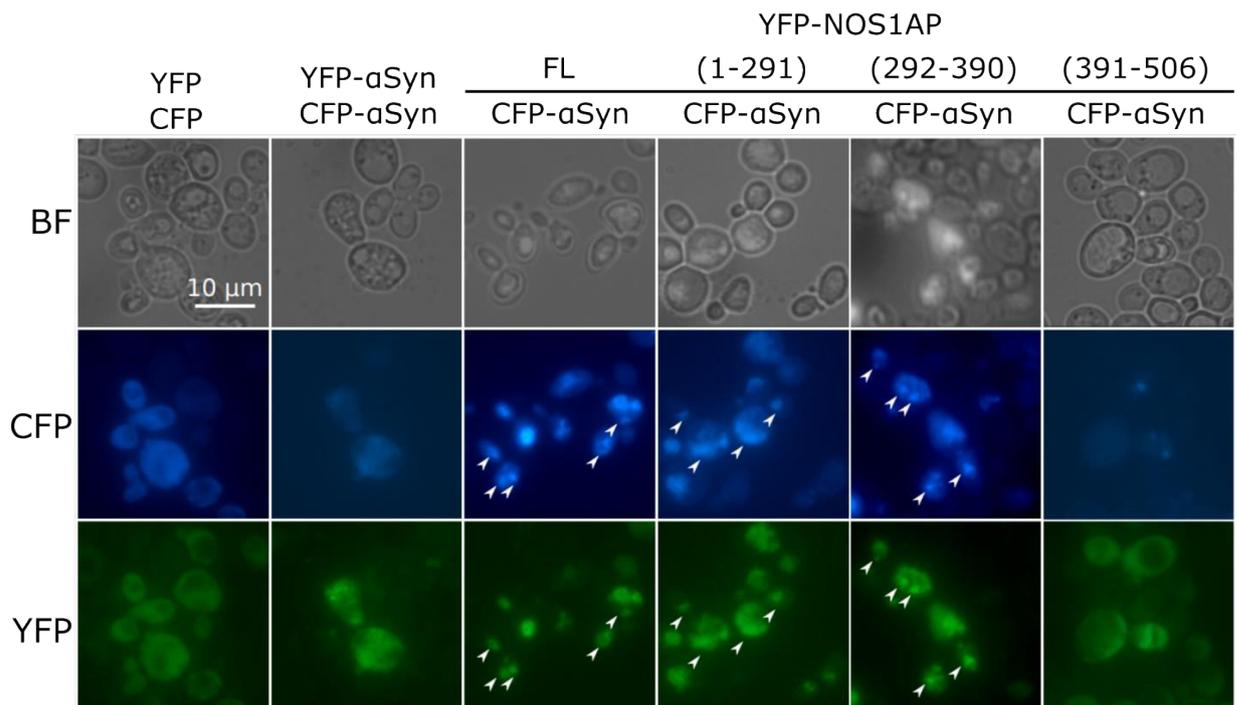


Рисунок 21. Белок NOS1AP, а также его фрагменты NOS1AP(1-291) и NOS1AP(292-390) колокализуются с α -синуклеином в культуре клеток дрожжей. Представлены микрофотографии клеток дрожжей штамма [*pin*⁻] 2-74-D694. BF – проходящий свет; CFP – флуоресценция Cerulean; YFP – флуоресценция EYFP; FL – полноразмерный белок; α Syn – α -синуклеин. Стрелками указаны примеры колокализации.

В ходе работы было также исследовано взаимодействие вариантов α -синуклеина с различными заменами (A53T, A53E, A30P, E46K) с белком NOS1AP. Эти замены возникают в результате точечных мутаций в гене *SNCA* и связаны с наследственными формами паркинсонизма [353]. Соответствующие мутации были внесены в плазмиду pDONR221-SNCA с помощью сайт-направленного мутагенеза. Затем мутантные аллели *SNCA* были клонированы в вектор pAG415GPD-Cerulean. Эксперимент по анализу взаимодействия белков в дрожжевой системе был проведен по аналогии с предыдущим. Согласно полученным данным, белки ведут себя неодинаково: так же, как и в случае α -синуклеина дикого типа, белок с заменами A30P и A53E колокализуется с NOS1AP, но в случае остальных вариантов мы не наблюдали взаимодействия между белками (Рисунок 22). Нами было также отмечено, что в некоторых случаях α -синуклеин и NOS1AP не колокализовались. В частности, это наблюдалось в случае α -синуклеина с заменой E46K.

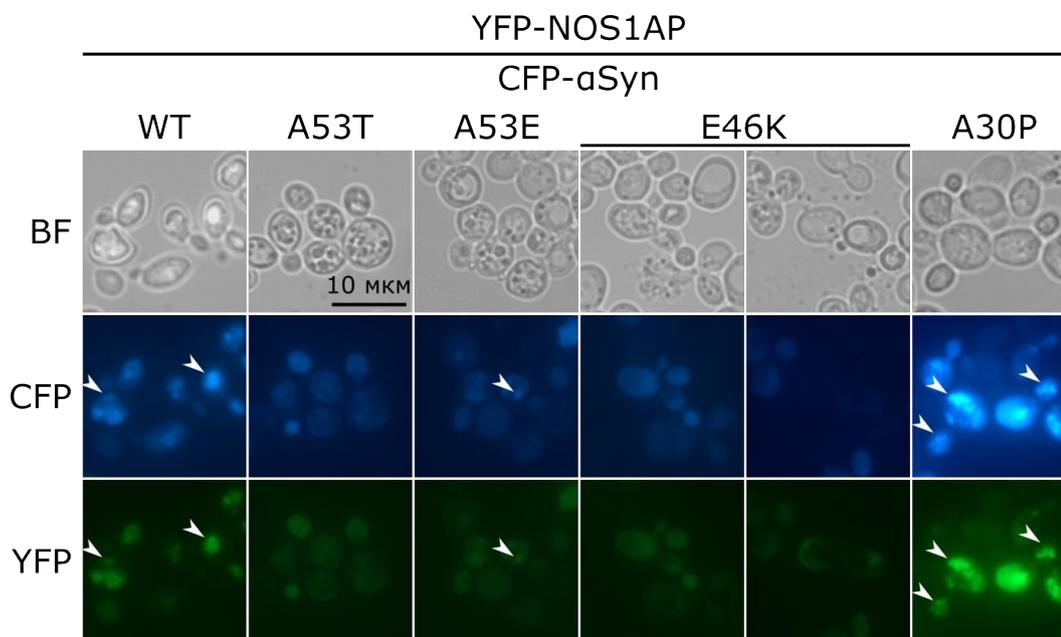


Рисунок 22. Белок NOS1AP колокализуется с α -синуклеином дикого типа и с аминокислотными заменами в культуре клеток дрожжей. Представлены микрофотографии клеток дрожжей штамма [*pin*⁻] 2-74-D694. BF – проходящий свет; CFP – флуоресценция Cerulean; YFP – флуоресценция EYFP; α Syn – α -синуклеин; WT – дикий тип. Стрелками указаны примеры колокализации.

3.4 Коагрегация фрагментов белка NOS1AP с α -синуклеином *in vitro*

Для исследования возможности белка NOS1AP и его фрагментов коагрегировать с α -синуклеином *in vitro*, необходимо было получить в большом количестве очищенные белки. Результаты этих подготовительных этапов представлены в разделах 3.4.1 – 3.4.5.

3.4.1 Выделение и очистка нативного α -синуклеина

При получении рекомбинантного белка в клетках бактерий было отмечено, что при сверхпродукции нативного α -синуклеина большое его количество находится в периплазматическом пространстве [336]. Для его выделения авторы публикации использовали осмотический шок с применением буфера с высоким содержанием сахарозы. По описанной выше методике был успешно наработан, выделен и очищен нативный α -синуклеин (Рисунок 23). На первом этапе очистки использовали анионообменную хроматографию. Дополнительная очистка собранных фракций белка осуществлялась с помощью гель-фильтрации.

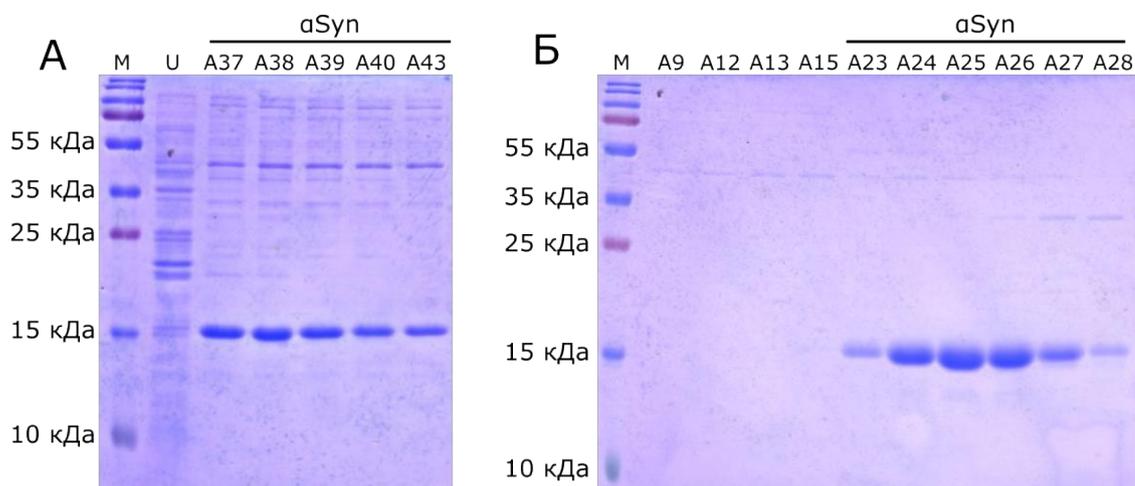


Рисунок 23. Очистка нативного α -синуклеина. Представлены типичные результаты SDS-PAGE для фракций после очистки α -синуклеина при помощи анионообменной хроматографии (А) и последующей гель-фильтрации (Б). М – белковый маркер молекулярного веса; U – не связавшиеся с сорбентом фракции белка; AN – фракции элюции, где N – порядковый номер фракции. Линией отмечены фракции, которые объединяли и использовали в работе. Белки визуализированы с помощью окраски Кумасси.

3.4.2 Агрегация α -синуклеина *in vitro*

Очищенный α -синуклеин использовали для получения агрегатов в условиях *in vitro*. В течение 14 дней его инкубировали при 37 °С (более детально методика получения агрегатов описана в разделе 2.7.1). С помощью SDS-PAGE было показано, как часть мономеров переходит в агрегированную форму, что наблюдается в виде разницы количества мономерного белка в пробах при кипячении и без (Рисунок 24, А). Полученные агрегаты имели фибриллярную морфологию (Рисунок 24, Б). Эти агрегаты были способны связывать ThT (Рисунок 24, В). Таким образом, мы получили образцы амилоидных агрегатов α -синуклеина.

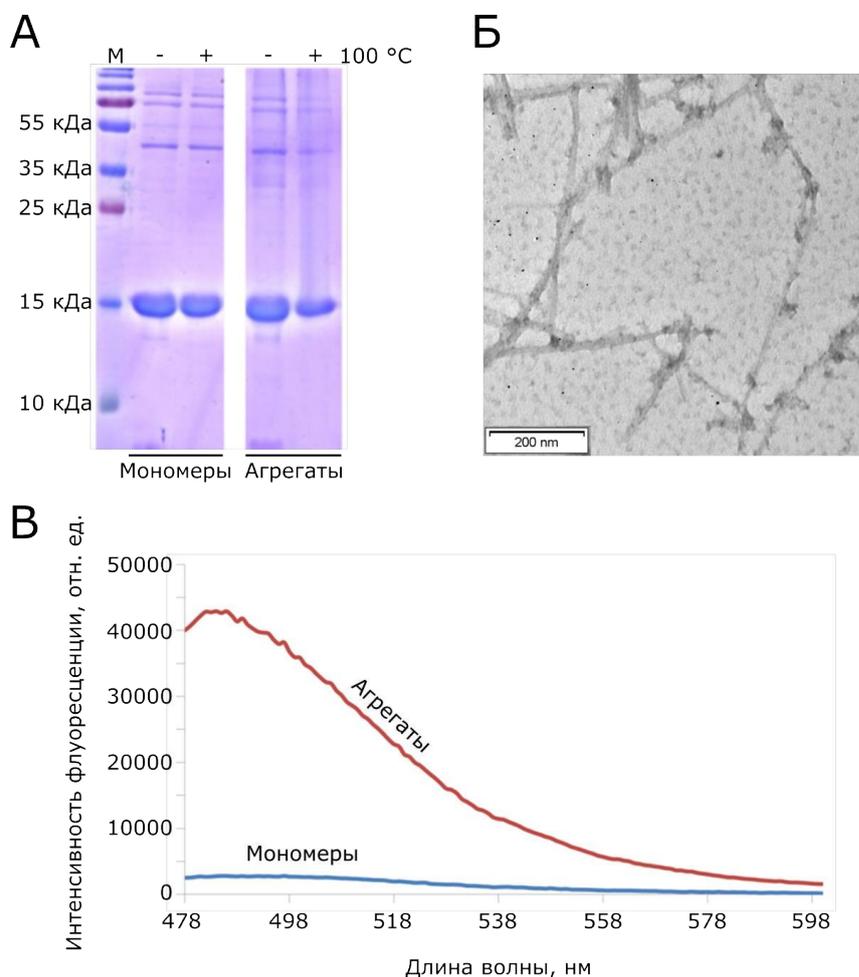


Рисунок 24. Получение фибрилл α -синуклеина. А – результаты SDS-PAGE проб мономерного белка и агрегатов. Б – электронная микрофотография фибрилл α -синуклеина. В – спектр флуоресценции ThT в пробах с мономерным и агрегированным α -синуклеином. Флуоресценцию ThT возбуждали излучением с длиной волны 450 ± 16 нм и регистрировали в диапазоне длин волн от 478 ± 10 до 600 ± 10 нм.

3.4.3 Выделение и очистка фрагментов NOS1AP(292-390) и NOS1AP(391-506)

Перед получением препаративных количеств белков мы сравнили уровень их сверхпродукции в разных бактериальных штаммах. Штаммы BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, T7 и Origami были трансформированы конструкциями на основе вектора pDest527 для наработки белка NOS1AP и его фрагментов (Рисунок 1). В этих конструкциях последовательность белка интереса слита с последовательностью 6xHis. К сожалению, подобрать условия эффективной индукции и выделить полноразмерный белок NOS1AP и его фрагмент NOS1AP(1-291) не удалось. Для штаммов с конструкциями, кодирующими фрагменты NOS1AP(292-390) и NOS1AP(391-506), был проведен сравнительный анализ уровня продукции целевых белков. В результате пробной индукции синтеза целевых белков был выбран штамм T7 для обоих фрагментов в связи с его высокой скоростью накопления биомассы и большим уровнем продукции белков интереса (Рисунок 25).

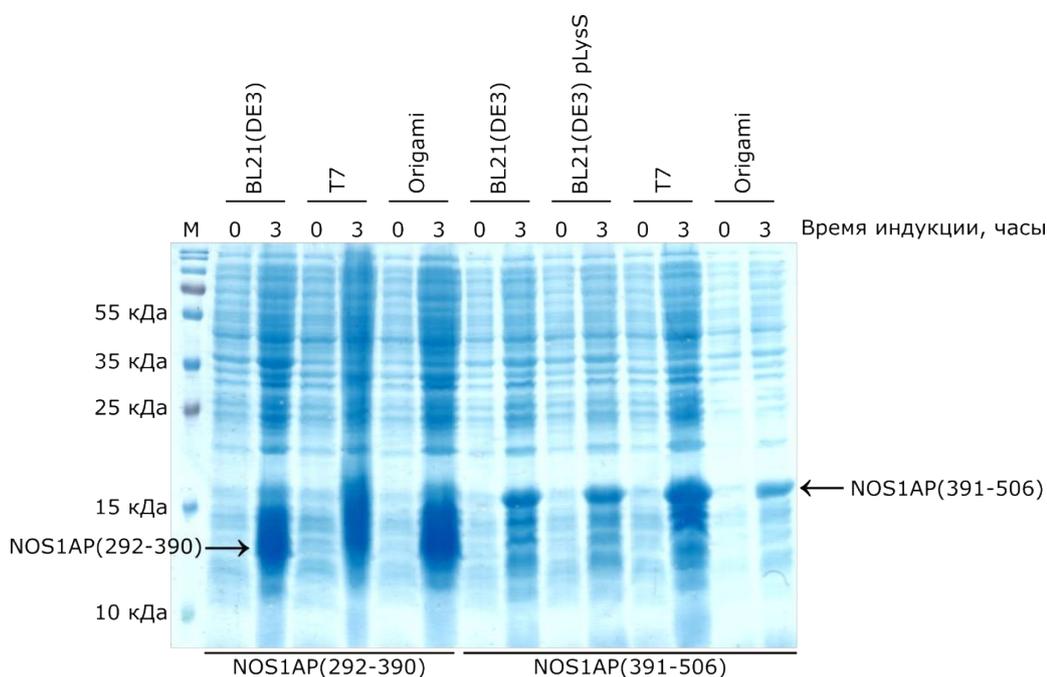


Рисунок 25. Индукция синтеза фрагментов NOS1AP(292-390) и NOS1AP(391-506) в клетках штаммов BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, T7 и Origami. Представлены результаты SDS-PAGE белковых лизатов бактерий. Белки были визуализированы с помощью окраски Кумасси. Стрелками указаны ожидаемые размеры целевых белков: 13,9 кДа для NOS1AP(292-390) и 15,5 кДа для NOS1AP(391-506). М – белковый маркер молекулярного веса.

Для штамма T7, трансформированного плазмидой для наработки фрагментов NOS1AP(292-390) или NOS1AP(391-506), были подобраны условия культивирования и индукции синтеза целевого белка. Культуры растили при температуре 37 °С до достижения $OD(600 \text{ нм}) = 0,5$. Затем добавляли IPTG до концентрации 1 мМ и продолжали растить культуры при 18 °С, 26 °С, 30 °С или 37 °С в течение 5 часов. В результате сравнений количества белка после индукции была выбрана температура 26 °С. В дальнейшем оба белка были очищены с помощью аффинной хроматографии (на рисунке 26 представлены типичные результаты).

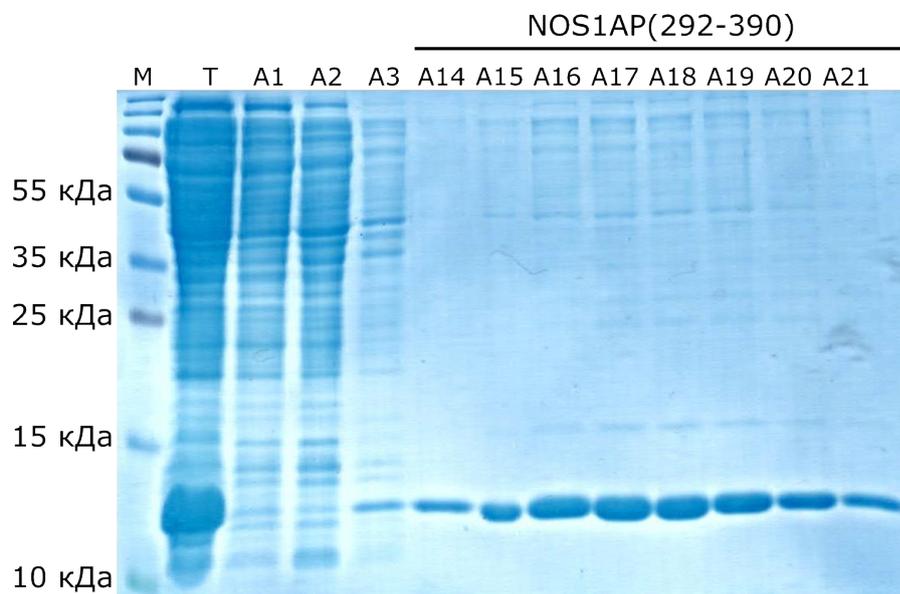


Рисунок 26. Очистка фрагмента NOS1AP(292-390). Представлены результаты SDS-PAGE фракций после очистки NOS1AP(292-390) при помощи аффинной хроматографии. Для визуализации белков гель был окрашен Кумасси. М – белковый маркер молекулярного веса; Т – лизат, наносимый на колонку; AN – фракции элюции, где N – порядковый номер фракции. Линией отмечены фракции, которые объединяли и использовали далее в работе.

Для исследования возможности амилоидогенного фрагмента NOS1AP(292-390) образовывать агрегаты *in vitro* очищенный белок инкубировали при 37 °С на ротаторе при перемешивании «через голову». Через 7 дней к образцу белка добавляли тиофлавин Т и измеряли интенсивность его флуоресценции. По нашим

результатам фрагмент NOS1AP(292-390) не образует агрегатов, способных связывать тиофлавин Т (Рисунок 27).

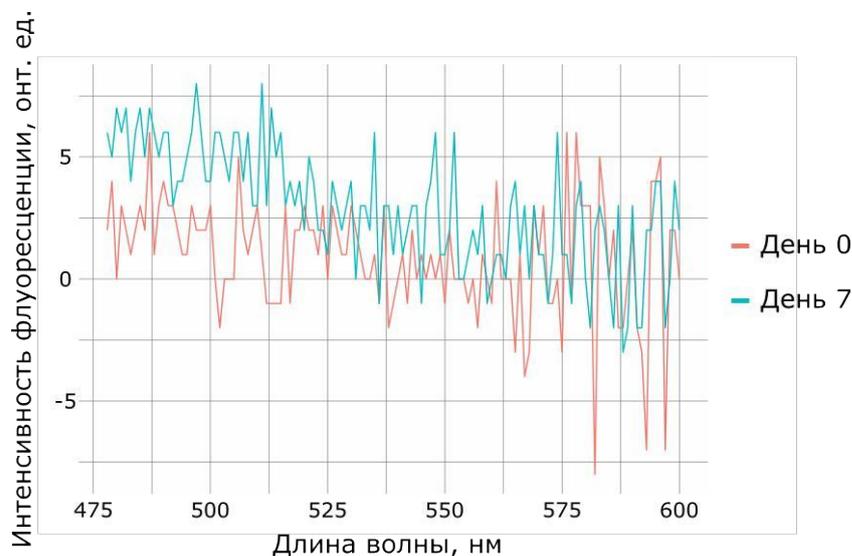


Рисунок 27. NOS1AP(292-390) не образует агрегатов, связывающих тиофлавин Т. Представлены спектры флуоресценции ThT в пробах фрагмента NOS1AP(292-390) с концентрацией 1 мг/мл до инкубации и через 7 дней после ее начала.

3.4.4 Воспроизведение методики для анализа кинетики агрегации α -синуклеина *in vitro*

Агрегация α -синуклеина дикого типа представляет собой длительный процесс и может занимать несколько недель. При попытке воспроизвести эту методику в планшетах мы столкнулись с проблемой испарения образцов, что приводило к аномальному увеличению флуоресценции тиофлавина Т. В дальнейшем решить эту проблему мы смогли за счет заполнения периферических лунок, а также пространства между ними водой. В ходе отработки методики мониторинга кинетики агрегации α -синуклеина мы протестировали различные факторы, которые могли влиять на агрегацию: способ перемешивания и необходимость фрагментации предсуществующих агрегатов.

При измерениях в планшетах на приборе Clariostar (BMG) мы собирали данные о флуоресценции тиофлавина Т через каждые 15 минут. Далее мы

вычисляли параметры модели кинетики агрегации α -синуклеина, описанной в разделе 2.7.4. Такими параметрами были: x_0 – время полуреакции, dx – величина обратная скорости агрегации. С учетом подобранных параметров мы также рассчитывали время lag-фазы реакции: $lag = x_0 - 2dx$. Благодаря этому мы могли более детально анализировать процесс агрегации.

В литературе описано, что добавление стеклянных шариков ускоряет агрегацию α -синуклеина и повышает воспроизводимость результатов [354]. Мы проверили возможность использования стеклянных шариков в наших экспериментах. Согласно полученным нами данным, эта модификация методики существенно ускоряет агрегацию (Рисунок 28). На основании этих результатов мы сохранили этот этап протокола.

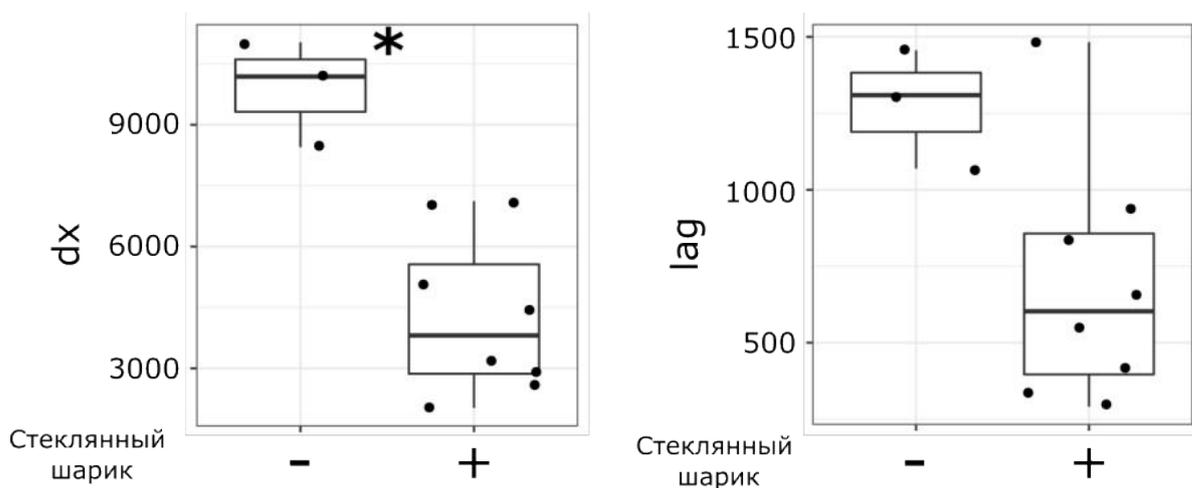


Рисунок 28. Добавление стеклянных шариков увеличивает скорость агрегации. На графиках отложены значения параметров моделей, описывающих процесс агрегации в разных пробах: dx (параметр обратный скорости агрегации) и lag-фаза в минутах. * – p -value $< 0,05$, согласно критерию Вилкоксона.

Для оценки чувствительности методики мы провели серию экспериментов по агрегации α -синуклеина с добавлением предварительно полученных агрегатов белка. Увеличение концентрации агрегированного белка сокращает lag-фазу, а при добавлении 10% агрегатов от количества мономерного белка lag-фаза полностью отсутствует, флуоресценция начинает стабильно увеличиваться с первых циклов измерений (Рисунок 29).

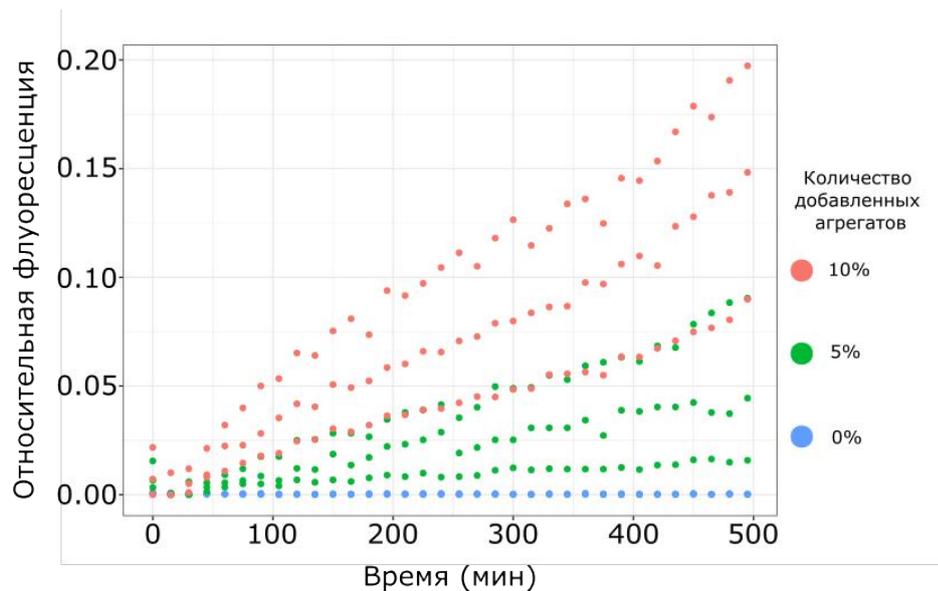


Рисунок 29. Добавление предсуществующих агрегатов ускоряет агрегацию α -синуклеина. Представлен график изменения флуоресценции ThT в процессе агрегации α -синуклеина. На графике представлены значения трех повторностей эксперимента.

Также мы проверили влияние фрагментации предсуществующих агрегатов на скорость агрегации α -синуклеина. Согласно полученным результатам, обработка ультразвуком не оказывает влияния на процесс агрегации (Рисунок 30).

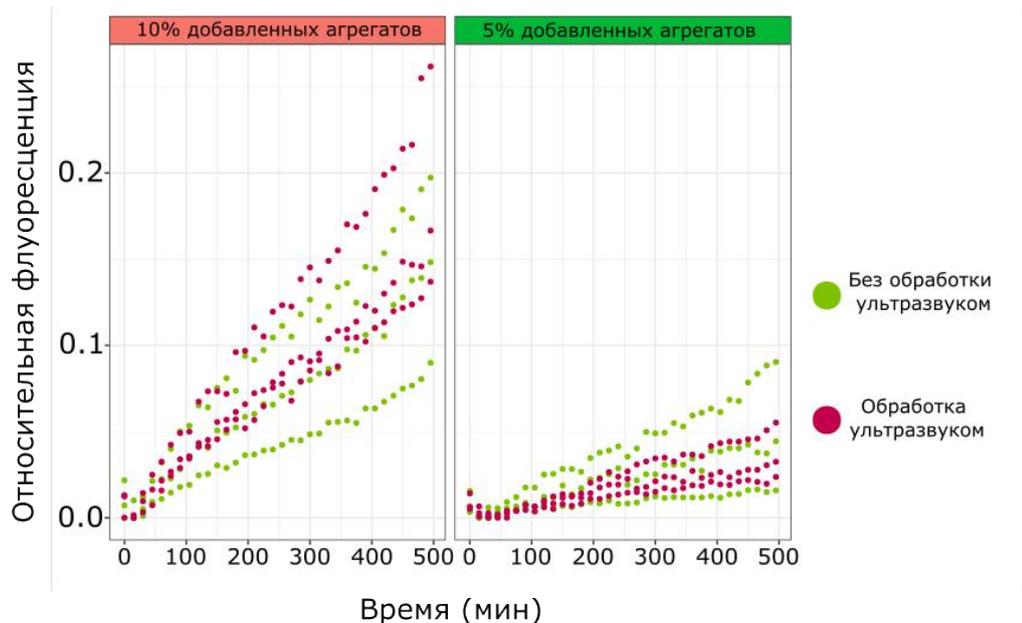


Рисунок 30. Фрагментация фибрилл α -синуклеина ультразвуком не влияет на скорость агрегации белка. Представлен график изменения флуоресценции ThT в процессе агрегации α -синуклеина.

В качестве оптимального мы выбрали следующий протокол. Состав реакционной смеси в PBS буфере: мономерный α -синуклеин 1,5 мг/мл, азид натрия 0,05% (w/v), тиофлавин Т 40 мкМ. Мономерный α -синуклеин после растворения в PBS центрифугировали в течение 30 минут при 4 °С и ускорении 21130 g. Объем пробы в одной лунке составлял 150 мкл. В каждую пробу добавляли стеклянный шарик для лучшего перемешивания.

3.4.5 Коагрегация фрагментов NOS1AP(292-390) и NOS1AP(391-506) с α -синуклеином

Для оценки влияния фрагментов NOS1AP(292-390) и NOS1AP(391-506) на скорость агрегации α -синуклеина, мы вычисляли параметры модели кинетики агрегации α -синуклеина, описанной в разделе 2.7.4.

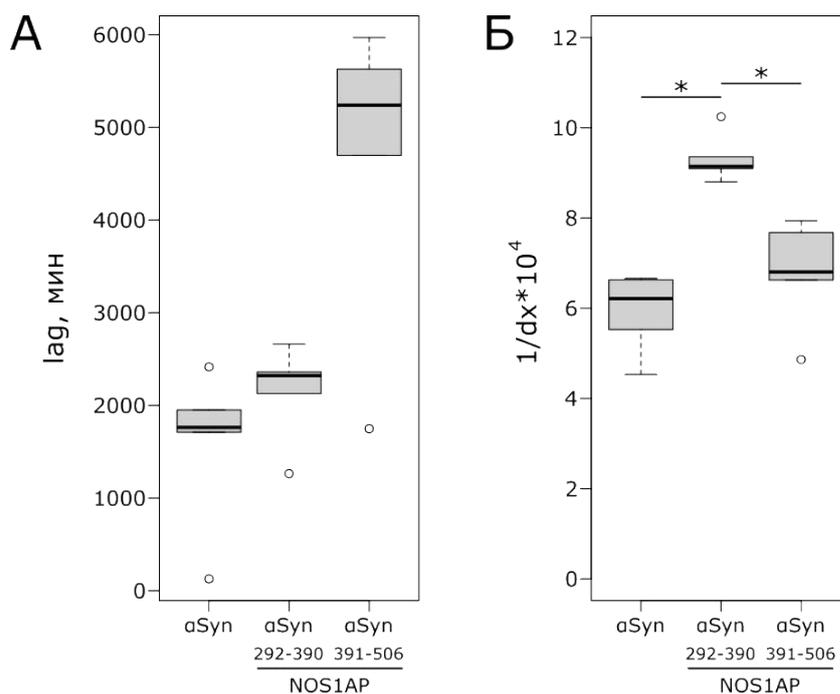


Рисунок 31. Мономеры фрагмента NOS1AP(292-390) ускоряют агрегацию α -синуклеина, но не влияют на lag-фазу этого процесса. А – сравнение параметра lag-фазы (указана в минутах) агрегации α -синуклеина (α Syn), α -синуклеина с фрагментом NOS1AP(292-390) и α -синуклеина с фрагментом NOS1AP(391-506). Б – сравнение параметра dx (величины, обратной скорости агрегации) агрегации α -синуклеина (α Syn), α -синуклеина с фрагментом NOS1AP(292-390) и α -синуклеина с фрагментом NOS1AP(391-506). * – p-value < 0,05, согласно критерию Вилкоксона с поправкой Холма на множественное сравнение.

Величина d_x (величина обратная скорости агрегации) при агрегации α -синуклеина достоверно отличается от таковой в реакции, в которой присутствуют помимо мономеров α -синуклеина еще мономеры NOS1AP(292-390). При этом время lag-фазы слегка увеличивается (Рисунок 31). В случае совместной агрегации NOS1AP(391-506) и α -синуклеина величина d_x достоверно не отличалась от пробы только с α -синуклеином (Рисунок 31). Время lag-фазы в этом случае также несколько увеличивалось (Рисунок 31).

Для того, чтобы оценить, влияет ли добавление фрагментов NOS1AP на морфологию фибрилл α -синуклеина, нами был проведен подсчет длины фибрилл, образующихся при самостоятельной агрегации α -синуклеина, а также при совместной агрегации α -синуклеина с фрагментами NOS1AP(292-390) и NOS1AP(391-506).

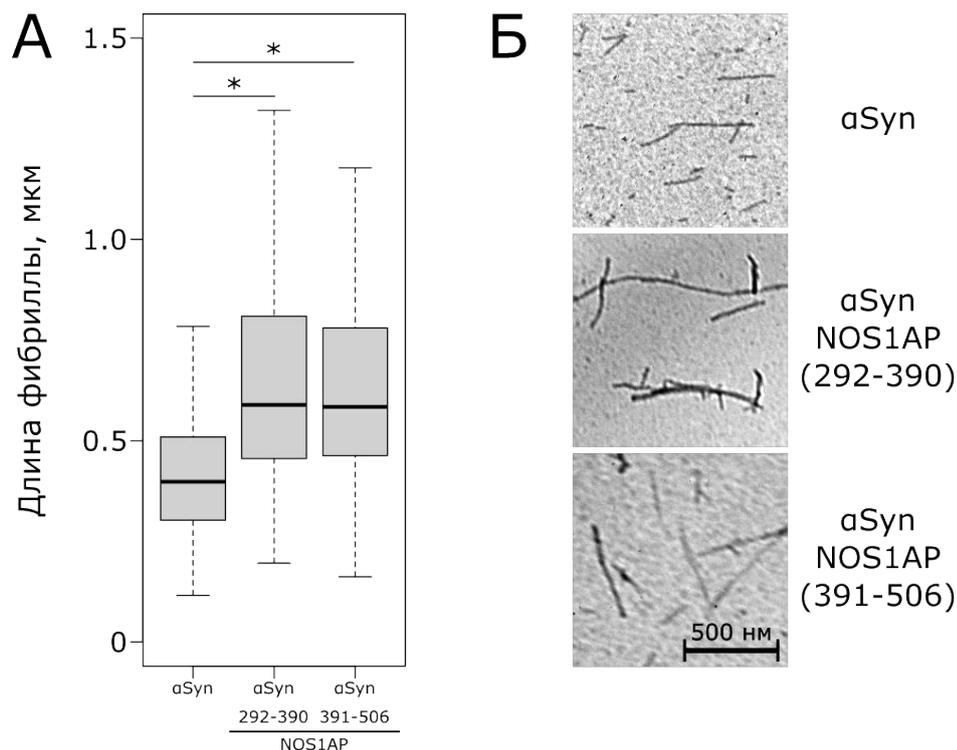


Рисунок 32. Сравнение характеристик фибрилл α -синуклеина при инкубации вместе с фрагментами NOS1AP. А – Сравнение длин фибрилл α -синуклеина при отдельной агрегации, а также при инкубации совместно с фрагментами NOS1AP(292-390) и NOS1AP(391-506). Б – Микрофотография с электронного микроскопа фибрилл α -синуклеина при отдельной агрегации, а также при инкубации совместно с фрагментами NOS1AP(292-390) и NOS1AP(391-506). * – p -value $<0,05$, согласно критерию Вилкоксона с поправкой Холма на множественное сравнение.

Было отмечено, что совместная инкубация α -синуклеина с фрагментами NOS1AP(292-390) и NOS1AP(391-506) приводила к образованию более длинных фибрилл (Рисунок 32). Таким образом, мы можем предположить, что исследуемые фрагменты NOS1AP действительно взаимодействуют с α -синуклеином, а также, по-видимому, стабилизируют его агрегаты, что приводит к образованию более длинных фибрилл.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Агрегация NOS1AP

Поиск белков, склонных к агрегации, представляет собой важную задачу не только биологии, но и медицины. С амилоидами связаны различные серьезные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, диабет второго типа и многие другие. Большинство этих заболеваний неизлечимы и даже смертельны для человека. Изучение новых амилоидогенных белков, а также исследование возможности коагрегировать уже известных амилоидов является не только важной фундаментальной задачей в биологии, но также позволяет открыть новые мишени для прицельного лечения соответствующих заболеваний. Отсутствие детального понимания молекулярных механизмов токсичности амилоидных агрегатов является важной причиной отсутствия эффективной терапии для этих болезней. Существуют гипотезы, которые связывают патологические эффекты с взаимодействием между амилоидами и другими белками. В этом случае актуальна концепция «амилоидных сетей» или «амилоидного каскада», обнаруженная в связи с болезнью Альцгеймера, при которой наблюдается амилоидная агрегация по крайней мере двух белков: амилоида- β и tau [355,356].

Поиск потенциальных амилоидов человека *in vivo* зачастую затруднен в связи со сложностями отбора материала. Особенно остро эта проблема касается образцов мозга. Большинство открытий нейрогенеративных заболеваний основывалось на гистопатологических исследованиях посмертных образцов мозга. Для идентификации новых амилоидов широко используют амилоид-специфические красители. Конго красный считается «золотым стандартом» при идентификации амилоидов, но и для него есть примеры окрашивания неамилоидных белков (см. обзоры [29,357]). Для того, чтобы решить проблему отбора материала человеческих тканей, возможно применение биоинформатических подходов для предсказания белков, склонных к агрегации. Существует большое количество алгоритмов для подобных задач [358]. По нашим

биоинформатическим вычислениям белок NOS1AP является амилоидогенным (Рисунок 10). К тому же, NOS1AP по данным протемного скрининга может взаимодействовать с α -синуклеином. В связи с этим кажется логичным изучение образцов людей, больных синуклеинопатиями, с целью идентифицировать NOS1AP в агрегатах вместе с α -синуклеином. С другой стороны, процесс их взаимодействия может иметь временный характер. И даже если белок NOS1AP действительно является амилоидогенным, и действительно взаимодействует с α -синуклеином, в образцах больных его может не оказаться в достаточном количестве, если взаимодействие двух белков было кратковременным. Более того, если предположить функциональную роль агрегатов NOS1AP, показать это непосредственно в организме человека будет довольно сложной задачей. Все это позволяет заключить, что изучение белков, свойства которых смоделированы методами биоинформатики, стоит начинать исследовать именно с более простых моделей.

Для белка NOS1AP в литературе не была описана ни возможность его олигомеризации или агрегации, ни тем более способность образовывать амилоидные фибриллы. Для исследования амилоидных свойств белков существует множество методов, как *in vitro*, так и *in vivo*. В этой работе мы использовали их различные варианты. Так, была использована относительно простая бактериальная система C-DAG. В ней исследуемые нами белки, как полноразмерный NOS1AP, так и его фрагменты, не продемонстрировали амилоидных свойств (Рисунки 11, 12). Однако эти данные нельзя сразу экстраполировать на человека, и возможность агрегации NOS1AP *in vivo* требует дальнейших исследований.

Для исследования предполагаемых амилоидных белков часто используется дрожжевая эукариотическая модель [9,345–347]. В такой системе удобно исследовать характер свечения флуоресцентных меток, соединенных с белками интереса с помощью флуоресцентной микроскопии. Нужно отметить, что только результатов микроскопии недостаточно для оценки того, в каком состоянии находится анализируемый белок – в мономерном, олигомерном, или в виде

амилоидных фибрилл. Для ответа на этот вопрос требуются дополнительные исследования. Но здесь также возникает проблема корректной экстраполяции полученных результатов в случае человеческих белков. В нашем случае по результатам флуоресцентной микроскопии мы наблюдали, что полноразмерный белок NOS1AP, а также его фрагмент NOS1AP(1-291), способны образовывать скопления в клетках дрожжей. Однако судить именно об амилоидной природе таких образований нельзя, поэтому требуются дополнительные исследования. С этой целью нами был использован метод SDD-AGE, с помощью которого мы обнаружили, что полноразмерный NOS1AP в клетках дрожжей находится в виде олигомеров, устойчивых к детергентам, которые, однако, чувствительны к ВМЕ (Рисунок 18). Последнее может свидетельствовать о том, что такие агрегаты стабилизированы дисульфидными связями.

В клетках дрожжей мы наблюдали, что сверхпродукция фрагмента NOS1AP(391-506) приводит к морфологическим изменениям клеток (Рисунок 13). Этот фрагмент содержит С-концевой PDZ-связывающий домен, который способен взаимодействовать с белками, содержащими домен PDZ, к которым относится NOS1 (Рисунок 33).

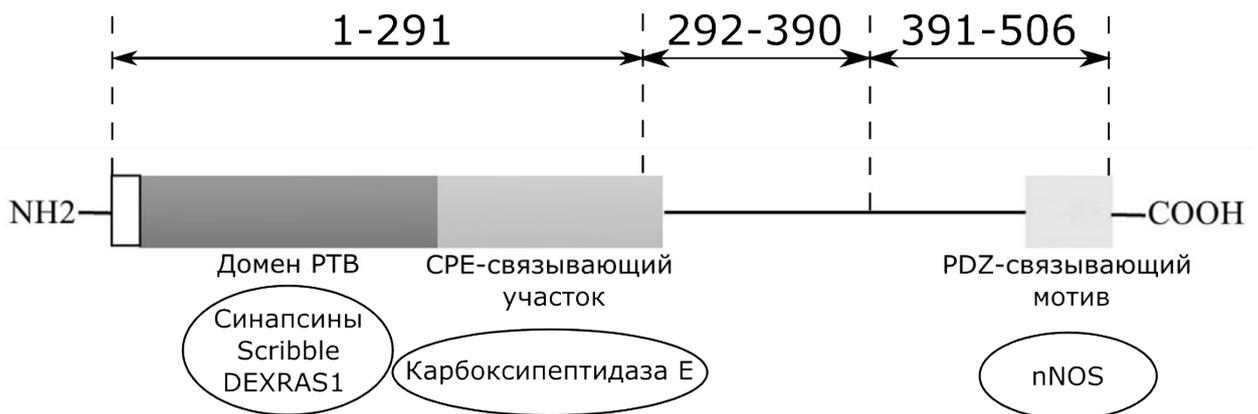


Рисунок 33. Доменная организация и белки, взаимодействующие с NOS1AP. Схема доменов NOS1AP. Под отдельными участками подписаны белки, которые с ними взаимодействуют: DEXRAS1, Scribble и синапсины (синапсин I, II и III) связываются с доменом РТВ; nNOS связывается с PDZ-связывающим мотивом; карбоксипептидаза E (CPE) связывается с СРЕ-связывающей областью (модифицировано по [278]). Стрелки указывают на границы фрагментов, использованных в работе.

Такие белки есть и в клетках дрожжей *S. cerevisiae* [348]. Можно предположить, что такое взаимодействие приводит к изменениям морфологии клеток. С другой – в случае полноразмерного белка NOS1AP такого эффекта отмечено не было, хотя в его последовательности также присутствует PDZ-связывающий домен. Это может говорить том, что не всегда известно, как поведет себя исследуемый белок в гетерологичной системе, где белок отсутствует в естественных условиях. Такие белки есть и в клетках дрожжей *S. cerevisiae* [348]. Можно предположить, что такое взаимодействие приводит к изменениям морфологии клеток. С другой – в случае полноразмерного белка NOS1AP такого эффекта отмечено не было, хотя в его последовательности также присутствует PDZ-связывающий домен. Это может говорить том, что не всегда известно, как поведет себя исследуемый белок в гетерологичной системе, где белок отсутствует в естественных условиях.

Культуры клеток млекопитающих являются одной из наиболее адекватных моделей для анализа белков человека с потенциально амилоидогенными свойствами. Несмотря на это, клеточные линии считают системами *in vitro*. Существует большое количество клеточных линий человека, отличающихся происхождением, типом клеток и другими особенностями. Нами была выбрана линия HEK293T, так как это очень распространенная и относительно простая в работе модель. В нашем арсенале также была линия IMR-32, от экспериментов с которой пришлось отказаться из-за низкой эффективности трансфекции. Долгое время считалось, что линия HEK293 (предшественник HEK293T), полученная из клеток эмбриональных почек человека, представляют собой фибробласты, эндотелиальные или эпителиальные клетки, которые присутствуют в почках. Но позднее было показано, что эта культура клеток имеет много свойств недифференцированных нейронов [359]. Тем не менее, в литературе клетки линии HEK293 чаще относят к клеткам не-нейронального происхождения. Нами было отмечено в работе, что как в IMR-32, так и в HEK293T, полноразмерный белок NOS1AP, а также его фрагмент NOS1AP(292-390) образуют агрегаты. Фрагмент NOS1AP(1-291) имеет такой же эффект в клетках HEK293T (Рисунки 15, 16 и 17).

Сверхпродукция полноразмерного белка NOS1AP, а также его фрагментов NOS1AP(1-291) и NOS1AP(292-390) влияют на морфологию клеток млекопитающих (Рисунок 15). Судя по всему, агрегация полноразмерного NOS1AP цитотоксична (Рисунок 19). В то же время, только фрагмент NOS1AP(391-506) изменяет внешний вид клеток дрожжей (Рисунок 13). Мы пока не можем предложить точного объяснения этих различий. Возможно сверхпродукция белков с функциональными доменами, к которым относится NOS1AP, приводит к нарушению клеточной физиологии. Интересно отметить, что фрагмент NOS1AP(391-506) занимает все пространство клетки, о чем можно судить по диффузному свечению метки EGFP, и не приводит к морфологическим изменениям. Но именно этот фрагмент оказывает влияние на морфологию клеток дрожжей, у которых его продукция также повышена.

Таким образом, мы можем заключить, что полноразмерный NOS1AP и его фрагмент NOS1AP(1-291) при сверхпродукции образуют устойчивые к детергентам агрегаты в клетках эукариот (Рисунок 18). Этот вывод основан на следующих ключевых результатах. В клетках дрожжей *S. cerevisiae* исследуемый белок NOS1AP, а также его фрагмент 1-291, образуют агрегаты (Рисунок 13). В свою очередь в культуре клеток HEK293T агрегаты формируют полноразмерный NOS1AP и его фрагменты NOS1AP(1-291) и NOS1AP(292-390) (Рисунок 15). Примечательно, что предполагаемые структурированные участки в модели NOS1AP попадают в эти регионы, в то время, как фрагмент NOS1AP(391-506) приходится на неструктурированный участок (Рисунок 34).

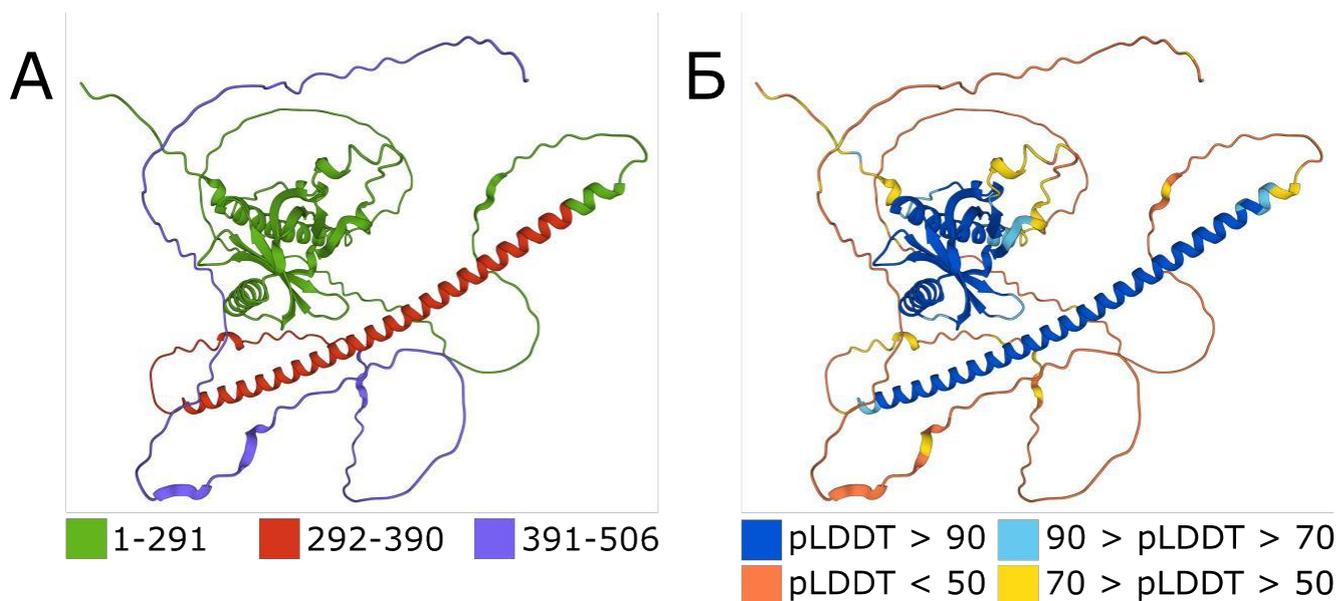


Рисунок 34. Трехмерная структура NOS1AP. Пространственная структура NOS1AP, предсказанная с помощью AlphaFold [360,361]. А – Пространственная структура NOS1AP с обозначением регионов, взятых в анализ в данной работе. Б – Трехмерная структура белка NOS1AP с указанием достоверности для каждого остатка (pLDDT), выраженного значением от 0 до 100. Некоторые области с pLDDT ниже 50 могут быть неструктурированными.

Также необходимо добавить, что далеко не все известные белки с амилоидными свойствами агрегируют в культуре клеток человека. Например, в клеточной линии человека HEK293 агрегация α -синуклеина имеет ряд особенностей. Так, в клетках могут образовываться небольшие включения, но довольно редко они преобразуются в агрегаты. Иногда для усиления агрегации требуется сверхпродукция других белков [362]. В случае NOS1AP в наших экспериментах агрегировал без дополнительных воздействий (Рисунок 16).

Мы показали, что NOS1AP и его фрагменты 1-291 и 292-390 способны образовывать стабильные агрегаты в клетках дрожжей и/или млекопитающих. Необходимо добавить, что в нашей работе в клетках эукариот использовали конструкции для сверхпродукции белков, что также не позволяет судить о поведении этого белка при нормальном уровне синтеза. Однако, стоит отметить, что при шизофрении отмечают повышенное количество мРНК гена *NOS1AP*, а также соответствующего белка [22]. С другой стороны, инактивация различных белков в агрегатах их функциональных партнеров показана на многих примерах

[13]. Это позволяет предположить, что агрегаты NOS1AP способны титровать nNOS, при этом может снижаться число комплексов nNOS с NMDA-рецепторами, что снижает NMDA-опосредованный приток кальция и деактивирует каталитическую деятельность nNOS. Предполагается, что снижение активности этих рецепторов связано с развитием шизофрении [311]. Таким образом, наши данные позволяют нам предложить новый молекулярный механизм в рамках глутаматной гипотезы развития шизофрении, основанный на агрегации NOS1AP (Рисунок 35).

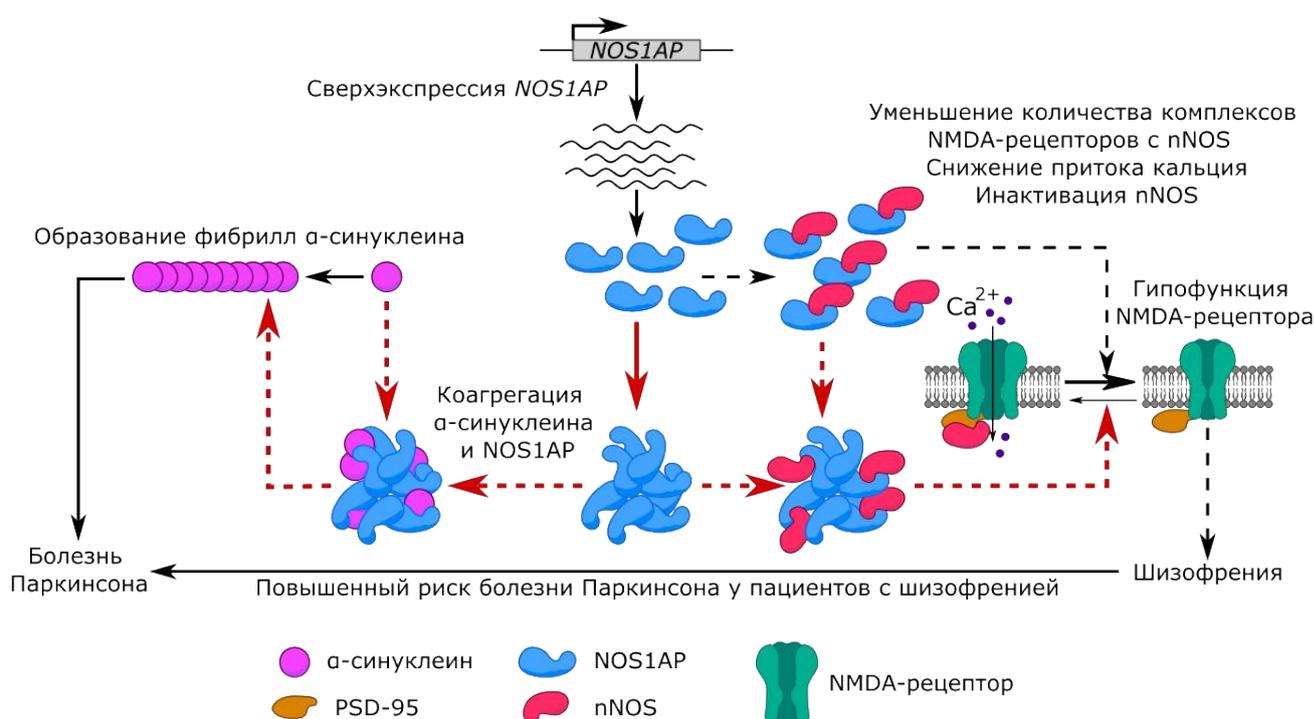


Рисунок 35. Возможная роль агрегации NOS1AP в патогенезе болезни Паркинсона и шизофрении. Сплошные линии соответствуют экспериментальным результатам, а пунктирные линии — гипотетическим предположениям. Красными стрелками обозначены процессы и гипотезы, которые мы выдвигаем на основе наших результатов.

4.2 Взаимодействие NOS1AP с α -синуклеином

Взаимодействие белка NOS1AP с α -синуклеином в литературе упоминается лишь единожды, и является результатом протеомного скрининга, основанного на ко-иммунопреципитации с последующей масс-спектрометрией [26]. Однако,

направленной проверки этого взаимодействия не проводилось. При этом NOS1AP не фигурирует в исследованиях по белок-белковым взаимодействиям α -синуклеина с белками партнерами при синуклеинопатиях или шизофрении [363,364]. Таким образом, у нас была возможность впервые детально изучить физическое взаимодействие NOS1AP с α -синуклеином.

Метод бимолекулярной флуоресцентной комплементации является довольно распространенным способом исследования белок-белковых взаимодействий в живых клетках. Он подходит для изучения взаимодействия двух целевых белков. В более сложном варианте этот метод можно даже расширить до изучения трех белков. В таком случае используется метод FRET, основанный на BiFC (см. обзор [365]). Но даже при изучении всего двух белков возможно использование большого количества контролей, т.к. теоретически существует восемь комбинаций конструкций, которые отличаются между собой, например, N- или C-концевым расположением фрагмента флуоресцентного белка [366]. Таким образом, нужно внимательнее подходить к вопросу получения белков с флуоресцентными метками и интерпретации результатов. В нашей работе было показано, что белок NOS1AP и его фрагменты NOS1AP(1-291), NOS1AP(292-390) и NOS1AP(391-506) взаимодействуют с α -синуклеином в клетках HEK293T (Рисунок 20), о чем мы можем судить по детекции флуоресцентного белка при реассоциации его частей. Это ставит под сомнением вопрос о наличии в последовательности белка NOS1AP специфического участка, ответственного за взаимодействие с α -синуклеином. Возможно, в последовательности всех фрагментов присутствуют определенные аминокислотные мотивы, с которыми взаимодействует α -синуклеин. Можно также предположить, что белки NOS1AP и α -синуклеин взаимодействуют посредством какого-то белка посредника. Однако это было бы возможно в клетках человека. В клетках дрожжей мы показали колокализацию полноразмерного NOS1AP и его фрагментов NOS1AP(1-291) и NOS1AP(292-390) с α -синуклеином (Рисунок 21). Это подтверждает предыдущие результаты, хотя не позволяет с уверенностью говорить о физическом взаимодействии между

белками в клетках дрожжей. Интересно, что мы получили отличающиеся результаты колокализации NOS1AP и α -синуклеина с аминокислотными заменами (Рисунок 22). Мы можем предположить, что замены A53T и E46K α -синуклеина препятствуют его взаимодействию с NOS1AP. Данные о таких взаимодействиях могут быть полезны в свете того, что варианты α -синуклеина с заменами сами по себе обладают разными свойствами, такими как скорость агрегации и цитотоксичность [353,367]. Для более детального анализа дрожжевые лизаты можно дополнительно исследовать с помощью метода FRET, что говорило бы уже непосредственно о взаимодействии NOS1AP и α -синуклеина. Примечательно, что в случае фрагмента NOS1AP(391-506) также наблюдаются расхождения в результатах эксперимента в дрожжах и в культурах клеток человека (Рисунки 20, 21). Возможно, при взаимодействии этого фрагмента с дрожжевыми белками посредством PDZ-связывающего мотива уменьшается вероятность контакта с α -синуклеином. Учитывая полученные нами данные при работе с культурой клеток человека HEK293T и дрожжами *S. cerevisiae* можно заключить, что полноразмерный NOS1AP, а также его фрагменты NOS1AP(1-291) и NOS1AP(292-390) взаимодействуют с α -синуклеином в клетках эукариот при сверхпродукции.

Коагрегация двух белков в процессе формирования белковой фибриллы представляет собой большой интерес с фундаментальной точки зрения. В связи с этим исследование возможности белков NOS1AP и α -синуклеина коагрегировать являлось неотъемлемой частью нашего исследования. В экспериментах *in vitro* было продемонстрировано, что добавление мономеров фрагмента NOS1AP(292-390) ускоряет агрегацию мономерного α -синуклеина (Рисунок 31). Также мы отметили, что добавление фрагментов NOS1AP(391-506) увеличивает время lag-фазы в процессе фибриллизации α -синуклеина. В случае совместной инкубации NOS1AP(391-506) и α -синуклеина не наблюдается увеличения скорости. Можно предположить, что взаимодействие двух белков происходит таким образом, что фрагмент NOS1AP(391-506) не препятствует элонгации

фибрилл α -синуклеина, будучи присоединенным к уже образовавшемуся олигомеру или протофиламенту (Рисунок 36).

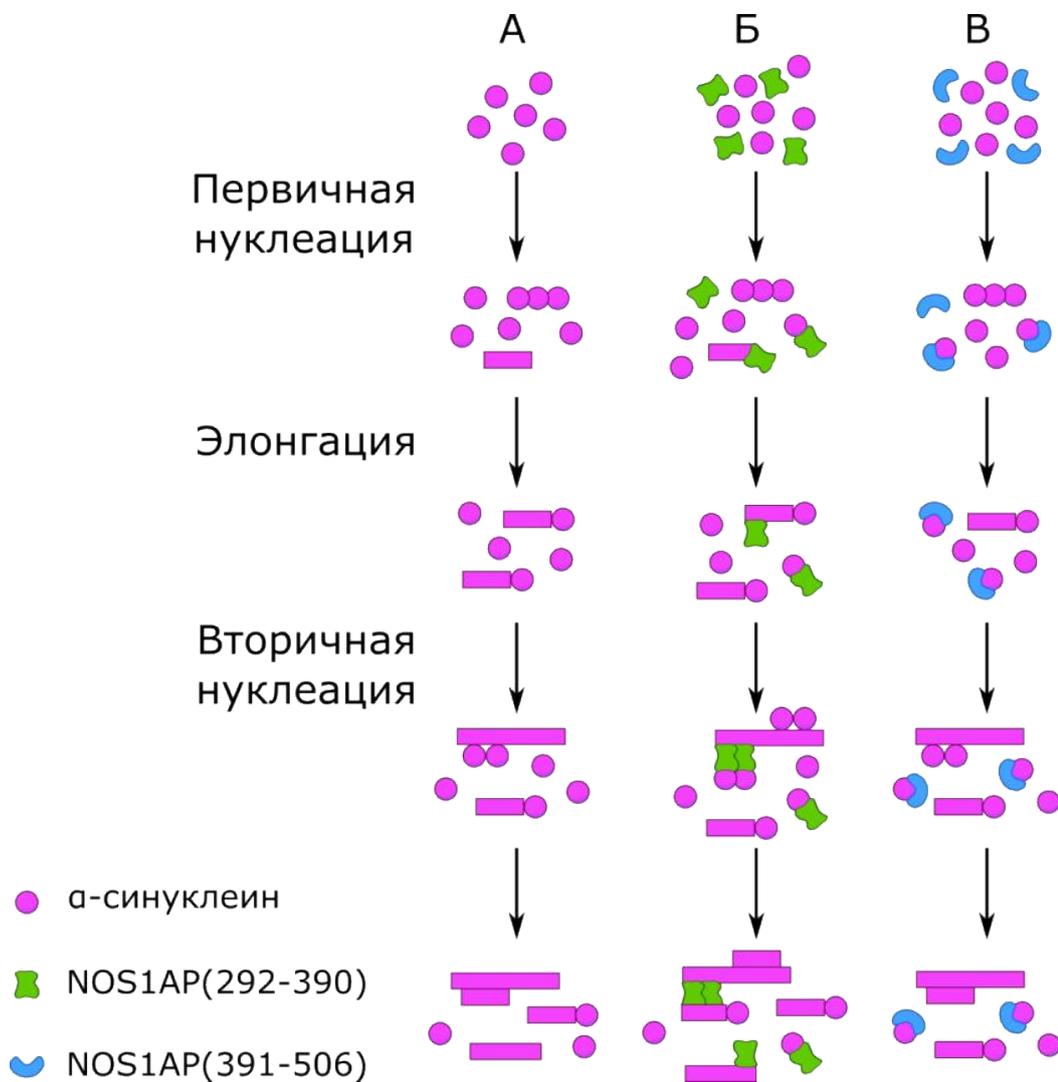


Рисунок 36. Предполагаемая схема коагрегации α -синуклеина и фрагментов NOS1AP. Схема возможного взаимодействия фрагментов NOS1AP(292-390) и NOS1AP(391-506) с α -синуклеином в процессе его амилоидизации. А – процесс образования фибрилл α -синуклеина при его самостоятельной агрегации, который включает такие стадии как первичная нуклеация, элонгация и вторичная нуклеация. Б – процесс образования фибрилл α -синуклеина при добавлении мономеров фрагмента NOS1AP(292-390). В этом случае фрагменты NOS1AP способны связываться с образовавшимися фибриллами, притягивая к ним другие молекулы α -синуклеина, ускоряя тем самым вторичную нуклеацию. В – процесс образования фибрилл α -синуклеина при добавлении мономеров фрагмента NOS1AP(391-506). Согласно этой схеме молекулы фрагмента NOS1AP связывают молекулы α -синуклеина таким образом, что образование олигомеров α -синуклеина затруднено, что может приводить к замедлению первичной нуклеации.

Возможно, что взаимодействие NOS1AP(391-506) и α -синуклеина – это тот случай коагрегации, когда два белка взаимодействуют в мономерном виде, затем один из белков образует агрегаты, а второй – остается специфически с ним связанным (см. обзор [13]). При добавлении же мономеров NOS1AP(292-390) скорость агрегации α -синуклеина увеличивается. Не исключено, что будучи связанным с одной молекулой α -синуклеина, фрагмент NOS1AP(292-390) способен связать еще одну (Рисунок 36, Б). В таком случае, соединенный с фибриллой α -синуклеина белок NOS1AP(292-390) привлекает другие мономеры α -синуклеина, стимулируя таким образом вторичную нуклеацию.

Стоит также отметить, что добавление фрагментов NOS1AP(292-390) и NOS1AP(391-506) приводило к образованию более длинных фибрилл α -синуклеина, нежели в случае самостоятельной агрегации α -синуклеина, что дополнительно может свидетельствовать о взаимодействии исследуемых белков (Рисунок 32). При этом наблюдается некоторое противоречие: при добавлении обоих фрагментов NOS1AP наблюдается увеличение длины фибрилл α -синуклеина, однако ускорение агрегации отмечено только в случае фрагмента NOS1AP(292-390). Можно предположить, что при коагрегации с NOS1AP(292-390) не перекрывается область NAC α -синуклеина, ответственная за его амилоидизацию. При этом, возможно, фрагменты NOS1AP(292-390) дополнительно «притягивают» друг к другу мономеры и олигомеры α -синуклеина, что с одной стороны ускоряет его агрегации, а с другой – способствует стабилизации и формированию более длинных фибрилл (Рисунок 36, Б). В случае с фрагментом NOS1AP(391-506) можно допустить, что его мономеры как раз затрагивают область NAC α -синуклеина, что вероятно, приводит к некоторому увеличению lag-фазы реакции, однако, в дальнейшем фибриллизация α -синуклеина идет без существенных изменений скорости. Можно выдвинуть предположение о том, что фрагмент NOS1AP(391-506) также позволяет «укреплять» фибриллы α -синуклеина, что связано с их большей длиной, нежели в случае самостоятельной агрегации α -синуклеина. Необходимо добавить, что в качестве контроля мы также пробовали добавлять бычий

сывороточный альбумин в роли второго белка (данные не представлены), однако это не влияло на параметры агрегации α -синуклеина.

Полученные нами результаты имеют важное медико-биологическое значение, поскольку α -синуклеин является известным патологическим амилоидом человека, а данные о его физических контактах с другим белком могут указывать на новые механизмы молекулярных процессов, ведущих к развитию синуклеинопатий. С другой стороны, белок NOS1AP связывают с психическими расстройствами, главным образом с шизофренией [23,24]. Так, возможно предположить, что некоторые патологические состояния человека взаимосвязаны, если участники их молекулярных механизмов взаимодействуют. В медицинской практике описаны случаи сосуществования идиопатического паркинсонизма и шизофрении [12]. Кроме того, есть сведения, что у больных расстройствами шизофренического спектра повышен риск развития болезни Паркинсона [368].

Наши данные о взаимодействии и совместной агрегации NOS1AP и α -синуклеина предполагают молекулярный механизм, лежащий в основе сосуществования двух социально значимых патологий: болезни Паркинсона и шизофрении. Повышение локальной концентрации α -синуклеина в агрегатах NOS1AP может способствовать его агрегации и развитию синуклеинопатий (Рисунок 35).

Болезнь Паркинсона и шизофрения это два психоневрологических расстройства, которые представляют собой две крайние точки дофаминергического спектра, где в случае болезни Паркинсона наблюдается дефицит дофамина, а в случае шизофрении – чрезмерная активность дофамина в среднем мозге [364]. Одновременная терапия этих заболеваний осложняется тем, что медикаментозное лечение каждого расстройства оказывает противоположное влияние на уровень дофамина [369]. Эти случаи позволяют предположить, что нигростриарный и мезолимбический дофаминергические пути функционируют независимо, в результате чего у пациентов с шизофренией не обязательно с меньшей вероятностью, чем у других может развиваться идиопатический паркинсонизм с возрастом. Таким образом, можно допустить, что агрегация белка

NOS1AP и/или его коагрегация с α -синуклеином (и, возможно, другими патологическими амилоидами) приводит к дестабилизации работы нейрональной NO-синтазы, и как следствие, нарушению образования NO, результатом чего может стать развитие обширного спектра неврологических и нейродегенеративных заболеваний.

С другой точки зрения, механизм, основанный на модификации α -синуклеина, также может объяснить взаимосвязь болезни Паркинсона и шизофрении. Можно предположить, что повышение продукции NOS1AP приводит к избыточному нитрованию белков клетки. Нитрование является одним из возможных окислительных механизмов, приводящих к образованию олигомеров α -синуклеина за счет дитиозиновых «сшивок» [370]. Нитрированный α -синуклеин обнаруживают в тельцах Леви в образцах головного мозга больных с болезнью Паркинсона [227,371,372]. Например, растворимый α -синуклеин, нитрованный в Tyr39, неэффективно связывается протеазами, что приводит к снижению скорости его деградации, накоплению и образованию фибрилл белка [373]. Таким образом, можно предположить, что сверхпродукция NOS1AP также может приводить к нитрованию α -синуклеина и влиять на его агрегацию (Рисунок 35). В этом случае стоит упомянуть исследование, в котором у мышей сверхэкспрессия *NOS1AP* приводила к значительно более высоким уровням фосфорилированного, олигомеризованного и нерастворимого tau, а также увеличению нитрования тирозина в положении 29 (Tyr29) [25].

Таким образом, в нашей работе мы показали, что белок NOS1AP и его фрагменты образуют агрегаты в клетках млекопитающих. Также нам удалось впервые показать взаимодействие белка NOS1AP, а также его фрагментов с α -синуклеином. Более того, мы продемонстрировали, что мономеры NOS1AP(292-390) способны ускорять агрегацию α -синуклеина.

5. ВЫВОДЫ

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Белок NOS1AP и его фрагменты образуют детергент-устойчивые неамилоидные агрегаты в клетках дрожжей и человека при сверхпродукции.
2. Белок NOS1AP физически взаимодействует и коагрегирует с α -синуклеином в клетках дрожжей и человека при сверхпродукции.
3. Фрагменты NOS1AP влияют на кинетику агрегации α -синуклеина.

6. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Матиив А.Б., Трубицина Н.П., Матвеевко А.Г., Барбитов Ю.А., Журавлева Г.А., Бондарев С.А. Амилоидные и амилоидоподобные агрегаты: многообразие и кризис термина // Биохимия. 2020. Т. 85, № 9. С. 1213–1239.
2. Sergeeva A. V., Galkin A.P. Functional amyloids of eukaryotes: criteria, classification, and biological significance // Curr. Genet. 2020. Vol. 66, № 5. P. 849–866.
3. Rubel M.S., Fedotov S.A., Grizel A. V., Sopova J. V., Malikova O.A., Chernoff Y.O., et al. Functional mammalian amyloids and amyloid-like proteins // Life. 2020. Vol. 10, № 9. P. 156.
4. Sipe J.D., Benson M.D., Buxbaum J.N., Ikeda S., Merlini G., Saraiva M.J.M., et al. Amyloid fibril protein nomenclature: 2012 recommendations from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis // Amyloid. 2012. Vol. 19, № 4. P. 167–170.
5. Ono K., Takahashi R., Ikeda T., Yamada M. Cross-seeding effects of amyloid β -protein and α -synuclein // J. Neurochem. 2012. Vol. 122, № 5. P. 883–890.
6. Hu R., Zhang M., Chen H., Jiang B., Zheng J. Cross-seeding interaction between β -amyloid and human islet amyloid polypeptide // ACS Chem. Neurosci. 2015. Vol. 6, № 10. P. 1759–1768.
7. Chen S.G., Stribinskis V., Rane M.J., Demuth D.R., Gozal E., Roberts A.M., et al. Exposure to the functional bacterial amyloid protein curli enhances alpha-synuclein aggregation in aged Fischer 344 Rats and *Caenorhabditis elegans* // Sci. Rep. 2016. Vol. 6. P. 34477.
8. Laurén J., Gimbel D.A., Nygaard H.B., Gilbert J.W., Strittmatter S.M. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers // Nature. 2009. Vol. 457, № 7233. P. 1128–1132.
9. Rubel A.A., Ryzhova T.A., Antonets K.S., Chernoff Y.O., Galkin A. Identification of PrP sequences essential for the interaction between the PrP polymers and A β peptide in a yeast-based assay // Prion. 2013. Vol. 7, № 6. P.

- 469–476.
10. Ahmed A.B., Znassi N., Château M.-T., Kajava A. V. A structure-based approach to predict predisposition to amyloidosis // *Alzheimers. Dement.* 2015. Vol. 11, № 6. P. 681–690.
 11. Carrel D., Hernandez K., Kwon M., Mau C., Trivedi M.P., Brzustowicz L.M., et al. Nitric oxide synthase 1 adaptor protein, a protein implicated in schizophrenia, controls radial migration of cortical neurons // *Biol. Psychiatry.* 2015. Vol. 77, № 11. P. 969–978.
 12. Winter C., Juckel G., Plotkin M., Niehaus L., Kupsch A. Paranoid schizophrenia and idiopathic Parkinson's disease do coexist: a challenge for clinicians. // *Psychiatry Clin. Neurosci.* 2006. Vol. 60, № 5. P. 639.
 13. Bondarev S.A., Antonets K.S., Kajava A. V, Nizhnikov A.A., Zhouravleva G.A. Protein co-aggregation related to amyloids: methods of investigation, diversity, and classification // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19, № 8. P. 2292.
 14. Bhasne K., Mukhopadhyay S. Formation of heterotypic amyloids: α -synuclein in co-aggregation // *Proteomics.* 2018. Vol. 18, № 21–22. P. e1800059.
 15. Horvath I., Wittung-Stafshede P. Cross-talk between amyloidogenic proteins in type-2 diabetes and Parkinson's disease. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016. Vol. 113, № 44. P. 12473–12477.
 16. Aulić S., Masperone L., Narkiewicz J., Isopi E., Bistaffa E., Ambrosetti E., et al. α -Synuclein amyloids hijack prion protein to gain cell entry, facilitate cell-to-cell spreading and block prion replication // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 10050.
 17. Tsigelny I.F., Crews L., Desplats P., Shaked G.M., Sharikov Y., Mizuno H., et al. Mechanisms of hybrid oligomer formation in the pathogenesis of combined Alzheimer's and Parkinson's diseases. // *PLoS One.* 2008. Vol. 3, № 9. P. e3135.
 18. Giasson B.I., Forman M.S., Higuchi M., Golbe L.I., Graves C.L., Kotzbauer P.T., et al. Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein // *Science.* 2003. Vol. 300, № 5619. P. 636–640.
 19. Yan X., Uronen R.-L., Huttunen H.J. The interaction of α -synuclein and Tau: A molecular conspiracy in neurodegeneration? // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2020. Vol.

99. P. 55–64.
20. Tiwari A.K., Zai C.C., Müller D.J., Kennedy J.L. Genetics in schizophrenia: where are we and what next? // *Dialogues Clin. Neurosci.* 2010. Vol. 12, № 3. P. 289–303.
 21. Farrell M.S., Werge T., Sklar P., Owen M.J., Ophoff R.A., O'Donovan M.C., et al. Evaluating historical candidate genes for schizophrenia // *Mol. Psychiatry.* 2015. Vol. 20, № 5. P. 555–562.
 22. Xu B., Wratten N., Charych E.I., Buyske S., Firestein B.L., Brzustowicz L.M. Increased expression in dorsolateral prefrontal cortex of CAPON in schizophrenia and bipolar disorder // *PLoS Med.* 2005. Vol. 2, № 10. P. e263.
 23. Brzustowicz L.M. *NOS1AP* in schizophrenia // *Curr. Psychiatry Rep.* 2008. Vol. 10, № 2. P. 158–163.
 24. Saygılı A., Erbaş O. Association of *NOS1AP* variants in schizophrenia // *J. Exp. Basic Med. Sci.* 2022. Vol. 3, № 1. P. 84–89.
 25. Hashimoto S., Matsuba Y., Kamano N., Mihira N., Sahara N., Takano J., et al. Tau binding protein CAPON induces tau aggregation and neurodegeneration. // *Nat. Commun.* 2019. Vol. 10, № 1. P. 2394.
 26. Hein M.Y., Hubner N.C., Poser I., Cox J., Nagaraj N., Toyoda Y., et al. A human interactome in three quantitative dimensions organized by stoichiometries and abundances // *Cell.* 2015. Vol. 163, № 3. P. 712–723.
 27. Kyle R.A. Amyloidosis: A convoluted story // *Br. J. Haematol.* 2001. Vol. 114, № 3. P. 529–538.
 28. Tanskanen M. “Amyloid” — Historical Aspects // *Amyloidosis.* InTech, 2013. Vol. 1838. P. 3–24.
 29. Yakupova E.I., Bobyleva L.G., Vikhlyantsev I.M., Bobylev A.G. Congo Red and amyloids: history and relationship // *Biosci. Rep.* 2019. Vol. 39, № 1. P. BSR20181415.
 30. Матиив А.Б., Трубицина Н.П., Матвеев А.Г., Барбитов Ю.А., Журавлева Г.А., Бондарев С.А. Структура и полиморфизм амилоидных и амилоидоподобных агрегатов // *Биохимия.* 2022. Т. 87, № 5. С. 587–602.

31. Iadanza M.G., Jackson M.P., Hewitt E.W., Ranson N.A., Radford S.E. A new era for understanding amyloid structures and disease // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018. Vol. 19, № 12. P. 755–773.
32. Kushnirov V. V., Dergalev A.A., Alexandrov A.I. Proteinase K resistant cores of prions and amyloids. // *Prion.* 2020. Vol. 14, № 1. P. 11–19.
33. Kushnirov V. V., Alexandrov I.M., Mitkevich O. V., Shkundina I.S., Ter-Avanesyan M.D. Purification and analysis of prion and amyloid aggregates // *Methods.* 2006. Vol. 39, № 1. P. 50–55.
34. Dear A.J., Michaels T.C.T., Meisl G., Klenerman D., Wu S., Perrett S., et al. Kinetic diversity of amyloid oligomers // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2020. Vol. 117, № 22. P. 12087–12094.
35. Prusiner S.B. Prions and neurodegenerative diseases. // *N. Engl. J. Med.* 1987. Vol. 317, № 25. P. 1571–1581.
36. Sivanathan V., Hochschild A. A bacterial export system for generating extracellular amyloid aggregates. // *Nat. Protoc.* 2013. Vol. 8, № 7. P. 1381–1390.
37. Benson M.D., Buxbaum J.N., Eisenberg D.S., Merlini G., Saraiva M.J.M., Sekijima Y., et al. Amyloid nomenclature 2018: recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee // *Amyloid.* 2018. Vol. 25, № 4. P. 215–219.
38. Brundin P., Melki R., Kopito R. Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010. Vol. 11, № 4. P. 301–307.
39. Chiti F., Dobson C.M. Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: a summary of progress over the last decade // *Annu. Rev. Biochem.* 2017. Vol. 86, № 1. P. 27–68.
40. Knowles T.P.J., Vendruscolo M., Dobson C.M. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014. Vol. 15, № 6. P. 384–396.
41. Pepys M.B. Amyloidosis // *Annu. Rev. Med.* 2006. Vol. 57, № 1. P. 223–241.
42. Chiti F., Dobson C.M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease.

- // *Annu. Rev. Biochem.* 2006. Vol. 75. P. 333–366.
43. Sugi M.D., Kawashima A., Salomao M.A., Bhalla S., Venkatesh S.K., Pickhardt P.J. Amyloidosis: multisystem spectrum of disease with pathologic correlation // *Radiographics.* 2021. Vol. 41, № 5. P. 1454–1474.
 44. Milani P., Merlini G., Palladini G. Light chain amyloidosis // *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 2018. Vol. 10, № 1. P. e2018022.
 45. Merlini G., Dispenzieri A., Santhorawala V., Schönland S.O., Palladini G., Hawkins P.N., et al. Systemic immunoglobulin light chain amyloidosis // *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2018. Vol. 4, № 1. P. 38.
 46. Nasr S.H., Said S.M., Valeri A.M., Sethi S., Fidler M.E., Cornell L.D., et al. The diagnosis and characteristics of renal heavy-chain and heavy/light-chain amyloidosis and their comparison with renal light-chain amyloidosis // *Kidney Int.* 2013. Vol. 83, № 3. P. 463–470.
 47. Ando Y., Coelho T., Berk J.L., Cruz M.W., Ericzon B.-G., Ikeda S., et al. Guideline of transthyretin-related hereditary amyloidosis for clinicians // *Orphanet J. Rare Dis.* 2013. Vol. 8, № 1. P. 31.
 48. Lu J., Yu Y., Zhu I., Cheng Y., Sun P.D. Structural mechanism of serum amyloid A-mediated inflammatory amyloidosis // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2014. Vol. 111, № 14. P. 5189–5194.
 49. Morris A.D., Smith R.N., Stone J.R. The pathology and changing epidemiology of dialysis-related cardiac beta-2 microglobulin amyloidosis // *Cardiovasc. Pathol.* 2019. Vol. 42. P. 30–35.
 50. Eriksson M., Schönland S., Yumlu S., Hegenbart U., von Hutten H., Gioeva Z., et al. Hereditary apolipoprotein AI-associated amyloidosis in surgical pathology specimens // *J. Mol. Diagnostics.* 2009. Vol. 11, № 3. P. 257–262.
 51. Swidan K.H., Sweed M.S., Abbas A.M., Jewi M.K. Serum amyloid A in preeclampsia // *QJM An Int. J. Med.* 2020. Vol. 113, № Supplement_1.
 52. Gerasimova E.M., Fedotov S.A., Kachkin D. V., Vashukova E.S., Glotov A.S., Chernoff Y.O., et al. Protein misfolding during pregnancy: new approaches to preeclampsia diagnostics // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, № 24. P. 6183.

53. Srinivasan R., Jones E.M., Liu K., Ghiso J., Marchant R.E., Zagorski M.G. pH-dependent amyloid and protofibril formation by the ABri peptide of familial British dementia // *J. Mol. Biol.* 2003. Vol. 333, № 5. P. 1003–1023.
54. Ghiso J.A., Holton J., Miravalle L., Calero M., Lashley T., Vidal R., et al. Systemic amyloid deposits in familial British dementia // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 47. P. 43909–43914.
55. Coomaraswamy J., Kilger E., Wölfing H., Schäfer C., Kaeser S.A., Wegenast-Braun B.M., et al. Modeling familial Danish dementia in mice supports the concept of the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010. Vol. 107, № 17. P. 7969–7974.
56. Vidal R., Revesz T., Rostagno A., Kim E., Holton J.L., Bek T., et al. A decamer duplication in the 3' region of the *BRI* gene originates an amyloid peptide that is associated with dementia in a Danish kindred // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000. Vol. 97, № 9. P. 4920–4925.
57. Davies H.A., Wilkinson M.C., Gibson R.P., Middleton D.A. Expression and purification of the aortic amyloid polypeptide medin // *Protein Expr. Purif.* 2014. Vol. 98. P. 32–37.
58. Khurana R., Agarwal A., Bajpai V.K., Verma N., Sharma A.K., Gupta R.P., et al. Unraveling the amyloid associated with human medullary thyroid carcinoma // *Endocrinology.* 2004. Vol. 145, № 12. P. 5465–5470.
59. Pedrote M.M., Motta M.F., Ferretti G.D.S., Norberto D.R., Spohr T.C.L.S., Lima F.R.S., et al. Oncogenic gain of function in glioblastoma is linked to mutant p53 amyloid oligomers // *iScience.* 2020. Vol. 23, № 2. P. 100820.
60. Levine S.N., Ishaq S., Nanda A., Wilson J.D., Gonzalez-Toledo E. Occurrence of extensive spherical amyloid deposits in a prolactin-secreting pituitary macroadenoma: a radiologic-pathologic correlation // *Ann. Diagn. Pathol.* 2013. Vol. 17, № 4. P. 361–366.
61. Chuang E., Hori A.M., Hesketh C.D., Shorter J. Amyloid assembly and disassembly // *J. Cell Sci.* 2018. Vol. 131, № 8. P. jcs189928.
62. Millucci L., Ghezzi L., Bernardini G., Braconi D., Tanganelli P., Santucci A.

- Prevalence of isolated atrial amyloidosis in young patients affected by congestive heart failure // *Sci. World J.* 2012. Vol. 2012. P. 1–8.
63. Linke R.P., Joswig R., Murphy C.L., Wang S., Zhou H., Gross U., et al. Senile seminal vesicle amyloid is derived from semenogelin I // *J. Lab. Clin. Med.* 2005. Vol. 145, № 4. P. 187–193.
 64. Yanamandra K., Alexeyev O., Zamotin V., Srivastava V., Shchukarev A., Brorsson A.-C., et al. Amyloid formation by the pro-inflammatory S100A8/A9 proteins in the ageing prostate // *PLoS One* / ed. Gazit E. 2009. Vol. 4, № 5. P. e5562.
 65. Caubet C., Bousset L., Clemmensen O., Sourigues Y., Bygum A., Chavanas S., et al. A new amyloidosis caused by fibrillar aggregates of mutated corneodesmosin // *FASEB J.* 2010. Vol. 24, № 9. P. 3416–3426.
 66. Miura Y., Harumiya S., Ono K., Fujimoto E., Akiyama M., Fujii N., et al. Galectin-7 and actin are components of amyloid deposit of localized cutaneous amyloidosis // *Exp. Dermatol.* 2013. Vol. 22, № 1. P. 36–40.
 67. Inoue K., Takahashf M., Hamamoto Y., Muto M., Ishihara T. An immunohistochemical study of cytokeratins in skin-limited amyloidosis // *Amyloid.* 2000. Vol. 7, № 4. P. 259–265.
 68. Ozawa D., Kaji Y., Yagi H., Sakurai K., Kawakami T., Naiki H., et al. Destruction of amyloid fibrils of keratoepithelin peptides by laser irradiation coupled with amyloid-specific thioflavin T // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286, № 12. P. 10856–10863.
 69. Ando Y., Nakamura M., Kai H., Katsuragi S., Terazaki H., Nozawa T., et al. A novel localized amyloidosis associated with lactoferrin in the cornea // *Lab. Investig.* 2002. Vol. 82, № 6. P. 757–766.
 70. Gupta Y., Singla G., Singla R. Insulin-derived amyloidosis // *Indian J. Endocrinol. Metab.* 2015. Vol. 19, № 1. P. 174.
 71. D'Souza A., Theis J.D., Vrana J.A., Dogan A. Pharmaceutical amyloidosis associated with subcutaneous insulin and enfuvirtide administration // *Amyloid.* 2014. Vol. 21, № 2. P. 71–75.

72. Chen G., Xu T., Yan Y., Zhou Y., Jiang Y., Melcher K., et al. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development // *Acta Pharmacol. Sin.* 2017. Vol. 38, № 9. P. 1205–1235.
73. Murphy M.P., LeVine H. Alzheimer's disease and the amyloid- β peptide // *J. Alzheimer's Dis.* / ed. Lovell M.A. 2010. Vol. 19, № 1. P. 311–323.
74. Qiang W., Yau W.-M., Lu J.-X., Collinge J., Tycko R. Structural variation in amyloid- β fibrils from Alzheimer's disease clinical subtypes // *Nature*. 2017. Vol. 541, № 7636. P. 217–221.
75. Giasson B.I., Lee V.M.-Y., Trojanowski J.Q. Interactions of Amyloidogenic Proteins // *NeuroMolecular Med.* 2003. Vol. 4, № 1–2. P. 49–58.
76. Lim S., Haque M.M., Kim D., Kim D.J., Kim Y.K. Cell-based models to investigate tau aggregation // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2014. Vol. 12, № 20–21. P. 7–13.
77. Kim W.S., Kågedal K., Halliday G.M. Alpha-synuclein biology in Lewy body diseases. // *Alzheimers. Res. Ther.* 2014. Vol. 6, № 5. P. 73.
78. Goedert M., Jakes R., Spillantini M.G. The Synucleinopathies: Twenty Years On. // *J. Parkinsons. Dis.* 2017. Vol. 7, № s1. P. S51–S69.
79. La Spada A.R., Weydt P., Pineda V. V. Huntington's disease pathogenesis: mechanisms and pathways // *Neurobiology of Huntington's Disease: Applications to Drug Discovery*. CRC Press/Taylor & Francis, 2011.
80. Wetzel R. Exploding the repeat length paradigm while exploring amyloid toxicity in Huntington's disease // *Acc. Chem. Res.* 2020. Vol. 53, № 10. P. 2347–2357.
81. van der Burg J.M.M., Björkqvist M., Brundin P. Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease // *Lancet. Neurol.* 2009. Vol. 8, № 8. P. 765–774.
82. Rubinsztein D.C., Carmichael J. Huntington's disease: molecular basis of neurodegeneration. // *Expert Rev. Mol. Med.* 2003. Vol. 5, № 20. P. 1–21.
83. DeArmond S.J., Prusiner S.B. Prion protein transgenes and the neuropathology in prion diseases // *Brain Pathol.* 1995. Vol. 5, № 1. P. 77–89.
84. Mead S., Reilly M.M. A new prion disease: relationship with central and

- peripheral amyloidoses // Nat. Rev. Neurol. 2015. Vol. 11, № 2. P. 90–97.
85. Pansarasa O., Bordoni M., Diamanti L., Sproviero D., Gagliardi S., Cereda C. SOD1 in amyotrophic lateral sclerosis: “ambivalent” behavior connected to the disease // Int. J. Mol. Sci. 2018. Vol. 19, № 5. P. 1345.
 86. Kalebina T.S., Plotnikova T.A., Gorkovskii A.A., Selyakh I.O., Galzitskaya O. V, Bezsonov E.E., et al. Amyloid-like properties of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall glucantransferase Bgl2p: prediction and experimental evidences // Prion. 2008. Vol. 2, № 2. P. 91–96.
 87. Dragoš A., Kovács Á.T., Claessen D. The role of functional amyloids in multicellular growth and development of gram-positive bacteria. // Biomolecules. 2017. Vol. 7, № 3. P. 60.
 88. Shewmaker F., McGlinchey R.P., Wickner R.B. Structural insights into functional and pathological amyloid // J. Biol. Chem. 2011. Vol. 286, № 19. P. 16533–16540.
 89. Valsecchi I., Dupres V., Stephen-Victor E., Guijarro J.I., Gibbons J., Beau R., et al. Role of Hydrophobins in *Aspergillus fumigatus* // J. fungi (Basel, Switzerland). 2017. Vol. 4, № 1. P. 2.
 90. Pham C.L.L., Rey A., Lo V., Soulès M., Ren Q., Meisl G., et al. Self-assembly of MPG1, a hydrophobin protein from the rice blast fungus that forms functional amyloid coatings, occurs by a surface-driven mechanism. // Sci. Rep. 2016. Vol. 6. P. 25288.
 91. Lo V.C., Ren Q., Pham C.L.L., Morris V.K., Kwan A.H., Sunde M. Fungal hydrophobin proteins produce self-assembling protein films with diverse structure and chemical stability // Nanomater. (Basel, Switzerland). 2014. Vol. 4, № 3. P. 827–843.
 92. Morris V.K., Ren Q., Macindoe I., Kwan A.H., Byrne N., Sunde M. Recruitment of class I hydrophobins to the air:water interface initiates a multi-step process of functional amyloid formation // J. Biol. Chem. 2011. Vol. 286, № 18. P. 15955–15963.
 93. Rauceo J.M., Gaur N.K., Lee K.-G., Edwards J.E., Klotz S.A., Lipke P.N. Global

- cell surface conformational shift mediated by a *Candida albicans* adhesin // *Infect. Immun.* 2004. Vol. 72, № 9. P. 4948–4955.
94. Otoo H.N., Lee K.G., Qiu W., Lipke P.N. *Candida albicans* Als adhesins have conserved amyloid-forming sequences // *Eukaryot. Cell.* 2008. Vol. 7, № 5. P. 776–782.
95. Dueholm M.S., Albertsen M., Otzen D., Nielsen P.H. Curli functional amyloid systems are phylogenetically widespread and display large diversity in operon and protein structure // *PLoS One.* 2012. Vol. 7, № 12. P. e51274.
96. Blanco L.P., Evans M.L., Smith D.R., Badtke M.P., Chapman M.R. Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids // *Trends Microbiol.* 2012. Vol. 20, № 2. P. 66–73.
97. Taglialegna A., Navarro S., Ventura S., Garnett J.A., Matthews S., Penades J.R., et al. Staphylococcal Bap proteins build amyloid scaffold biofilm matrices in response to environmental signals // *PLoS Pathog.* 2016. Vol. 12, № 6. P. e1005711.
98. Alteri C.J., Xicohténcatl-Cortes J., Hess S., Caballero-Olín G., Girón J.A., Friedman R.L. *Mycobacterium tuberculosis* produces pili during human infection // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007. Vol. 104, № 12. P. 5145–5150.
99. Besingi R.N., Wenderska I.B., Senadheera D.B., Cvitkovitch D.G., Long J.R., Wen Z.T., et al. Functional amyloids in *Streptococcus mutans*, their use as targets of biofilm inhibition and initial characterization of SMU_63c // *Microbiology.* 2017. Vol. 163, № 4. P. 488–501.
100. Collinson S.K., Emödy L., Müller K.H., Trust T.J., Kay W.W. Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella enteritidis* // *J. Bacteriol.* 1991. Vol. 173, № 15. P. 4773–4781.
101. Doran J.L., Collinson S.K., Burian J., Sarlós G., Todd E.C., Munro C.K., et al. DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* species targeting *agfA*, the structural gene for thin, aggregative fimbriae // *J. Clin. Microbiol.* 1993. Vol. 31, № 9. P. 2263–2273.
102. Wang Y., Jiang J., Gao Y., Sun Y., Dai J., Wu Y., et al. *Staphylococcus*

- epidermidis* small basic protein (Sbp) forms amyloid fibrils, consistent with its function as a scaffolding protein in biofilms // *J. Biol. Chem.* 2018. Vol. 293, № 37. P. 14296–14311.
103. Ling S., Li C., Adamcik J., Shao Z., Chen X., Mezzenga R. Modulating materials by orthogonally oriented β -strands: composites of amyloid and silk fibroin fibrils // *Adv. Mater.* 2014. Vol. 26, № 26. P. 4569–4574.
104. Humenik M., Smith A.M., Arndt S., Scheibel T. Ion and seed dependent fibril assembly of a spidroin core domain // *J. Struct. Biol.* 2015. Vol. 191, № 2. P. 130–138.
105. Berthelot K., Lecomte S., Estevez Y., Couлары-Salin B., Peruch F. Homologous *Hevea brasiliensis* REF (Hevb1) and SRPP (Hevb3) present different auto-assembling // *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 2014. Vol. 1844, № 2. P. 473–485.
106. Berthelot K., Lecomte S., Estevez Y., Couлары-Salin B., Bentaleb A., Cullin C., et al. Rubber elongation factor (REF), a major allergen component in *Hevea brasiliensis* latex has amyloid properties // *PLoS One.* 2012. Vol. 7, № 10. P. e48065.
107. Li J., McQuade T., Siemer A.B., Napetschnig J., Moriwaki K., Hsiao Y.-S., et al. The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis // *Cell.* 2012. Vol. 150, № 2. P. 339–350.
108. Wu X.-N., Yang Z.-H., Wang X.-K., Zhang Y., Wan H., Song Y., et al. Distinct roles of RIP1-RIP3 hetero- and RIP3-RIP3 homo-interaction in mediating necroptosis // *Cell Death Differ.* 2014. Vol. 21, № 11. P. 1709–1720.
109. Kajava A. V, Klopffleisch K., Chen S., Hofmann K. Evolutionary link between metazoan RHIM motif and prion-forming domain of fungal heterokaryon incompatibility factor HET-s/HET-s // *Sci. Rep.* 2014. Vol. 4. P. 7436.
110. Saupe S.J. Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous ascomycetes. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000. Vol. 64, № 3. P. 489–502.
111. Seuring C., Greenwald J., Wasmer C., Wepf R., Saupe S.J., Meier B.H., et al. The mechanism of toxicity in HET-S/HET-s prion incompatibility. // *PLoS Biol.* 2012.

- Vol. 10, № 12. P. e1001451.
112. Loquet A., Saupe S.J. Diversity of amyloid motifs in NLR signaling in fungi // *Biomolecules*. 2017. Vol. 7, № 2. P. 38.
 113. Daskalov A., Habenstein B., Sabaté R., Berbon M., Martinez D., Chaignepain S., et al. Identification of a novel cell death-inducing domain reveals that fungal amyloid-controlled programmed cell death is related to necroptosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016. Vol. 113, № 10. P. 2720–2725.
 114. Kleino A., Ramia N.F., Bozkurt G., Shen Y., Nailwal H., Huang J., et al. Peptidoglycan-sensing receptors trigger the formation of functional amyloids of the adaptor protein Imd to initiate *Drosophila* NF- κ B signaling // *Immunity*. 2017. Vol. 47, № 4. P. 635-647.e6.
 115. Gonçalves A.P., Heller J., Daskalov A., Videira A., Glass N.L. Regulated forms of cell death in fungi // *Front. Microbiol.* 2017. Vol. 8. P. 1837.
 116. Hafner-Bratkovič I. Prions, prionoid complexes and amyloids: the bad, the good and something in between. // *Swiss Med. Wkly.* 2017. Vol. 147, № 1516. P. w14424.
 117. Mojsoska B., Jenssen H. Peptides and peptidomimetics for antimicrobial drug design // *Pharmaceuticals (Basel)*. 2015. Vol. 8, № 3. P. 366–415.
 118. Sood R., Domanov Y., Pietiäinen M., Kontinen V.P., Kinnunen P.K.J. Binding of LL-37 to model biomembranes: insight into target vs host cell recognition // *Biochim. Biophys. Acta*. 2008. Vol. 1778, № 4. P. 983–996.
 119. Engelberg Y., Landau M. The Human LL-37(17-29) antimicrobial peptide reveals a functional supramolecular structure // *Nat. Commun.* 2020. Vol. 11, № 1. P. 3894.
 120. Auvynet C., El Amri C., Lacombe C., Bruston F., Bourdais J., Nicolas P., et al. Structural requirements for antimicrobial versus chemoattractant activities for dermaseptin S9 // *FEBS J.* 2008. Vol. 275, № 16. P. 4134–4151.
 121. Caillon L., Killian J.A., Lequin O., Khemtémourian L. Biophysical investigation of the membrane-disrupting mechanism of the antimicrobial and amyloid-like peptide dermaseptin S9 // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, № 10. P. e75528.

122. Gössler-Schöfberger R., Hesser G., Muik M., Wechselberger C., Jilek A. An orphan dermaseptin from frog skin reversibly assembles to amyloid-like aggregates in a pH-dependent fashion // FEBS J. 2009. Vol. 276, № 20. P. 5849–5859.
123. Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1987. Vol. 84, № 15. P. 5449–5453.
124. Zasloff M., Martin B., Chen H.C. Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1988. Vol. 85, № 3. P. 910–913.
125. Cruciani R.A., Barker J.L., Zasloff M., Chen H.C., Colamonici O. Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1991. Vol. 88, № 9. P. 3792–3796.
126. Baker M.A., Maloy W.L., Zasloff M., Jacob L.S. Anticancer efficacy of Magainin2 and analogue peptides // Cancer Res. 1993. Vol. 53, № 13. P. 3052–3057.
127. Ludtke S., He K., Huang H. Membrane thinning caused by magainin 2 // Biochemistry. 1995. Vol. 34, № 51. P. 16764–16769.
128. Jang H., Arce F.T., Mustata M., Ramachandran S., Capone R., Nussinov R., et al. Antimicrobial protegrin-1 forms amyloid-like fibrils with rapid kinetics suggesting a functional link // Biophys. J. 2011. Vol. 100, № 7. P. 1775–1783.
129. Gour S., Kumar V., Singh A., Gadhawe K., Goyal P., Pandey J., et al. Mammalian antimicrobial peptide protegrin-4 self assembles and forms amyloid-like aggregates: Assessment of its functional relevance. // J. Pept. Sci. 2019. Vol. 25, № 3. P. e3151.
130. Bieler S., Estrada L., Lagos R., Baeza M., Castilla J., Soto C. Amyloid formation modulates the biological activity of a bacterial protein // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280, № 29. P. 26880–26885.
131. Tayeb-Fligelman E., Tabachnikov O., Moshe A., Goldshmidt-Tran O., Sawaya M.R., Coquelle N., et al. The cytotoxic *Staphylococcus aureus* PSMa3 reveals a

- cross- α amyloid-like fibril // *Science*. 2017. Vol. 355, № 6327. P. 831–833.
132. Chu H., Pazgier M., Jung G., Nuccio S.-P., Castillo P.A., de Jong M.F., et al. Human α -defensin 6 promotes mucosal innate immunity through self-assembled peptide nanonets // *Science*. 2012. Vol. 337, № 6093. P. 477–481.
133. Gour S., Kaushik V., Kumar V., Bhat P., Yadav S.C., Yadav J.K. Antimicrobial peptide (Cn-AMP2) from liquid endosperm of *Cocos nucifera* forms amyloid-like fibrillar structure // *J. Pept. Sci.* 2016. Vol. 22, № 4. P. 201–207.
134. Wang G. Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283, № 47. P. 32637–32643.
135. Fahrner R.L., Dieckmann T., Harwig S.S., Lehrer R.I., Eisenberg D., Feigon J. Solution structure of protegrin-1, a broad-spectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes // *Chem. Biol.* 1996. Vol. 3, № 7. P. 543–550.
136. De Felice F.G., Vieira M.N.N., Meirelles M.N.L., Morozova-Roche L.A., Dobson C.M., Ferreira S.T. Formation of amyloid aggregates from human lysozyme and its disease-associated variants using hydrostatic pressure // *FASEB J.* 2004. Vol. 18, № 10. P. 1099–1101.
137. Majumdar A., Cesario W.C., White-Grindley E., Jiang H., Ren F., Khan M.R., et al. Critical role of amyloid-like oligomers of *Drosophila* Orb2 in the persistence of memory // *Cell*. 2012. Vol. 148, № 3. P. 515–529.
138. Si K., Choi Y.-B., White-Grindley E., Majumdar A., Kandel E.R. *Aplysia* CPEB can form prion-like multimers in sensory neurons that contribute to long-term facilitation // *Cell*. 2010. Vol. 140, № 3. P. 421–435.
139. Stephan J.S., Fioriti L., Lamba N., Colnaghi L., Karl K., Derkatch I.L., et al. The CPEB3 protein is a functional prion that interacts with the actin cytoskeleton // *Cell Rep.* 2015. Vol. 11, № 11. P. 1772–1785.
140. Heinrich S.U., Lindquist S. Protein-only mechanism induces self-perpetuating changes in the activity of neuronal *Aplysia* cytoplasmic polyadenylation element binding protein (CPEB). // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011. Vol. 108, № 7. P. 2999–3004.

141. Hervas R., Rau M.J., Park Y., Zhang W., Murzin A.G., Fitzpatrick J.A.J., et al. Cryo-EM structure of a neuronal functional amyloid implicated in memory persistence in *Drosophila* // *Science* (80-.). 2020. Vol. 367, № 6483. P. 1230–1234.
142. Sopova J. V, Koshel E.I., Belashova T.A., Zadorsky S.P., Sergeeva A. V, Siniukova V.A., et al. RNA-binding protein FXR1 is presented in rat brain in amyloid form // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9, № 1. P. 18983.
143. Caudron F., Barral Y. A super-assembly of Whi3 encodes memory of deceptive encounters by single cells during yeast courtship // *Cell.* 2013. Vol. 155, № 6. P. 1244–1257.
144. Whelly S., Johnson S., Powell J., Borchardt C., Hastert M.C., Cornwall G.A. Nonpathological extracellular amyloid is present during normal epididymal sperm maturation. // *PLoS One.* 2012. Vol. 7, № 5. P. e36394.
145. Do H.Q., Hewetson A., Myers C., Khan N.H., Hastert M.C., M Harsini F., et al. The functional mammalian CRES (Cystatin-Related Epididymal Spermatogenic) amyloid is antiparallel β -sheet rich and forms a metastable oligomer during assembly // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9, № 1. P. 9210.
146. Whelly S., Muthusubramanian A., Powell J., Johnson S., Hastert M.C., Cornwall G.A. Cystatin-related epididymal spermatogenic subgroup members are part of an amyloid matrix and associated with extracellular vesicles in the mouse epididymal lumen. // *Mol. Hum. Reprod.* 2016. Vol. 22, № 11. P. 729–744.
147. Wahlbom M., Wang X., Lindström V., Carlemalm E., Jaskolski M., Grubb A. Fibrillogenic oligomers of human cystatin C are formed by propagated domain swapping // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282, № 25. P. 18318–18326.
148. Münch J., Rücker E., Ständker L., Adermann K., Goffinet C., Schindler M., et al. Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection // *Cell.* 2007. Vol. 131, № 6. P. 1059–1071.
149. Roan N.R., Müller J.A., Liu H., Chu S., Arnold F., Stürzel C.M., et al. Peptides released by physiological cleavage of semen coagulum proteins form amyloids that enhance HIV infection // *Cell Host Microbe.* 2011. Vol. 10, № 6. P. 541–550.

150. Sharma N., Vishwanath S., K. Patel B. Recombinant human semenogelin-1 (Sg1) and sg1 (1-159) form detergent stable amyloid like aggregates *in vitro* // Protein Pept. Lett. 2015. Vol. 23, № 1. P. 87–96.
151. Boke E., Ruer M., Wühr M., Coughlin M., Lemaitre R., Gygi S.P., et al. Amyloid-like self-assembly of a cellular compartment // Cell. 2016. Vol. 166, № 3. P. 637–650.
152. Iconomidou V.A., Vriend G., Hamodrakas S.J. Amyloids protect the silkworm oocyte and embryo // FEBS Lett. 2000. Vol. 479, № 3. P. 141–145.
153. Iconomidou V.A., Chryssikos G.D., Gionis V., Vriend G., Hoenger A., Hamodrakas S.J. Amyloid-like fibrils from an 18-residue peptide analogue of a part of the central domain of the B-family of silkworm chorion proteins // FEBS Lett. 2001. Vol. 499, № 3. P. 268–273.
154. Iconomidou V.A., Chryssikos G.D., Gionis V., Galanis A.S., Cordopatis P., Hoenger A., et al. Amyloid fibril formation propensity is inherent into the hexapeptide tandemly repeating sequence of the central domain of silkworm chorion proteins of the A-family // J. Struct. Biol. 2006. Vol. 156, № 3. P. 480–488.
155. Louros N.N., Petronikolou N., Karamanos T., Cordopatis P., Iconomidou V.A., Hamodrakas S.J. Structural studies of “aggregation-prone” peptide-analogues of teleostean egg chorion ZPB proteins. // Biopolymers. 2014. Vol. 102, № 6. P. 427–436.
156. Egge N., Muthusubramanian A., Cornwall G.A. Amyloid properties of the mouse egg zona pellucida // PLoS One. 2015. Vol. 10, № 6. P. e0129907.
157. Louros N.N., Chrysina E.D., Baltatzis G.E., Patsouris E.S., Hamodrakas S.J., Iconomidou V.A. A common “aggregation-prone” interface possibly participates in the self-assembly of human zona pellucida proteins // FEBS Lett. 2016. Vol. 590, № 5. P. 619–630.
158. Siniukova V.A., Sopova J. V, Galkina S.A., Galkin A.P. Search for functional amyloid structures in chicken and fruit fly female reproductive cells. // Prion. 2020. Vol. 14, № 1. P. 278–282.

159. Carpenter K., Bell R.B., Yunus J., Amon A., Berchowitz L.E. Phosphorylation-mediated clearance of amyloid-like assemblies in meiosis. // *Dev. Cell*. 2018. Vol. 45, № 3. P. 392-405.e6.
160. Fowler D.M., Koulov A. V, Alory-Jost C., Marks M.S., Balch W.E., Kelly J.W. Functional amyloid aormation within mammalian tissue // *PLoS Biol.* / ed. Weissman J. 2006. Vol. 4, № 1. P. e6.
161. Hoashi T., Muller J., Vieira W.D., Rouzaud F., Kikuchi K., Tamaki K., et al. The repeat domain of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 is required for the formation of organellar fibers // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, № 30. P. 21198–21208.
162. Watt B., van Niel G., Fowler D.M., Hurbain I., Luk K.C., Stayrook S.E., et al. N-terminal domains elicit formation of functional Pmel17 amyloid fibrils // *J. Biol. Chem.* 2009. Vol. 284, № 51. P. 35543–35555.
163. McGlinchey R.P., Shewmaker F., McPhie P., Monterroso B., Thurber K., Wickner R.B. The repeat domain of the melanosome fibril protein Pmel17 forms the amyloid core promoting melanin synthesis // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009. Vol. 106, № 33. P. 13731–13736.
164. Leonhardt R.M., Vigneron N., Hee J.S., Graham M., Cresswell P. Critical residues in the PMEL/Pmel17 N-terminus direct the hierarchical assembly of melanosomal fibrils // *Mol. Biol. Cell* / ed. Chernoff J. 2013. Vol. 24, № 7. P. 964–981.
165. Maji S.K., Perrin M.H., Sawaya M.R., Jessberger S., Vadodaria K., Rissman R.A., et al. Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules // *Science*. 2009. Vol. 325, № 5938. P. 328–332.
166. Onoue S., Ohshima K., Debari K., Koh K., Shioda S., Iwasa S., et al. Mishandling of the therapeutic peptide glucagon generates cytotoxic amyloidogenic fibrils // *Pharm. Res.* 2004. Vol. 21, № 7. P. 1274–1283.
167. Gul S., Bahadir B., Dusak A., Kalayci M., Edebalı N., Acikgoz B. Spherical amyloid deposition in a prolactin-producing pituitary adenoma // *Neuropathology*. 2009. Vol. 29, № 1. P. 81–84.
168. Wickner R.B., Edskes H.K., Kryndushkin D., McGlinchey R., Bateman D., Kelly

- A. Prion diseases of yeast: amyloid structure and biology // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2011. Vol. 22, № 5. P. 469–475.
169. Newby G.A., Lindquist S. Blessings in disguise: biological benefits of prion-like mechanisms // *Trends Cell Biol.* 2013. Vol. 23, № 6. P. 251–259.
170. Gomes E., Shorter J. The molecular language of membraneless organelles. // *J. Biol. Chem.* 2019. Vol. 294, № 18. P. 7115–7127.
171. Mitrea D.M., Kriwacki R.W. Phase separation in biology; functional organization of a higher order. // *Cell Commun. Signal.* 2016. Vol. 14. P. 1.
172. Audas T.E., Audas D.E., Jacob M.D., Ho J.J.D., Khacho M., Wang M., et al. Adaptation to stressors by systemic protein amyloidogenesis // *Dev. Cell.* 2016. Vol. 39, № 2. P. 155–168.
173. Uversky V.N., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Zaslavsky B. Intrinsically disordered proteins as crucial constituents of cellular aqueous two phase systems and coacervates. // *FEBS Lett.* 2015. Vol. 589, № 1. P. 15–22.
174. Uversky V.N. Protein intrinsic disorder-based liquid-liquid phase transitions in biological systems: Complex coacervates and membrane-less organelles. // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2017. Vol. 239. P. 97–114.
175. Uversky V.N. Supramolecular fuzziness of intracellular liquid droplets: liquid-liquid phase transitions, membrane-less organelles, and intrinsic disorder // *Molecules.* 2019. Vol. 24, № 18. P. 3265.
176. Turoverov K.K., Kuznetsova I.M., Fonin A. V, Darling A.L., Zaslavsky B.Y., Uversky V.N. Stochasticity of biological soft matter: emerging concepts in intrinsically disordered proteins and biological phase separation // *Trends Biochem. Sci.* 2019. Vol. 44, № 8. P. 716–728.
177. Darling A.L., Liu Y., Oldfield C.J., Uversky V.N. Intrinsically disordered proteome of human membrane-less organelles // *Proteomics.* 2018. Vol. 18, № 5–6. P. e1700193.
178. Uversky V.N. Intrinsically disordered proteins in overcrowded milieu: Membrane-less organelles, phase separation, and intrinsic disorder. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2017. Vol. 44. P. 18–30.

179. Babinchak W.M., Surewicz W.K. Liquid-liquid phase separation and its mechanistic role in pathological protein aggregation // *J. Mol. Biol.* 2020. Vol. 432, № 7. P. 1910–1925.
180. Darling A.L., Zaslavsky B.Y., Uversky V.N. Intrinsic disorder-based emergence in cellular biology: physiological and pathological liquid-liquid phase transitions in cells // *Polymers (Basel)*. 2019. Vol. 11, № 6. P. 990.
181. de Oliveira G.A.P., Cordeiro Y., Silva J.L., Vieira T.C.R.G. Liquid-liquid phase transitions and amyloid aggregation in proteins related to cancer and neurodegenerative diseases // *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 2019. Vol. 118. P. 289–331.
182. Kato M., Han T.W., Xie S., Shi K., Du X., Wu L.C., et al. Cell-free formation of RNA granules: low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels // *Cell*. 2012. Vol. 149, № 4. P. 753–767.
183. Gui X., Luo F., Li Y., Zhou H., Qin Z., Liu Z., et al. Structural basis for reversible amyloids of hnRNPA1 elucidates their role in stress granule assembly // *Nat. Commun.* 2019. Vol. 10, № 1. P. 2006.
184. Chen C., Ding X., Akram N., Xue S., Luo S.-Z. Fused in sarcoma: properties, self-assembly and correlation with neurodegenerative diseases // *Molecules*. 2019. Vol. 24, № 8.
185. Murray D.T., Kato M., Lin Y., Thurber K.R., Hung I., McKnight S.L., et al. Structure of FUS protein fibrils and its relevance to self-assembly and phase separation of low-complexity domains // *Cell*. 2017. Vol. 171, № 3. P. 615–627.e16.
186. Luo F., Gui X., Zhou H., Gu J., Li Y., Liu X., et al. Atomic structures of FUS LC domain segments reveal bases for reversible amyloid fibril formation // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2018. Vol. 25, № 4. P. 341–346.
187. Chaudhury A., Chander P., Howe P.H. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: Focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles // *RNA*. 2010. Vol. 16, № 8. P. 1449–1462.
188. Kim H.J., Kim N.C., Wang Y.-D., Scarborough E.A., Moore J., Diaz Z., et al.

- Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS // *Nature*. 2013. Vol. 495, № 7442. P. 467–473.
189. Prasad A., Bharathi V., Sivalingam V., Girdhar A., Patel B.K. Molecular mechanisms of TDP-43 misfolding and pathology in amyotrophic lateral sclerosis // *Front. Mol. Neurosci.* 2019. Vol. 12. P. 25.
190. Kosolapova A.O., Belousov M. V, Sulatskaya A.I., Belousova M.E., Sulatsky M.I., Antonets K.S., et al. Two novel amyloid proteins, RopA and RopB, from the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* // *Biomolecules*. 2019. Vol. 9, № 11. P. 694.
191. Danoff E.J., Fleming K.G. Aqueous, unfolded OmpA forms amyloid-like fibrils upon self-association. // *PLoS One*. 2015. Vol. 10, № 7. P. e0132301.
192. Sahaya Rajan J.J., Chinnappan Santiago T., Singaravel R., Ignacimuthu S. Outer membrane protein C (OmpC) of *Escherichia coli* induces neurodegeneration in mice by acting as an amyloid // *Biotechnol. Lett.* 2016. Vol. 38, № 4. P. 689–700.
193. Антонец К.С., Волков К.В., Мальцева А.Л., Аршакян Л.М., Галкин А.П., Нижников А.А. Протеомный анализ белковых фракций бактерии *Escherichia coli*, устойчивых к солюбилизации ионными детергентами // *Биохимия*. 2016. Т. 81, № 1. С. 92–105.
194. Villain E., Nikekhin A.A., Kajava A. V. Porins and amyloids are coded by similar sequence motifs // *Proteomics*. 2019. Vol. 19, № 6. P. e1800075.
195. Belousov M. V, Bondarev S.A., Kosolapova A.O., Antonets K.S., Sulatskaya A.I., Sulatsky M.I., et al. M60-like metalloprotease domain of the *Escherichia coli* YghJ protein forms amyloid fibrils // *PLoS One*. 2018. Vol. 13, № 1. P. e0191317.
196. Villar-Piqué A., Sabaté R., Lopera O., Gibert J., Torne J.M., Santos M., et al. Amyloid-like protein inclusions in tobacco transgenic plants. // *PLoS One*. 2010. Vol. 5, № 10. P. e13625.
197. Kaur G., Kaundal S., Kapoor S., Grimes J.M., Huiskonen J.T., Thakur K.G. *Mycobacterium tuberculosis* CarD, an essential global transcriptional regulator forms amyloid-like fibrils // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8, № 1. P. 10124.

198. Higurashi T., Yagi H., Mizobata T., Kawata Y. Amyloid-like fibril formation of co-chaperonin GroES: nucleation and extension prefer different degrees of molecular compactness // *J. Mol. Biol.* 2005. Vol. 351, № 5. P. 1057–1069.
199. Giraldo R. Defined DNA sequences promote the assembly of a bacterial protein into distinct amyloid nanostructures // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007. Vol. 104, № 44. P. 17388–17393.
200. Gasset-Rosa F., Coquel A.-S., Moreno-Del Álamo M., Chen P., Song X., Serrano A.M., et al. Direct assessment in bacteria of prionoid propagation and phenotype selection by Hsp70 chaperone // *Mol. Microbiol.* 2014. Vol. 91, № 6. P. 1070–1087.
201. Fernández-Tresguerres M.E., de la Espina S.M.-D., Gasset-Rosa F., Giraldo R. A DNA-promoted amyloid proteinopathy in *Escherichia coli* // *Mol. Microbiol.* 2010. Vol. 77, № 6. P. 1456–1469.
202. Torreira E., Moreno-Del Álamo M., Fuentes-Perez M.E., Fernández C., Martín-Benito J., Moreno-Herrero F., et al. Amyloidogenesis of bacterial prionoid RepA-WH1 recapitulates dimer to monomer transitions of RepA in DNA replication initiation. // *Structure.* 2015. Vol. 23, № 1. P. 183–189.
203. George J.M. The synucleins. // *Genome Biol.* 2002. Vol. 3, № 1. P. REVIEWS3002.
204. Lavedan C. The synuclein family. // *Genome Res.* 1998. Vol. 8, № 9. P. 871–880.
205. Stefanis L. α -Synuclein in Parkinson's disease. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012. Vol. 2, № 2. P. a009399.
206. Chandra S., Chen X., Rizo J., Jahn R., Südhof T.C. A broken alpha -helix in folded alpha -Synuclein // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 17. P. 15313–15318.
207. Tarutani A., Hasegawa M. Prion-like propagation of α -synuclein in neurodegenerative diseases. // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2019. Vol. 168. P. 323–348.
208. Jan A., Gonçalves N.P., Vaegter C.B., Jensen P.H., Ferreira N. The prion-like spreading of alpha-synuclein in parkinson's disease: update on models and hypotheses // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, № 15. P. 8338.

209. Yoshimoto M., Iwai A., Kang D., Otero D.A., Xia Y., Saitoh T. NACP, the precursor protein of the non-amyloid beta/A4 protein (A beta) component of Alzheimer disease amyloid, binds A beta and stimulates A beta aggregation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995. Vol. 92, № 20. P. 9141–9145.
210. Jin H., Kanthasamy A., Ghosh A., Yang Y., Anantharam V., Kanthasamy A.G. α -Synuclein negatively regulates protein kinase C δ expression to suppress apoptosis in dopaminergic neurons by reducing p300 histone acetyltransferase activity // *J. Neurosci.* 2011. Vol. 31, № 6. P. 2035–2051.
211. Hashimoto M., Hsu L.J., Rockenstein E., Takenouchi T., Mallory M., Masliah E. alpha-Synuclein protects against oxidative stress via inactivation of the c-Jun N-terminal kinase stress-signaling pathway in neuronal cells // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 13. P. 11465–11472.
212. Oaks A.W., Sidhu A. Parallel mechanisms for direct and indirect membrane protein trafficking by synucleins. // *Commun. Integr. Biol.* 2013. Vol. 6, № 6. P. e26794.
213. Rizo J., Südhof T.C. The membrane fusion enigma: SNAREs, Sec1/Munc18 proteins, and their accomplices--guilty as charged? // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2012. Vol. 28. P. 279–308.
214. Vargas K.J., Makani S., Davis T., Westphal C.H., Castillo P.E., Chandra S.S. Synucleins regulate the kinetics of synaptic vesicle endocytosis // *J. Neurosci.* 2014. Vol. 34, № 28. P. 9364–9376.
215. Burré J., Vivona S., Diao J., Sharma M., Brunger A.T., Südhof T.C. Properties of native brain α -synuclein // *Nature.* 2013. Vol. 498, № 7453. P. E4-6; discussion E6-7.
216. Wu K.-P., Weinstock D.S., Narayanan C., Levy R.M., Baum J. Structural reorganization of alpha-synuclein at low pH observed by NMR and REMD simulations // *J. Mol. Biol.* 2009. Vol. 391, № 4. P. 784–796.
217. Uversky V.N., Li J., Fink A.L. Evidence for a partially folded intermediate in alpha-synuclein fibril formation // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 14. P. 10737–10744.

218. Shtilerman M.D., Ding T.T., Lansbury P.T. Molecular crowding accelerates fibrillization of alpha-synuclein: could an increase in the cytoplasmic protein concentration induce Parkinson's disease? // *Biochemistry*. 2002. Vol. 41, № 12. P. 3855–3860.
219. Uversky V.N., Li J., Fink A.L. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 47. P. 44284–44296.
220. Munishkina L.A., Phelan C., Uversky V.N., Fink A.L. Conformational behavior and aggregation of alpha-synuclein in organic solvents: modeling the effects of membranes // *Biochemistry*. 2003. Vol. 42, № 9. P. 2720–2730.
221. Uversky V.N., Li J., Fink A.L. Pesticides directly accelerate the rate of alpha-synuclein fibril formation: a possible factor in Parkinson's disease // *FEBS Lett.* 2001. Vol. 500, № 3. P. 105–108.
222. Engelender S., Kaminsky Z., Guo X., Sharp A.H., Amaravi R.K., Kleiderlein J.J., et al. Synphilin-1 associates with alpha-synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions // *Nat. Genet.* 1999. Vol. 22, № 1. P. 110–114.
223. Ferreira N., Gram H., Sorrentino Z.A., Gregersen E., Schmidt S.I., Reimer L., et al. Multiple system atrophy-associated oligodendroglial protein p25 α stimulates formation of novel α -synuclein strain with enhanced neurodegenerative potential // *Acta Neuropathol.* 2021. Vol. 142, № 1. P. 87–115.
224. Anderson J.P., Walker D.E., Goldstein J.M., de Laat R., Banducci K., Caccavello R.J., et al. Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, № 40. P. 29739–29752.
225. Paleologou K.E., Oueslati A., Shakked G., Rospigliosi C.C., Kim H.-Y., Lamberto G.R., et al. Phosphorylation at S87 is enhanced in synucleinopathies, inhibits alpha-synuclein oligomerization, and influences synuclein-membrane interactions // *J. Neurosci.* 2010. Vol. 30, № 9. P. 3184–3198.
226. Tofaris G.K., Razaq A., Ghetti B., Lilley K.S., Spillantini M.G. Ubiquitination of

- alpha-synuclein in Lewy bodies is a pathological event not associated with impairment of proteasome function // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 45. P. 44405–44411.
227. Giasson B.I., Duda J.E., Murray I. V, Chen Q., Souza J.M., Hurtig H.I., et al. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions // *Science*. 2000. Vol. 290, № 5493. P. 985–989.
228. Krumova P., Meulmeester E., Garrido M., Tirard M., Hsiao H.-H., Bossis G., et al. Sumoylation inhibits alpha-synuclein aggregation and toxicity. // *J. Cell Biol.* 2011. Vol. 194, № 1. P. 49–60.
229. Choi D.-H., Kim Y.-J., Kim Y.-G., Joh T.H., Beal M.F., Kim Y.-S. Role of matrix metalloproteinase 3-mediated alpha-synuclein cleavage in dopaminergic cell death // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286, № 16. P. 14168–14177.
230. Kang L., Janowska M.K., Moriarty G.M., Baum J. Mechanistic insight into the relationship between N-terminal acetylation of α -synuclein and fibril formation rates by NMR and fluorescence. // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, № 9. P. e75018.
231. Fujiwara H., Hasegawa M., Dohmae N., Kawashima A., Masliah E., Goldberg M.S., et al. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions // *Nat. Cell Biol.* 2002. Vol. 4, № 2. P. 160–164.
232. Oueslati A. Implication of alpha-synuclein phosphorylation at S129 in synucleinopathies: what have we learned in the last decade? // *J. Parkinsons. Dis.* 2016. Vol. 6, № 1. P. 39–51.
233. Fan T.-S., Liu S.C.-H., Wu R.-M. Alpha-synuclein and cognitive decline in Parkinson disease // *Life (Basel, Switzerland)*. 2021. Vol. 11, № 11. P. 1239.
234. Vinueza-Gavilanes R., Íñigo-Marco I., Larrea L., Lasa M., Carte B., Santamaría E., et al. N-terminal acetylation mutants affect alpha-synuclein stability, protein levels and neuronal toxicity. // *Neurobiol. Dis.* 2020. Vol. 137. P. 104781.
235. Sidhu A., Segers-Nolten I., Subramaniam V. Conformational compatibility is essential for heterologous aggregation of α -synuclein // *ACS Chem. Neurosci.* 2016. Vol. 7, № 6. P. 719–727.

236. Alam P., Bousset L., Melki R., Otzen D.E. α -synuclein oligomers and fibrils: a spectrum of species, a spectrum of toxicities // *J. Neurochem.* 2019. Vol. 150, № 5. P. 522–534.
237. Winner B., Jappelli R., Maji S.K., Desplats P.A., Boyer L., Aigner S., et al. *In vivo* demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011. Vol. 108, № 10. P. 4194–4199.
238. Mahul-Mellier A.-L., Burtscher J., Maharjan N., Weerens L., Croisier M., Kuttler F., et al. The process of Lewy body formation, rather than simply α -synuclein fibrillization, is one of the major drivers of neurodegeneration. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2020. Vol. 117, № 9. P. 4971–4982.
239. Olanow C.W., Perl D.P., DeMartino G.N., McNaught K.S.P. Lewy-body formation is an aggresome-related process: a hypothesis. // *Lancet. Neurol.* 2004. Vol. 3, № 8. P. 496–503.
240. Groveman B.R., Orrù C.D., Hughson A.G., Raymond L.D., Zanusso G., Ghetti B., et al. Rapid and ultra-sensitive quantitation of disease-associated α -synuclein seeds in brain and cerebrospinal fluid by α Syn RT-QuIC. // *Acta Neuropathol. Commun.* 2018. Vol. 6, № 1. P. 7.
241. Bose A., Beal M.F. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease // *J. Neurochem.* 2016. Vol. 139 Suppl. P. 216–231.
242. Wong Y.C., Krainc D. α -synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies. // *Nat. Med.* 2017. Vol. 23, № 2. P. 1–13.
243. Garcia-Reitböck P., Anichtchik O., Bellucci A., Iovino M., Ballini C., Fineberg E., et al. SNARE protein redistribution and synaptic failure in a transgenic mouse model of Parkinson's disease // *Brain.* 2010. Vol. 133, № Pt 7. P. 2032–2044.
244. Ghiglieri V., Calabrese V., Calabresi P. Alpha-synuclein: from early synaptic dysfunction to neurodegeneration // *Front. Neurol.* 2018. Vol. 9. P. 295.
245. Matiiv A.B., Moskalenko S.E., Sergeeva O.S., Zhouravleva G.A., Bondarev S.A. NOS1AP interacts with α -synuclein and aggregates in yeast and mammalian cells // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23, № 16. P. 9102.
246. Pan K.M., Baldwin M., Nguyen J., Gasset M., Serban A., Groth D., et al.

- Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993. Vol. 90, № 23. P. 10962–10966.
247. Luk K.C., Kehm V., Carroll J., Zhang B., O'Brien P., Trojanowski J.Q., et al. Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice // *Science*. 2012. Vol. 338, № 6109. P. 949–953.
248. Luk K.C., Kehm V.M., Zhang B., O'Brien P., Trojanowski J.Q., Lee V.M.Y. Intracerebral inoculation of pathological α -synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative α -synucleinopathy in mice // *J. Exp. Med.* 2012. Vol. 209, № 5. P. 975–986.
249. Ruiz-Riquelme A., Lau H.H.C., Stuart E., Goczi A.N., Wang Z., Schmitt-Ulms G., et al. Prion-like propagation of β -amyloid aggregates in the absence of APP overexpression. // *Acta Neuropathol. Commun.* 2018. Vol. 6, № 1. P. 26.
250. Clavaguera F., Bolmont T., Crowther R.A., Abramowski D., Frank S., Probst A., et al. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain // *Nat. Cell Biol.* 2009. Vol. 11, № 7. P. 909–913.
251. Pearce M.M.P., Kopito R.R. Prion-like characteristics of polyglutamine-containing proteins // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2018. Vol. 8, № 2. P. a024257.
252. Braak H., Del Tredici K., Rüb U., de Vos R.A.I., Jansen Steur E.N.H., Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease // *Neurobiol. Aging*. 2003. Vol. 24, № 2. P. 197–211.
253. Kordower J.H., Chu Y., Hauser R.A., Freeman T.B., Olanow C.W. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease // *Nat. Med.* 2008. Vol. 14, № 5. P. 504–506.
254. Li J.-Y., Englund E., Holton J.L., Soulet D., Hagell P., Lees A.J., et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation // *Nat. Med.* 2008. Vol. 14, № 5. P. 501–503.
255. Luk K.C., Song C., O'Brien P., Stieber A., Branch J.R., Brunden K.R., et al. Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like

- intracellular inclusions in cultured cells // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2009. Vol. 106, № 47. P. 20051–20056.
256. Vargas J.Y., Grudina C., Zurzolo C. The prion-like spreading of α -synuclein: From *in vitro* to *in vivo* models of Parkinson's disease // Ageing Res. Rev. 2019. Vol. 50. P. 89–101.
257. Masuda-Suzukake M., Nonaka T., Hosokawa M., Oikawa T., Arai T., Akiyama H., et al. Prion-like spreading of pathological α -synuclein in brain // Brain. 2013. Vol. 136, № Pt 4. P. 1128–1138.
258. Chistiakov D.A., Chistiakov A.A. α -Synuclein-carrying extracellular vesicles in Parkinson's disease: deadly transmitters // Acta Neurol. Belg. 2017. Vol. 117, № 1. P. 43–51.
259. Ivanova M.I., Sawaya M.R., Gingery M., Attinger A., Eisenberg D. An amyloid-forming segment of beta2-microglobulin suggests a molecular model for the fibril // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2004. Vol. 101, № 29. P. 10584–10589.
260. Ventura S., Zurdo J., Narayanan S., Parreño M., Mangués R., Reif B., et al. Short amino acid stretches can mediate amyloid formation in globular proteins: the Src homology 3 (SH3) case // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2004. Vol. 101, № 19. P. 7258–7263.
261. Nerelius C., Fitzen M., Johansson J. Amino acid sequence determinants and molecular chaperones in amyloid fibril formation. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010. Vol. 396, № 1. P. 2–6.
262. Zambrano R., Jamroz M., Szczasiuk A., Pujols J., Kmiecik S., Ventura S. AGGRESCAN3D (A3D): server for prediction of aggregation properties of protein structures // Nucleic Acids Res. 2015. Vol. 43, № W1. P. W306–W313.
263. Sankar K., Krystek S.R., Carl S.M., Day T., Maier J.K.X. AggScore: Prediction of aggregation-prone regions in proteins based on the distribution of surface patches. // Proteins. 2018. Vol. 86, № 11. P. 1147–1156.
264. Conchillo-Solé O., de Groot N.S., Avilés F.X., Vendrell J., Daura X., Ventura S. AGGRESCAN: a server for the prediction and evaluation of “hot spots” of aggregation in polypeptides // BMC Bioinformatics. 2007. Vol. 8. P. 65.

265. Sánchez de Groot N., Pallarés I., Avilés F.X., Vendrell J., Ventura S. Prediction of “hot spots” of aggregation in disease-linked polypeptides. // BMC Struct. Biol. 2005. Vol. 5. P. 18.
266. Garbuzynskiy S.O., Lobanov M.Y., Galzitskaya O. V. FoldAmyloid: a method of prediction of amyloidogenic regions from protein sequence // Bioinformatics. 2010. Vol. 26, № 3. P. 326–332.
267. Oliveberg M. Waltz, an exciting new move in amyloid prediction // Nat. Methods. 2010. Vol. 7, № 3. P. 187–188.
268. Maurer-Stroh S., Debulpaep M., Kuemmerer N., Lopez de la Paz M., Martins I.C., Reumers J., et al. Exploring the sequence determinants of amyloid structure using position-specific scoring matrices // Nat. Methods. 2010. Vol. 7, № 3. P. 237–242.
269. Família C., Dennison S.R., Quintas A., Phoenix D.A. Prediction of peptide and protein propensity for amyloid formation // PLoS One. 2015. Vol. 10, № 8. P. e0134679.
270. Bondarev S.A., Bondareva O. V, Zhouravleva G.A., Kajava A. V. BetaSerpentine: a bioinformatics tool for reconstruction of amyloid structures // Bioinformatics. 2018. Vol. 34, № 4. P. 599–608.
271. Dawson T.M., Snyder S.H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain // J. Neurosci. 1994. Vol. 14, № 9. P. 5147–5159.
272. Böhme G.A., Bon C., Stutzmann J.M., Doble A., Blanchard J.C. Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation // Eur. J. Pharmacol. 1991. Vol. 199, № 3. P. 379–381.
273. Trabace L., Cassano T., Tucci P., Steardo L., Kendrick K.M., Cuomo V. The effects of nitric oxide on striatal serotonergic transmission involve multiple targets: an *in vivo* microdialysis study in the awake rat // Brain Res. 2004. Vol. 1008, № 2. P. 293–298.
274. Sessa W.C. The nitric oxide synthase family of proteins // J. Vasc. Res. 1994. Vol. 31, № 3. P. 131–143.
275. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition // Biochem. J. 2001. Vol. 357, № Pt 3. P. 593–615.

276. Jaffrey S.R., Snowman A.M., Eliasson M.J., Cohen N.A., Snyder S.H. CAPON: a protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95 // *Neuron*. 1998. Vol. 20, № 1. P. 115–124.
277. Freudenberg F., Althoff A., Reif A. Neuronal nitric oxide synthase (NOS1) and its adaptor, NOS1AP, as a genetic risk factors for psychiatric disorders // *Genes. Brain. Behav.* 2015. Vol. 14, № 1. P. 46–63.
278. Wang J., Jin L., Zhu Y., Zhou X., Yu R., Gao S. Research progress in NOS1AP in neurological and psychiatric diseases. // *Brain Res. Bull.* 2016. Vol. 125. P. 99–105.
279. Villanueva C., Giulivi C. Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease // *Free Radic. Biol. Med.* 2010. Vol. 49, № 3. P. 307–316.
280. Nasyrova R.F., Ivashchenko D. V, Ivanov M. V, Neznanov N.G. Role of nitric oxide and related molecules in schizophrenia pathogenesis: biochemical, genetic and clinical aspects. // *Front. Physiol.* 2015. Vol. 6. P. 139.
281. Tarpey M.M., Fridovich I. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite // *Circ. Res.* 2001. Vol. 89, № 3. P. 224–236.
282. Loeb E., El Asmar K., Trabado S., Gressier F., Colle R., Rigal A., et al. Nitric Oxide Synthase activity in major depressive episodes before and after antidepressant treatment: Results of a large case-control treatment study. // *Psychol. Med.* 2020. P. 1–10.
283. Kittel-Schneider S., Reuß M., Meyer A., Weber H., Gessner A., Leistner C., et al. Multi-level biomarker analysis of nitric oxide synthase isoforms in bipolar disorder and adult ADHD // *J. Psychopharmacol.* 2015. Vol. 29, № 1. P. 31–38.
284. Ustundag M.F., Ozcan H., Gencer A.G., Yilmaz E.D., Uğur K., Oral E., et al. Nitric oxide, asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine and L-arginine levels in psychotic exacerbation of schizophrenia and bipolar disorder manic episode. // *Saudi Med. J.* 2020. Vol. 41, № 1. P. 38–45.
285. Maia-de-Oliveira J.P., Trzesniak C., Oliveira I.R., Kempton M.J., Rezende

- T.M.N. de, Iego S., et al. Nitric oxide plasma/serum levels in patients with schizophrenia: a systematic review and meta-analysis // *Rev. Bras. Psiquiatr.* 2012. Vol. 34 Suppl 2. P. S149–S155.
286. Majmundar A.J., Buerger F., Forbes T.A., Klämbt V., Schneider R., Deutsch K., et al. Recessive *NOS1AP* variants impair actin remodeling and cause glomerulopathy in humans and mice // *Sci. Adv.* 2021. Vol. 7, № 1. P. eabe1386.
287. Hernandez K., Swiatkowski P., Patel M. V, Liang C., Dudzinski N.R., Brzustowicz L.M., et al. Overexpression of isoforms of nitric oxide synthase 1 adaptor protein, encoded by a risk gene for schizophrenia, alters actin dynamics and synaptic function // *Front. Cell. Neurosci.* 2016. Vol. 10. P. 6.
288. Clattenburg L., Wigerius M., Qi J., Rainey J.K., Rourke J.L., Muruganandan S., et al. NOS1AP functionally associates with YAP to regulate Hippo signaling // *Mol. Cell. Biol.* 2015. Vol. 35, № 13. P. 2265–2277.
289. Fang M., Jaffrey S.R., Sawa A., Ye K., Luo X., Snyder S.H. Dexas1: a G protein specifically coupled to neuronal nitric oxide synthase via CAPON // *Neuron.* 2000. Vol. 28, № 1. P. 183–193.
290. Jaffrey S.R., Benfenati F., Snowman A.M., Czernik A.J., Snyder S.H. Neuronal nitric-oxide synthase localization mediated by a ternary complex with synapsin and CAPON // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. Vol. 99, № 5. P. 3199–3204.
291. Richier L., Williton K., Clattenburg L., Colwill K., O'Brien M., Tsang C., et al. NOS1AP associates with Scribble and regulates dendritic spine development // *J. Neurosci.* 2010. Vol. 30, № 13. P. 4796–4805.
292. Anastas J.N., Biechele T.L., Robitaille M., Muster J., Allison K.H., Angers S., et al. A protein complex of SCRIB, NOS1AP and VANGL1 regulates cell polarity and migration, and is associated with breast cancer progression // *Oncogene.* 2012. Vol. 31, № 32. P. 3696–3708.
293. Chang K.-C., Barth A.S., Sasano T., Kizana E., Kashiwakura Y., Zhang Y., et al. CAPON modulates cardiac repolarization via neuronal nitric oxide synthase signaling in the heart // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. Vol. 105, № 11. P. 4477–4482.

294. McNeill R. V, Kehrwald C., Brum M., Knopf K., Brunkhorst-Kanaan N., Etyemez S., et al. Uncovering associations between mental illness diagnosis, nitric oxide synthase gene variation, and peripheral nitric oxide concentration. // *Brain. Behav. Immun.* 2022. Vol. 101. P. 275–283.
295. Courtney M.J., Li L.-L., Lai Y.Y. Mechanisms of NOS1AP action on NMDA receptor-nNOS signaling // *Front. Cell. Neurosci.* 2014. Vol. 8. P. 252.
296. Li L.-L., Ginet V., Liu X., Vergun O., Tuittila M., Mathieu M., et al. The nNOS-p38MAPK pathway is mediated by NOS1AP during neuronal death // *J. Neurosci.* 2013. Vol. 33, № 19. P. 8185–8201.
297. Sugiyama K., Sasano T., Kurokawa J., Takahashi K., Okamura T., Kato N., et al. Oxidative stress induced ventricular arrhythmia and impairment of cardiac function in *Nos1ap* deleted mice // *Int. Heart J.* 2016. Vol. 57, № 3. P. 341–349.
298. Gheibi S., Ghasemi A. Insulin secretion: The nitric oxide controversy. // *EXCLI J.* 2020. Vol. 19. P. 1227–1245.
299. Shankar R.R., Wu Y., Shen H.Q., Zhu J.S., Baron A.D. Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance // *Diabetes.* 2000. Vol. 49, № 5. P. 684–687.
300. Hao M., Head W.S., Gunawardana S.C., Hasty A.H., Piston D.W. Direct effect of cholesterol on insulin secretion: a novel mechanism for pancreatic beta-cell dysfunction // *Diabetes.* 2007. Vol. 56, № 9. P. 2328–2338.
301. Becker M.L., Aarnoudse A.-J.L.H.J., Newton-Cheh C., Hofman A., Witteman J.C.M., Uitterlinden A.G., et al. Common variation in the *NOS1AP* gene is associated with reduced glucose-lowering effect and with increased mortality in users of sulfonylurea // *Pharmacogenet. Genomics.* 2008. Vol. 18, № 7. P. 591–597.
302. Becker M.L., Visser L.E., Newton-Cheh C., Witteman J.C.M., Hofman A., Uitterlinden A.G., et al. Genetic variation in the *NOS1AP* gene is associated with the incidence of diabetes mellitus in users of calcium channel blockers // *Diabetologia.* 2008. Vol. 51, № 11. P. 2138–2140.
303. Hu C., Wang C., Zhang R., Ng M.C., Bao Y., Wang C., et al. Association of

- genetic variants of *NOS1AP* with type 2 diabetes in a Chinese population // *Diabetologia*. 2010. Vol. 53, № 2. P. 290–298.
304. Wang T., Song J.-F., Zhou X.-Y., Li C.-L., Yin X.-X., Lu Q. *PPARD* rs2016520 (T/C) and *NOS1AP* rs12742393 (A/C) polymorphisms affect therapeutic efficacy of nateglinide in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus // *BMC Med. Genomics*. 2021. Vol. 14, № 1. P. 267.
305. Mu K., Sun Y., Zhao Y., Zhao T., Li Q., Zhang M., et al. Hepatic nitric oxide synthase 1 adaptor protein regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in obese mice depending on its PDZ binding domain. // *EBioMedicine*. 2019. Vol. 47. P. 352–364.
306. Zhao T., Li Q., Mao Q., Mu K., Wang C. Hepatic nNOS impaired hepatic insulin sensitivity through the activation of p38 MAPK. // *J. Endocrinol*. 2021. Vol. 248, № 3. P. 265–275.
307. Newton-Cheh C., Eijgelsheim M., Rice K.M., de Bakker P.I.W., Yin X., Estrada K., et al. Common variants at ten loci influence QT interval duration in the QTGEN Study. // *Nat. Genet*. 2009. Vol. 41, № 4. P. 399–406.
308. Pfeufer A., Sanna S., Arking D.E., Müller M., Gateva V., Fuchsberger C., et al. Common variants at ten loci modulate the QT interval duration in the QTSCD Study // *Nat. Genet*. 2009. Vol. 41, № 4. P. 407–414.
309. Hu G., Yang C., Zhao L., Fan Y., Lv Q., Zhao J., et al. The interaction of *NOS1AP*, *DISC1*, *DAOA*, and *GSK3B* confers susceptibility of early-onset schizophrenia in Chinese Han population // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2018. Vol. 81. P. 187–193.
310. Eastwood S.L. Does the *CAPON* gene confer susceptibility to schizophrenia? // *PLoS Med*. 2005. Vol. 2, № 10. P. e348.
311. Moghaddam B., Javitt D. From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. // *Neuropsychopharmacology*. 2012. Vol. 37, № 1. P. 4–15.
312. Gao S., Zhang T., Jin L., Liang D., Fan G., Song Y., et al. *CAPON* is a critical protein in synaptic molecular networks in the prefrontal cortex of mood disorder

- patients and contributes to depression-like behavior in a mouse model // *Cereb. Cortex*. 2019. Vol. 29, № 9. P. 3752–3765.
313. Greenwood T.A., Lazzeroni L.C., Calkins M.E., Freedman R., Green M.F., Gur R.E., et al. Genetic assessment of additional endophenotypes from the Consortium on the Genetics of Schizophrenia Family Study. // *Schizophr. Res.* 2016. Vol. 170, № 1. P. 30–40.
314. Greenwood T.A., Lazzeroni L.C., Murray S.S., Cadenhead K.S., Calkins M.E., Dobie D.J., et al. Analysis of 94 candidate genes and 12 endophenotypes for schizophrenia from the Consortium on the Genetics of Schizophrenia // *Am. J. Psychiatry*. 2011. Vol. 168, № 9. P. 930–946.
315. Greenwood T.A., Lazzeroni L.C., Maihofer A.X., Swerdlow N.R., Calkins M.E., Freedman R., et al. Genome-wide association of endophenotypes for schizophrenia from the Consortium on the Genetics of Schizophrenia (COGS) Study. // *JAMA psychiatry*. 2019. Vol. 76, № 12. P. 1274–1284.
316. Cheah S.-Y., Lawford B.R., Young R.M., Morris C.P., Voisey J. Association of *NOS1AP* variants and depression phenotypes in schizophrenia // *J. Affect. Disord.* 2015. Vol. 188. P. 263–269.
317. Bruenig D., Morris C.P., Mehta D., Harvey W., Lawford B., Young R.M., et al. Nitric oxide pathway genes (*NOS1AP* and *NOS1*) are involved in PTSD severity, depression, anxiety, stress and resilience // *Gene*. 2017. Vol. 625. P. 42–48.
318. Lawford B.R., Morris C.P., Swagell C.D., Hughes I.P., Young R.M., Voisey J. *NOS1AP* is associated with increased severity of PTSD and depression in untreated combat veterans // *J. Affect. Disord.* 2013. Vol. 147, № 1–3. P. 87–93.
319. Delorme R., Betancur C., Scheid I., Anckarsäter H., Chaste P., Jamain S., et al. Mutation screening of *NOS1AP* gene in a large sample of psychiatric patients and controls // *BMC Med. Genet.* 2010. Vol. 11. P. 108.
320. Hashimoto M., Bogdanovic N., Nakagawa H., Volkmann I., Aoki M., Winblad B., et al. Analysis of microdissected neurons by 18O mass spectrometry reveals altered protein expression in Alzheimer's disease. // *J. Cell. Mol. Med.* 2012. Vol. 16, № 8. P. 1686–1700.

321. Buxbaum J.N., Dispenzieri A., Eisenberg D.S., Fändrich M., Merlini G., Saraiva M.J.M., et al. Amyloid nomenclature 2022: update, novel proteins, and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) Nomenclature Committee // *Amyloid*. 2022. Vol. 29, № 4. P. 213–219.
322. Gómez-Benito M., Granado N., García-Sanz P., Michel A., Dumoulin M., Moratalla R. Modeling Parkinson's disease with the alpha-synuclein protein // *Front. Pharmacol.* 2020. Vol. 11. P. 356.
323. Danilov L.G., Moskalenko S.E., Matveenko A.G., Sukhanova X. V., Belousov M. V., Zhouravleva G.A., et al. The human NUP58 nucleoporin can form amyloids *in vitro* and *in vivo* // *Biomedicines*. 2021. Vol. 9, № 10. P. 1451.
324. Chernoff Y.O., Lindquist S.L., Ono B., Inge-Vechtomov S.G., Liebman S.W. Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [*psi*⁺] // *Science*. 1995. Vol. 268, № 5212. P. 880–884.
325. DuBridge R.B., Tang P., Hsia H.C., Leong P.M., Miller J.H., Calos M.P. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system // *Mol. Cell. Biol.* 1987. Vol. 7, № 1. P. 379–387.
326. Tumilowicz J.J., Nichols W.W., Cholon J.J., Greene A.E. Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma // *Cancer Res.* 1970. Vol. 30, № 8. P. 2110–2118.
327. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning - Laboratory manual*. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
328. Kaiser C.A., Michaelis S., Mitchell A.P. *Methods in yeast genetics: a cold spring harbor laboratory course manual*. NY: Cold Spring Harbour laboratory press, 1994.
329. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids // *Gene*. 1990. Vol. 96, № 1. P. 23–28.
330. Gietz D., St Jean A., Woods R.A., Schiestl R.H. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. // *Nucleic Acids Res.* 1992. Vol. 20, № 6. P. 1425.
331. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., UGENE team. Unipro UGENE: a

- unified bioinformatics toolkit // *Bioinformatics*. 2012. Vol. 28, № 8. P. 1166–1167.
332. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. Vol. 227, № 5259. P. 680–685.
333. Kyhse-Andersen J. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose // *J. Biochem. Biophys. Methods*. 1984. Vol. 10, № 3–4. P. 203–209.
334. Kryndushkin D.S., Alexandrov I.M., Ter-Avanesyan M.D., Kushnirov V. V. Yeast [*PSI+*] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104 // *J. Biol. Chem*. 2003. Vol. 278, № 49. P. 49636–49643.
335. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1979. Vol. 76, № 9. P. 4350–4354.
336. Huang C., Ren G., Zhou H., Wang C. A new method for purification of recombinant human alpha-synuclein in *Escherichia coli* // *Protein Expr. Purif*. 2005. Vol. 42, № 1. P. 173–177.
337. Vaneyck J., Segers-Nolten I., Broersen K., Claessens M.M.A.E. Cross-seeding of alpha-synuclein aggregation by amyloid fibrils of food proteins. // *J. Biol. Chem*. 2021. Vol. 296. P. 100358.
338. Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Cham: Springer International Publishing, 2016. 260 p.
339. Wilcoxon F. Individual comparisons by ranking methods // *Biometrics Bull*. 1945. Vol. 1, № 6. P. 80.
340. Brum J.R., Steward G.F. Morphological characterization of viruses in the stratified water column of alkaline, hypersaline Mono Lake // *Microb. Ecol*. 2010. Vol. 60, № 3. P. 636–643.
341. Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis // *Nat. Methods*. 2012. Vol. 9, № 7. P. 671–675.
342. Bondarev S.A., Zhouravleva G.A., Belousov M. V, Kajava A. V. Structure-based view on [*PSI+*] prion properties // *Prion*. 2015. Vol. 9, № 3. P. 190–199.

343. Roche D.B., Villain E., Kajava A. V. Usage of a dataset of NMR resolved protein structures to test aggregation versus solubility prediction algorithms. // *Protein Sci.* 2017. Vol. 26, № 9. P. 1864–1869.
344. Bhatwa A., Wang W., Hassan Y.I., Abraham N., Li X.-Z., Zhou T. Challenges associated with the formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli* and strategies to address them for industrial applications. // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021. Vol. 9. P. 630551.
345. Chandramowliswaran P., Sun M., Casey K.L., Romanyuk A. V, Grizel A. V, Sopova J. V, et al. Mammalian amyloidogenic proteins promote prion nucleation in yeast // *J. Biol. Chem.* 2018. Vol. 293, № 9. P. 3436–3450.
346. Wickner R.B., Kryndushkin D., Shewmaker F., McGlinchey R., Edskes H.K. Study of amyloids using yeast // *Methods Mol. Biol.* 2012. Vol. 849. P. 321–346.
347. Chernova T.A., Chernoff Y.O., Wilkinson K.D. Yeast models for amyloids and prions: environmental modulation and drug discovery // *Molecules.* 2019. Vol. 24, № 18. P. 3388.
348. Muley V.Y., Akhter Y., Galande S. PDZ domains across the microbial world: molecular link to the proteases, stress response, and protein synthesis // *Genome Biol. Evol.* / ed. Gojobori T. 2019. Vol. 11, № 3. P. 644–659.
349. Halfmann R., Wright J.R., Alberti S., Lindquist S., Rexach M. Prion formation by a yeast GLFG nucleoporin // *Prion.* 2012. Vol. 6, № 4. P. 391–399.
350. Lemkau L.R., Comellas G., Kloepper K.D., Woods W.S., George J.M., Rienstra C.M. Mutant protein A30P α -synuclein adopts wild-type fibril structure, despite slower fibrillation kinetics // *J. Biol. Chem.* 2012. Vol. 287, № 14. P. 11526–11532.
351. Hu C.-D., Chinenov Y., Kerppola T.K. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation // *Mol. Cell.* 2002. Vol. 9, № 4. P. 789–798.
352. Croucher D.R., Ionomou M., Hastings J.F., Kennedy S.P., Han J.Z.R., Shearer R.F., et al. Bimolecular complementation affinity purification (BiCAP) reveals dimer-specific protein interactions for ERBB2 dimers // *Sci. Signal.* 2016. Vol. 9,

- № 436. P. ra69.
353. Guan Y., Zhao X., Liu F., Yan S., Wang Y., Du C., et al. Pathogenic mutations differentially regulate cell-to-cell transmission of α -synuclein // *Front. Cell. Neurosci.* 2020. Vol. 14. P. 159.
354. Wördehoff M.M., Hoyer W. α -Synuclein aggregation monitored by thioflavin T fluorescence assay // *Bio-protocol.* 2018. Vol. 8, № 14. P. e2941.
355. Barage S.H., Sonawane K.D. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease // *Neuropeptides.* 2015. Vol. 52. P. 1–18.
356. Ricciarelli R., Fedele E. The amyloid cascade hypothesis in Alzheimer's disease: it's time to change our mind // *Curr. Neuropharmacol.* 2017. Vol. 15, № 6. P. 926–935.
357. Khurana R., Uversky V.N., Nielsen L., Fink A.L. Is Congo red an amyloid-specific dye? // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 25. P. 22715–22721.
358. Navarro S., Ventura S. Computational re-design of protein structures to improve solubility. // *Expert Opin. Drug Discov.* 2019. Vol. 14, № 10. P. 1077–1088.
359. Shaw G., Morse S., Ararat M., Graham F.L. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells // *FASEB J.* 2002. Vol. 16, № 8. P. 869–871.
360. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. // *Nature.* 2021. Vol. 596, № 7873. P. 583–589.
361. Varadi M., Anyango S., Deshpande M., Nair S., Natassia C., Yordanova G., et al. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. // *Nucleic Acids Res.* 2022. Vol. 50, № D1. P. D439–D444.
362. Delenclos M., Burgess J.D., Lamprokostopoulou A., Outeiro T.F., Vekrellis K., McLean P.J. Cellular models of alpha-synuclein toxicity and aggregation // *J. Neurochem.* 2019. Vol. 150, № 5. P. 566–576.
363. Hernandez S.M., Tikhonova E.B., Karamyshev A.L. Protein-protein interactions

- in alpha-synuclein biogenesis: new potential targets in Parkinson's disease // *Front. Aging Neurosci.* 2020. Vol. 12. P. 72.
364. Gupta A.K., Pokhriyal R., Das U., Khan M.I., Ratna Kumar D., Gupta R., et al. Evaluation of α -synuclein and apolipoprotein E as potential biomarkers in cerebrospinal fluid to monitor pharmacotherapeutic efficacy in dopamine dictated disease states of Parkinson's disease and schizophrenia. // *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2019. Vol. 15. P. 2073–2085.
365. Shyu Y.J., Suarez C.D., Hu C.-D. Visualization of ternary complexes in living cells by using a BiFC-based FRET assay // *Nat. Protoc.* 2008. Vol. 3, № 11. P. 1693–1702.
366. Kerppola T.K. Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells // *Nat. Protoc.* 2006. Vol. 1, № 3. P. 1278–1286.
367. Lashuel H.A., Overk C.R., Oueslati A., Masliah E. The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2013. Vol. 14, № 1. P. 38–48.
368. Kuusimäki T., Al-Abdulrasul H., Kurki S., Hietala J., Hartikainen S., Koponen M., et al. Increased risk of Parkinson's disease in patients with schizophrenia spectrum disorders // *Mov. Disord.* 2021. Vol. 36, № 6. P. 1353–1361.
369. Gadit A. Schizophrenia and Parkinson's disease: challenges in management // *BMJ Case Rep.* 2011. Vol. 2011. P. bcr1120115108.
370. Souza J.M., Giasson B.I., Chen Q., Lee V.M., Ischiropoulos H. Dityrosine cross-linking promotes formation of stable alpha -synuclein polymers. Implication of nitrative and oxidative stress in the pathogenesis of neurodegenerative synucleinopathies // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275, № 24. P. 18344–18349.
371. Takahashi T., Yamashita H., Nakamura T., Nagano Y., Nakamura S. Tyrosine 125 of alpha-synuclein plays a critical role for dimerization following nitrative stress. // *Brain Res.* 2002. Vol. 938, № 1–2. P. 73–80.
372. Olivares D., Huang X., Branden L., Greig N.H., Rogers J.T. Physiological and pathological role of alpha-synuclein in Parkinson's disease through iron mediated

- oxidative stress; the role of a putative iron-responsive element // *Int. J. Mol. Sci.* 2009. Vol. 10, № 3. P. 1226–1260.
373. Hodara R., Norris E.H., Giasson B.I., Mishizen-Eberz A.J., Lynch D.R., Lee V.M.-Y., et al. Functional consequences of alpha-synuclein tyrosine nitration: diminished binding to lipid vesicles and increased fibril formation // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 46. P. 47746–47753.

БЛАГОДАРНОСТИ

*«Боги дали людям знание, достаточное лишь, чтобы наполнить животы.
Но, используя его, люди создали инструменты, написали книги, построили города.
А теперь они направили свой взор к звёздам и безднам.
Каждое мгновение они создают новое знание, и я больше не могу отвести свой взор.»*

В заключение я бы хотел написать слова благодарности своему научному руководителю – Бондареву Станиславу Александровичу за чуткое руководство, методические советы, за помощь в планировании экспериментов, а также за бесконечно огромную поддержку и веру в меня. Хотелось бы поблагодарить своих коллег по лаборатории за поддержку, активное обсуждение рабочих вопросов и регулярные научные семинары. В особенности я бы хотел поблагодарить Трубицину Нину Павловну за помощь при выполнении работы и обсуждение полученных результатов.

Я благодарен Трубициной Нине Павловне, Барбитову Юрию Александровичу, Матвеевко Андрею Георгиевичу, Журавлевой Галине Анатольевне и Бондареву Станиславу Александровичу за огромную работу при подготовке двух обзорных статей, материалы которых были использованы в этой работе.

Я благодарю Журавлеву Галину Анатольевну за критическое прочтение текста диссертации.

Я хочу поблагодарить Католикову Наталью Викторовну и Качкина Даниила Валерьевича за предоставленные культуры клеток.

Помимо сотрудников кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ, хочется также поблагодарить сотрудников Ресурсных Центров СПбГУ Романович Анну Эдуардовну, Костина Николая Анатольевича и Воробьева Максима Германовича за помощь в работе на оборудовании.

Я благодарю своих родителей и свою сестру за поддержку в процессе обучения в аспирантуре и на протяжении написания текста диссертации.

Saint-Petersburg University

As Manuscript

Matiiv Anton Bogdanovich

**Nitric oxide synthase 1 adapter protein aggregation and its interaction with
 α -synuclein**

Scientific specialization 1.5.7. Genetics

Thesis for a Candidate degree in biological sciences

Translation from Russian

Scientific supervisor:

Candidate of biological sciences

Bondarev Stanislav Aleksandrovich

Saint Petersburg

2023

TABLE OF CONTENT

LIST OF ABBREVIATIONS AND SYMBOLS	166
INTRODUCTION.....	168
1. LITERATURE REVIEW	172
1.1 History of amyloids	172
1.2 Amyloid diversity.....	174
1.2.1 Pathological amyloids	174
1.2.1.1 Systemic amyloidoses	175
1.2.1.2 Localized amyloidoses	176
1.2.1.3 Neurodegenerative diseases	177
1.2.2 Functional amyloids	179
1.2.2.1 Amyloids in cell wall composition and cell adhesion processes	179
1.2.2.2 Amyloids in natural fibers.....	181
1.2.2.3. Amyloids in signaling processes	181
1.2.2.4 Toxins and antimicrobial peptides	183
1.2.2.5 Amyloids in memory processes	185
1.2.2.6 Amyloids related to reproduction.....	187
1.2.2.7 Hormones and amyloids.....	188
1.2.3 Amyloids with an undefined biological role.....	189
1.2.3.1 Membraneless organelles and protein aggregates.....	190
1.2.3.2 Aggregation-prone porins and enzymes.....	191
1.3 α -Synuclein.....	192
1.3.1 Functions of α -synuclein.....	193
1.3.2 α -Synuclein aggregation.....	193

1.3.3 Prion-like properties of α -synuclein.....	196
1.4 Bioinformatics search for potentially amyloidogenic proteins.....	196
1.5 Nitric oxide synthase 1 adaptor protein (NOS1AP).....	198
1.5.1 Synthesis of nitric oxide and its role in the pathophysiology of mental illness ..	198
1.5.2 Functions of NOS1AP.....	199
1.5.3 Association of NOS1AP with psychiatric disorders	203
1.6 Conclusion.....	204
2. MATERIALS AND METHODS	206
2.1 Plasmids.....	206
2.2 Microbial strains and cell lines	210
2.2.1 Microbial strains.....	210
2.2.1.1 Bacteria strains	210
2.2.1.2 Yeast strains	211
2.2.2 Mammalian cell lines	211
2.2.3 Media and cultivation conditions	211
2.3 Genetic methods	212
2.3.1 Transformation of yeast and bacteria.....	212
2.3.2 Transfection of mammalian cells.....	212
2.4 . Methods of molecular biology	213
2.4.1 Obtaining constructs encoding fragments of proteins of interest	213
2.4.2 Obtaining constructs encoding α -synuclein variants with amino acid substitutions	215
2.4.3 Gateway recombinatorial cloning	216
2.4.3.1 Gateway BP Clonase reaction.....	216
2.4.3.2 Gateway LR Clonase reaction.....	217

2.4.4 Obtaining the pDest527-nSNCA plasmid.....	217
2.4.5 Sequencing	220
2.4.6 MTT assay protocol for cell viability.....	220
2.5 Biochemical methods	221
2.5.1 Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....	221
2.5.2 Coomassie Brilliant Blue staining of polyacrylamide gels.....	221
2.5.3 Semi-dry protein transfer	221
2.5.4 Protein isolation from mammalian cells	222
2.5.5 Protein extraction from yeast cells.....	222
2.5.6 Semi-denaturing detergent agarose gel electrophoresis (SDD-AGE)	222
2.5.7 Capillary transfer of proteins	223
2.5.8 Western blotting	223
2.6 Extraction and purification of recombinant proteins from <i>E.coli</i>	224
2.6.1 Extraction and purification of native α -synuclein.....	224
2.6.2 Extraction and purification of NOS1AP fragments	225
2.7 Analysis of the protein aggregation.....	226
2.7.1 Aggregation of α -synuclein <i>in vitro</i>	226
2.7.2 Aggregation of the NOS1AP(292-390) fragment <i>in vitro</i>	226
2.7.3 Protein staining with thioflavin T	226
2.7.4 Analysis of protein aggregation kinetics.....	226
2.7.5 Protein concentration measurements.....	228
2.8 Statistical analysis	228
2.9 Microscopy	229
2.9.1 Fluorescence microscopy	229
2.9.2 Transmission electron microscopy.....	229

2.9.3 Polarized light microscopy.....	229
2.10 Search for potentially amyloidogenic regions of NOS1AP	230
3. RESULTS	231
3.1. Bioinformatics search for the region of NOS1AP responsible for aggregation	231
3.2 NOS1AP and its fragments aggregate in different model systems.....	232
3.2.1 Investigation of the amyloid properties of NOS1AP and its fragments in the C-DAG system	232
3.2.2 Analysis of the aggregation of NOS1AP protein and its fragments in <i>S. cerevisiae</i> yeast cells	234
3.2.3 Analysis of the aggregation of NOS1AP and its fragments in mammalian cell culture	236
3.2.4 Analyses of the detergent-resistance of NOS1AP aggregates	239
3.2.5 HEK293T cell viability with NOS1AP overproduction	240
3.3 Interaction of NOS1AP and its fragments with α -synuclein	241
3.3.1 Physical interaction of NOS1AP and its fragments with α -synuclein in HEK293T cells.....	241
3.3.2 Colocalisation of NOS1AP and its fragments with α -synuclein in <i>S. cerevisiae</i> yeast cells	243
3.4 Coaggregation of NOS1AP protein fragments with α -synuclein <i>in vitro</i>	246
3.4.1 Extraction and purification of native α -synuclein.....	246
3.4.2 Aggregation of α -synuclein <i>in vitro</i>	247
3.4.3 Isolation and purification of NOS1AP(292-390) and NOS1AP(391-506) fragments.....	248
3.4.4 Replication of the methodology for the analysis of α -synuclein aggregation kinetics <i>in vitro</i>	250

3.4.5 Coaggregation of NOS1AP(292-390) and NOS1AP(391-506) fragments with α -synuclein	252
4. DISCUSSION.....	255
4.1 NOS1AP aggregation.....	255
4.2 Interaction of NOS1AP with α -synuclein.....	260
5. CONCLUSIONS	266
6. REFERENCES	267
ACKNOWLEDGEMENTS	306

LIST OF ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

- 6xHis — tag consisting of six histidine residues;
- AA-amyloidosis — reactive amyloidosis;
- ALS — amyotrophic lateral sclerosis;
- AMP — antimicrobial peptides;
- BF — bright-field;
- BiFC — bimolecular fluorescence complementation;
- BME — β -mercaptoethanol;
- bp — base pair;
- C-DAG — curli-dependent amyloid generator;
- CNS — central nervous system.
- CRES — cystatin-related epididymal spermatogenic;
- CsgAss — CsgA signal peptide;
- CST3 — cystatin C;
- eNOS/NOS-III — endothelial NOS;
- FL — full-length;
- FRET — Förster resonance energy transfer;
- iNOS/NOS-II — inducible NOS;
- IPTG — isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside;
- MTT — thiazolyl blue tetrazolium bromide;
- NAC — non-amyloidal component;
- NMDA — N-methyl-D-aspartate;
- nNOS/NOS-I — neuronal NOS;
- NO — nitric oxide;
- NOS — nitric oxide synthase;
- POL — polarized light;
- PrP^C — PrP normal cellular isoform (клеточная изоформа PrP);
- PrP^{Sc} — PrP scrapie isoform;
- PTB domain — phosphotyrosine-binding domain;

RHIM — Rip homotypic interaction motif;

SDD-AGE — semi-denaturing detergent agarose gel electrophoresis;

SDS-PAGE — polyacrylamid gel electrophoresis with SDS;

SEMG1 — semenogelin 1;

ThT — thioflavin T;

TTR — transthyretin;

v/v — volume per volume;

V1 и V2 — fluorescent protein fragments derived from Venus;

w/v — weight/volume;

WT — wild type;

α Syn — α -synuclein;

β 2M — β 2-microglobulin;

INTRODUCTION

The relevance of the topic. Amyloids are protein aggregates with a cross- β structure that may have a number of unusual properties, such as resistance to detergents, proteases, and interaction with amyloid-specific dyes (see reviews [1–4]). Numerous studies on amyloids are especially relevant today due to the increasing incidence of diseases they cause, such as Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's diseases, type 2 diabetes, etc. The discovery of amyloidogenic proteins capable of coaggregating with each other demonstrated the presence of a new type of intermolecular interactions. Available data suggest that such relationships play a role in the pathogenesis of human amyloid diseases. Numerous examples of coaggregation of proteins associated with various amyloidoses are now known, in particular: amyloid- β and α -synuclein [5], amyloid- β and amylin [6], Csg proteins and α -synuclein [7], amyloid- β and PrP [8,9]. To identify new examples of protein coaggregation with already known pathological human amyloids, we performed an analysis using the ArchCandy algorithm [10], which made it possible to identify such potential α -synuclein prone to aggregation protein “partners”.

According to bioinformatic predictions made in our laboratory, we have suggested that the NOS1AP protein is potentially amyloidogenic and can physically interact with α -synuclein. Interest in it is due to the fact that, according to proteomic studies, it can physically interact with α -synuclein (Figure 1).

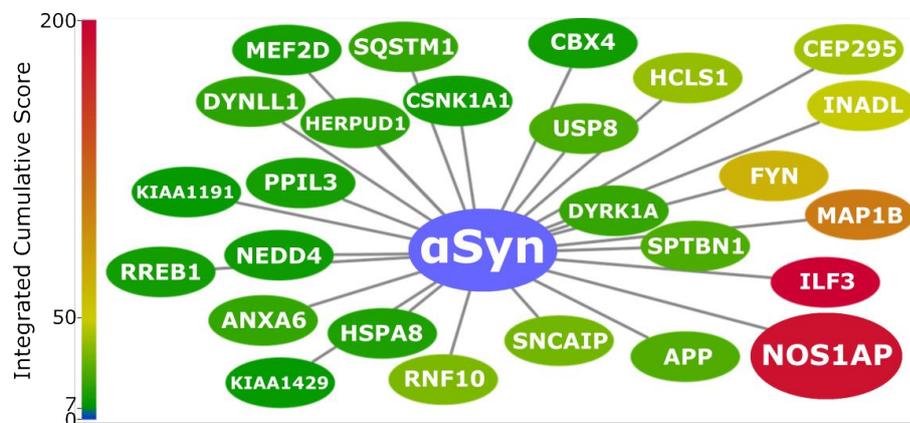


Figure 1. Fragment of a network of potentially amyloidogenic human proteins physically interacting with α -synuclein. A network of proteins that can physically interact with α -synuclein (α Syn) according to the BioGRID database. The color reflects the ArchCandy Integrated Cumulative Score.

NOS1AP is thought to be involved in the development of schizophrenia and several other psychiatric disorders [11]. Given the available data on the coexistence of parkinsonism and schizophrenia [12], the possibility of coaggregation of NOS1AP and α -synuclein, as well as the clinical significance of this interaction, can be assumed.

The extent of development of the topic. When studying the coaggregation of amyloids, the already known proteins are mainly studied [13]. In the case of human amyloid proteins, attention is often drawn to those examples that may be associated with pathological processes leading to various diseases. Amyloidization of α -synuclein can be triggered by itself or in the presence of other intrinsically disordered proteins [14]. The conformational plasticity of α -synuclein allows it to interact with various protein "partner", such as the islet amyloid polypeptide (IAPP) [15], prion protein (PrP) [16], A β peptide [5,17] and tau [18,19]. The literature describes a large number of genes that may be associated with the development of schizophrenia [20,21]. One of them is the NOS1AP gene encoding the nitric oxide synthase 1 adaptor protein (NOS1AP) [22–24]. However, the properties of this protein to aggregate have not been studied. It is worth noting that NOS1AP has been shown to influence tau aggregation and neurodegeneration in mice, suggesting a role for NOS1AP in proteinopathies [25]. On the other hand, there is a single mention that the NOS1AP protein can physically interact with α -synuclein [26]. At the same time, targeted verifications of this interaction were not carried out.

Purpose of the work: to study the possibilities of aggregation of the NOS1AP protein and its fragments, as well as its ability to interact with α -synuclein *in vivo* and *in vitro*.

The following objectives were formulated to achieve the goal:

1. To evaluate the ability of the NOS1AP protein and its fragments to form aggregates in various model systems.
2. To study the interaction of NOS1AP protein and its fragments with α -synuclein in *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells and HEK293T human cell culture.
3. To evaluate the effect of the NOS1AP protein on α -synuclein aggregation *in vitro*.

Scientific novelty of the work. This work shows for the first time the ability of the NOS1AP protein to form aggregates resistant to detergents when overproduced in yeast and human cells. In the NOS1AP protein sequence, regions prone to aggregate are mapped. The cytotoxic effect of NOS1AP overproduction in HEK293T cells was demonstrated. The physical interaction of NOS1AP proteins and α -synuclein in yeast and human cells has been shown for the first time. The NOS1AP(292-390) fragment was found to accelerate the aggregation of α -synuclein *in vitro*.

Theoretical and practical significance of the work. The results obtained during the dissertation research allow us to offer new details of the molecular mechanisms of the development of diseases such as schizophrenia and Parkinson's disease. Based on the data obtained, it is suggested that overproduction of the NOS1AP protein results in its aggregation, which, on the one hand, leads to sequestration and inactivation of nitric oxide synthase 1, and, on the other hand, to coaggregation with α -synuclein and acceleration of its fibrillation.

Methodology and methods of research. In the course of the work, a number of modern research methods were used, including molecular biology techniques of working with nucleic acids and proteins, biochemical methods of analysis, fluorescence, polarization and electron microscopy. Experiments were carried out on various model systems such as bacteria, yeast and human cell cultures. As part of the dissertation research, methods for the analysis of protein-protein interactions, such as bimolecular fluorescence complementation and colocalization of proteins with fluorescent labels, were applied. Bioinformatic algorithms were used. A method for monitoring the aggregation kinetics of α -synuclein was also polished and applied.

Main points made for the defense. It has been shown that overproduction of the NOS1AP protein and its fragments can lead to the formation of stable detergent-resistant aggregates in *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells and HEK293T human cell culture. The NOS1AP protein, as well as its fragments, physically interact with and coaggregate with α -synuclein in yeast and human cells. The addition of the NOS1AP(292-390) fragment accelerates the aggregation of α -synuclein *in vitro*.

The degree of validity and approbation of the results. The main results of the thesis work were presented at 4 international conferences.

Dissertation materials are presented in publications:

1. Matiiv, A. B., Moskalenko, S. E., Sergeeva, O. S., Zhouravleva, G. A., & Bondarev, S. A. NOS1AP Interacts with α -Synuclein and Aggregates in Yeast and Mammalian Cells // International Journal of Molecular Sciences. 2022. Vol. 23, no. 16. P. 9102.
2. Матиив, А.Б., Трубицина, Н.П., Матвеевко, А.Г., Барбитов, Ю.А., Журавлева, Г.А., Бондарев, С.А. Амилоидные и амилоидоподобные агрегаты: многообразие и кризис термина // Биохимия. 2020. Т. 85, №. 9, С. 1213–1239.
3. Матиив, А.Б., Трубицина, Н.П., Матвеевко, А.Г., Барбитов, Ю.А., Журавлева, Г.А., Бондарев, С.А. Структура и полиморфизм амилоидных и амилоидоподобных агрегатов // Биохимия. 2022. Т. 87, №. 5, С. 587–602.

The scope and structure of the work. The dissertation work consists of an introduction, a literature review, a materials and methods, results, a discussion, conclusions and a list of references containing 373 references. The work is presented on 147 pages, contains 36 figures and 8 tables.

1. LITERATURE REVIEW

1.1 History of amyloids

The term "amyloid" was introduced into the scientific literature by the German botanist Matthias Schleiden. He used starch to study the chemical and anatomical composition of the plant cell. This test, based on the reaction of blue staining of starch in the presence of iodine and sulfuric acid, was originally described by Jean-Jacques Colin and Henri-François Gaultier de Claubry in 1814. Schleiden used the term "amyloid" (from the Latin word "amylum", starch) by analyzing plant samples with this method [27].

The term "amyloid" in the medical literature was first used by the German pathologist Rudolf Virchow. He used the term in 1854 to describe pathological deposits in the nervous system that showed a positive color reaction with iodine and sulfuric acid. This allowed Virchow to suggest that these structures are identical to starch [27]. Later, using a test using iodine and sulfuric acid, he showed amyloid deposits in other tissues [28]. In the future, the study of amyloids continued with the use of histological stains: Congo red and thioflavin [29].

With the help of X-ray diffraction in the 1930s, structural studies of amyloids began. William Thomas Astbury and Sylvia Dickinson in 1935 described a characteristic radiograph, later called "cross- β ". Alan Cohen and Evan Calkins in 1959 with electron microscopy noted amyloid deposits with a fibrillar structure of $\sim 7.5\text{--}14$ nm in width and $\sim 100\text{--}1600$ nm in length in rabbit and human tissues [29]. Subsequently, it was demonstrated that, in aggregates, β -strands are oriented perpendicular to the fibril axis and form intermolecular β -layers. In one β -layer, the gap between β -strands is $4.7\text{--}4.8$ Å. The protofibril contains at least two β -layers, and the distance between them is about 10 Å. In studies of electron or X-ray diffraction, such a regular structure forms a characteristic pattern with two meridional and two equatorial reflections (Figure 2) [30,31].

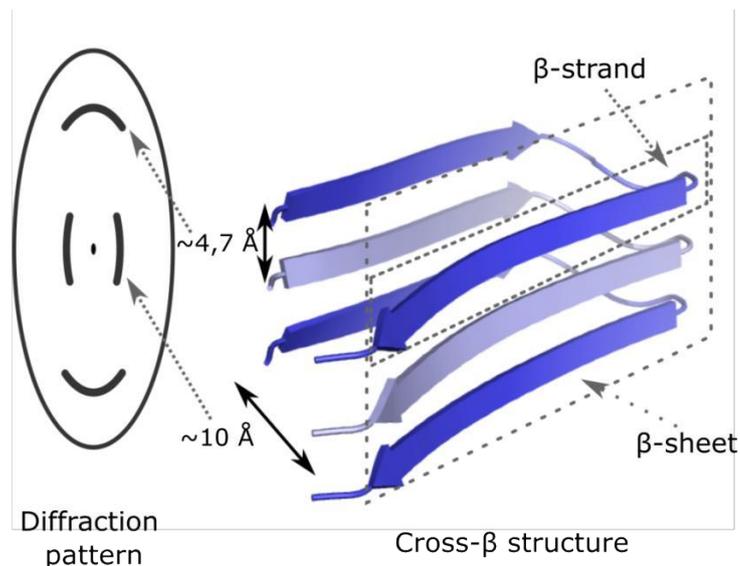


Figure 2. Cross- β structure of amyloids. Distances between β -strands and β -sheets in amyloid aggregates with a cross- β structure and the corresponding scheme of the diffraction pattern. Colors indicate different protein molecules alternating in the composition of the fibril. PDB ID of the structure used in the preparation of the figure: 2BEG [30].

Subsequently, other special properties of amyloid aggregates were noted. For example, some amyloids are less affected for proteolytic cleavage than the same protein in its native form. In addition, they are very stable and insoluble in the presence of detergents [32]. In the study of yeast amyloid aggregates, a number of methods have been developed using various modifications of electrophoresis. Now they are successfully used to analyze the resistance to detergents or proteases in aggregates of various origins [33].

A large number of amyloids are capable to induce the aggregation of soluble molecules of the same protein they are composed from. In dynamics, this process is most often studied *in vitro* using purified protein and amyloid-specific dyes [34]. This characteristic is inherent in infectious amyloids, or prions, of which PrP is an example [35]. Identification of new amyloids *in vivo* can be carried out using the C-DAG approach (curli-dependent amyloid generator), in which the aggregation of the studied protein is assessed by the appearance of fibrils on the surface of bacterial cells [36].

1.2 Amyloid diversity

1.2.1 Pathological amyloids

In clinical practice, the term "amyloid" often refers to a homogeneous extracellular deposit that specifically stains with Congo red and exhibits an apple-green fluorescence at birefringence in polarized light, and also has a characteristic fibrillar ultrastructure [37]. At the same time, many authors do not distinguish between extracellular and intracellular aggregates demonstrating amyloid properties. Moreover, even inclusion bodies that stain with Congo red are often also called amyloids. Such examples can be intranuclear aggregates in Huntington's disease and Lewy bodies in Parkinson's disease [38].

Currently, there are about 50 different proteins and peptides that have been discovered to form amyloids and amyloid-like aggregates, leading to human diseases, including Alzheimer's, Huntington's and Parkinson's diseases, type 2 diabetes, and a number of systemic and local amyloidoses [37,39]. Many of these diseases are fatal and incurable, and the risk of developing them increases with age [40].

The development of pathologies during protein amyloidogenesis is connected with aggregates accumulation in the form of extracellular plaques or intracellular inclusions [31]. The presence of a large amount of amyloid material can destroy the tissue structure and mechanically affect the functions of the affected organs [41]. At the same time, there is an assumption that oligomers and non-fibrillar amyloid deposits may be toxic [42].

Amyloidoses are a heterogeneous group of diseases in which abnormal deposition of misfolded insoluble proteins in the extracellular space occurs, leading to organ dysfunction [43]. It is possible to distinguish differences in the pathogenesis between localized and systemic amyloidoses: in the first case, the amyloidogenic protein is synthesized close to the site of deposition, in the second case, the protein is synthesized in one or several organs, and then transported by blood plasma to the site of amyloid fibrils formation [42]. Of particular note a large group of neurodegenerative diseases

that can be distinguished, which are associated with the formation of amyloid and amyloid-like aggregates.

1.2.1.1 Systemic amyloidoses

Amyloid fibrils can be formed from chains of immunoglobulins. Immunoglobulin light chain amyloidosis (AL-amyloidosis) is the most common form of systemic amyloidosis (about 70% of all cases) [44]. This disease is often seen in people with monoclonal gammopathy, a class of diseases characterized by the proliferation of clones of plasma cells and, as a result, the presence of monoclonal immunoglobulin light chains (Ig-LC). Organ damage results in amyloid formation due to increased production of Ig-LC [45]. Less is known about the rarer light and heavy chain amyloidosis (AHL amyloidosis) and heavy chain amyloidosis (AH amyloidosis) [46], which are clinically similar to AL amyloidosis.

The most common hereditary disease in this group is transthyretin amyloidosis, which is caused by mutations that destabilize the transthyretin tetramer (TTR), which is responsible for the transport of the hormone thyroxine and vitamin A [47]. This leads to the deposition of TTR aggregates in the myocardium, nerves, and other tissues. This disease also includes senile systemic amyloidosis, an acquired disorder caused by TTR deposits, which manifests itself mainly in men over 60 years of age [47]. Another common pathology is reactive amyloidosis (AA-amyloidosis), a disease associated with persistent high concentrations of serum amyloid A (SAA) in plasma or specific tissues during inflammatory processes. This leads to extracellular protein deposits with subsequent damage mainly to the kidneys, spleen, liver, adrenal glands and lymph nodes [48].

In patients with renal failure, or who are on dialysis, the presence of amyloid deposits is due to increased levels of circulating β_2 microglobulin (β_2 M) in the blood [49]. This pathology, also called dialysis amyloidosis, is caused by deposits of full-length β_2 M of the predominantly wild-type. However, there is also an inherited form of the disease resulting from mutations in the gene encoding β_2 M, which results in the synthesis of an aggregation-prone protein [49].

A large group of systemic amyloidoses are diseases associated with apolipoprotein deposits. For example, apolipoprotein A-I (ApoAI)-associated amyloidosis can present as either a non-hereditary form with deposits of wild-type protein or as a hereditary form with deposits of protein variants with substitutions [50]. In rare cases, hereditary amyloidoses can be caused by aggregation of mutant forms of gelsolin, fibrinogen α -chain (FGA), cystatin C (CST3) and lysozyme [37,39,42]. Aggregation and the presence of toxic deposits of misfolded A β , Ig-LC, TTR, α -1-antitrypsin, albumin and ceruloplasmin in the placenta and bodily fluids are found in pre-eclampsia, a pregnancy complication that is a frequent cause of maternal and fetal death [51,52]. However, it is not known which protein plays a key role in the development of this disease [52].

Familial British dementia is an autosomal dominant disease characterised by ABri amyloid deposits [53], the main component of which is a peptide encoded by the *BRI2* gene. A mutation in this gene results in the replacement of the stop codon with arginine and consequent elongation of the protein [54]. Interestingly, another mutation in this gene (a 10-nucleotide duplication before the stop codon) results in the amyloid peptide ADan, whose accumulation and deposition is no longer associated with systemic amyloidosis, but with local amyloidosis – familial Danish dementia [55,56].

1.2.1.2 Localized amyloidoses

This section will look at examples of local amyloidoses that do not involve the central nervous system (CNS). The most common case is aortic amyloidosis caused by aggregation of medine, a cleavage product of the glycoprotein lactadherin [57].

Localised amyloid and amyloid-like aggregates are also found in tumour tissues. Thyroid medullary carcinoma is associated with transformation of parafollicular C-cells and increased levels of calcitonin, a thyroid hormone, and the consequent formation of amyloid deposits of this protein [58]. Non-functional amyloid-like oligomers of p53, which is an oncosuppressor [59], spherical prolactin deposits [60] and odontogenic ameloblast-associated protein (ODAM) deposits [37], are also identified in tumours. Other hormones whose aggregation leads to pathology are islet amyloid polypeptide

(IAPP) or amylin. The formation of insoluble amyloid fibrils of this protein is a feature of Langerhans islets in most people with type 2 diabetes [61].

The likelihood of developing a number of local amyloidoses may be related to the ageing process. An example of age-related disease is isolated atrial amyloidosis, characterised by the presence of atrial natriuretic factor (ANF) amyloid fibrils [62]. Aging amyloidosis can result in aggregation of semenogelin 1 (SEMG1) in seminal vesicular epithelial cells [63]. Corpuscles, whose components are heterodimers of S100A8 and S100A9 (S100A8/A9) proteins, are found in the prostate gland in middle-aged and elderly men [64].

Amyloid deposits of corneodesmosin (CDSN) [65], galectin-7 [66] and keratins (CK5, CK14) lead to skin diseases [67]. Mutations in the *TGFBI* gene encoding keratoepithelin (TGFBI) have been associated with various forms of corneal dystrophy [68]. Aggregation of lactoferrin, an iron-binding glycoprotein, leads to the same pathology [69].

Insulin can form amyloid fibrils at the site of drug injection in diabetic patients, causing injectable amyloidosis [70]. Injections of enfuvirtide, a synthetic peptide that blocks HIV-1 fusion with the host cell, can have a similar effect [71].

1.2.1.3 Neurodegenerative diseases

Amyloidoses affecting the CNS have been studied most extensively. Peptide A β , a fragment of the precursor protein β -amyloid (APP), was first identified as a major component of amyloid deposits in patients with Alzheimer's disease. Although the function of APP itself is not fully understood, its processing has been studied in detail: both β - and γ -secretases are responsible for it. Cutting by γ -secretase is imprecise, resulting in peptides 36-43 amino acids long, including amyloidogenic A β 40, A β 42 and A β 43 [61,72]. The most abundant fraction (~80-90%) is the A β 40 variant and the second most abundant is the A β 42 variant (about 5-10% of all variants). A β 42 is the most hydrophobic and more prone to aggregation [73]. However, the A β peptides exhibit different toxicity. For example, the A β 43 variant appears to be the most cytotoxic, while A β 40 shows less effect on cell viability [61]. Notably, A β 40 and A β 42

are capable of forming polymorphic fibrils whose structure may determine the rate of progression of Alzheimer's disease [74]. Amyloids, which form tau, a neuron-specific protein, are also associated with this disease [75]. In the brains of Alzheimer's patients, tau separates from the microtubules with which it is normally associated, loses its ability to stabilise them and forms neurofibrillary tangles [76].

The α -synuclein protein forms intracellular amyloid aggregates found in Lewy bodies in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies, in glial cytoplasmic inclusions in patients with multiple systemic atrophy and in axonal spheroids in neuroaxonal dystrophies [61,77]. Inclusions of α -synuclein are also detected in patients with Alzheimer's disease [78]. More details about α -synuclein will be described in section 1.3.

Huntington's disease is an inherited neurodegenerative disease caused by mutations in the gene encoding the protein huntingtin (*htt*). These mutations lead to an increase in the number of polyglutamine (PolyQ) repeats that cause protein aggregation [79,80]. The length of PolyQ repeats is important for disease progression. Huntingtins with 6-35 PolyQ repeats do not cause disease. However, *htt* with more than 36 PolyQ repeats leads to the development of Huntington's disease [81,82].

The ability of amyloids to induce their own assembly, to be transmitted from cell to cell or even from organism to organism, causing the spread of disease, is a characteristic feature of prions. An important condition for their transmission is fragmentation. In humans, they are associated with the accumulation of the prion isoform (PrP^{Sc}) of the cellular prion protein PrP^{C} in the tissue. These diseases include Creutzfeldt-Jakob disease, iatrogenic, fatal familial insomnia and Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome (hereditary variant of Creutzfeldt-Jakob disease) [31,83]. Hereditary prion diseases are caused by mutations in the prion protein gene (*PRNP*). In particular, more than 60 mutations are known to be associated with a variety of clinical syndromes [84]. In animals, prion infections include scrapie in sheep, spongiform encephalopathy in cattle, and chronic wasting disease in deer and elk [31].

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disease. More than 180 mutations in the gene encoding cytoplasmic superoxide dismutase

(*SOD1*) are known [85], and account for about 20% of inherited cases of ALS [61]. The toxicity of mutant forms of SOD1 in ALS has been attributed to inappropriate folding and a tendency to aggregate. It is worth noting that the presence of cytoplasmic aggregates of TDP-43 and FUS proteins has also been reported in some ALS cases [61].

1.2.2 Functional amyloids

The formation of amyloid aggregates was initially considered in connection with pathological processes, but it was later discovered that amyloid fibrils can perform various physiological functions in organisms from prokaryotes to mammals. For example, in humans, functional amyloids have been suggested to be involved in a variety of physiological processes, such as pigmentation, peptide hormone storage, oocyte fertilization, antimicrobial action and more.

1.2.2.1 Amyloids in cell wall composition and cell adhesion processes

Some proteins, included in the cell wall or associated with it, are capable of forming amyloid and amyloid-like aggregates. Such proteins contribute to the maintenance of the structure and integrity of the cell wall or other cell membrane structures, as well as participate in cell adhesion to each other or to a substrate.

The cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* yeast are capable of forming amyloid and amyloid-like aggregates. One such protein is glucantransferase Bgl2. The formation of amyloid fibrils has been shown for this protein *in vitro* [86]. Subsequently, the cell adhesion proteins Flo1 and Muc1 were also found to form fibrils. Amyloid properties have been demonstrated for these proteins in the *in vivo* system. Proteome screening allowed the detection of other proteins forming detergent-resistant aggregates in the cell wall: Gas1, Gas3, Gas5, Toh1 and Ygp1. Only three of them were analysed in detail: Gas1, Toh1 and Ygp1. The *GAS1* gene encodes for beta-1,3-glucanosyltransferase, whereas the functions of Toh1 and Ygp1 proteins have not been established. The Toh1 protein is bound to the cell membrane via the GPI anchor and presumably contributes to cell wall structure stabilization through fibril formation [2].

Another example of functional amyloids localised in the cell wall is associated with the formation of *Streptomyces coelicolor* aerial hyphae. The first eight proteins that have been identified as part of these structures have been named chaplins and the individual proteins have been designated ChpA-H [87]. Amyloid properties have been shown for ChpD-H proteins *in vivo*, but these results were obtained on mixtures of proteins from detergent-resistant fractions. The RdlA and RdlB proteins, which form an additional protein layer on top of Chaplins, are also involved in the formation of *S. coelicolor* aerial hyphae [87]. Despite the high sequence similarity of these two proteins (>90%), only RdlB can form fibrils *in vitro* [87].

Amyloids are responsible for the hydrophobic properties of the surface of aerial hyphae of fungi. Hydrophobin proteins (hydrophobins) are capable of performing a similar function: among them EAS (in *Neurospora crassa*) and SC3 (in *Schizophyllum commune*), which are the best known examples of amyloids [2,88]. Other proteins from different fungal species (RodA, MPG1, NC2, DewA, Rep1) have the following properties: their involvement in the formation of fibrillar structures on the cell surface, high resistance to detergents, and interaction with thioflavin T have been shown [89–92]. Among eukaryotes, similar examples have also been found in *Candida albicans* (Als1, Als5, Eap1) [93,94].

A number of bacterial proteins have been discovered whose aggregation is associated with biofilm formation and adhesion to the substrate. CsgA protein from *Escherichia coli*, as well as its numerous orthologues, are the best known examples [95]. These proteins are essential for the formation of fibrils called curli on the cell surface and the formation of the extracellular matrix in bacterial biofilms [88,96]. A similar function has been proposed for other proteins. The proteins TasA of *Bacillus subtilis*, Bap of *Staphylococcus aureus* and FapC of *Pseudomonas fluorescens* also form fibrils on the surface of bacteria. Amyloid properties have been shown for them [88,96,97]. The MTP protein forms fibrillar aggregates on the surface of *Mycobacterium tuberculosis* [98]. Inhibition of the fibrillation proteins P1, WapA and SMU_63c of *Streptococcus mutans* bacteria inhibits biofilm formation [99]. Detergent-resistant aggregates in *Salmonella enteritidis* cells form AgfA and AgfB proteins

[100,101]. It has also been suggested that the Sbp protein of *Staphylococcus epidermidis* is also amyloid, as it forms fibrils that stain with amyloid-specific dyes [102].

1.2.2.2 Amyloids in natural fibers

In 1968, a study of lacewing silk of the genus *Chrysopa* using X-ray diffraction showed that the distance between β -strands along the fibril axis is $\sim 4.7 \text{ \AA}$ [31], which is a property characteristic of cross- β structure. Fibroin secreted by the mulberry silkworm *Bombyx mori* forms amyloid-like fibrils under *in vitro* conditions with an unusual structure in which the β -strands are parallel to the fibril axis [103]. Spider silks or spideroins are natural polymers that are characterised by exceptional strength and elasticity. A transition from a conformation based on α -helices and disordered regions to a β -sheet-enriched structure has been observed for them, which is similar to the formation of amyloid fibrils. Spidroin fibrils were detected by electron microscopy in *Nephila edulis* [2]. The minispidroin eADF-4(C16), based on recurrent ADF-4 regions of *Araneus diadematus*, forms fibrils with a cross- β structure [2] and is able to trigger amyloid-like fibril formation under *in vitro* conditions [104]. It is worth adding that one of the latex proteins from *Hevea brasiliensis*, REF (Hevb1), forms aggregates with amyloid-like properties under physiological conditions *in vitro* [105,106].

1.2.2.3. Amyloids in signaling processes

Intracellular signal transmission is based on conformational changes in proteins. Amyloid formation is also a change of conformation. A clear example of functional amyloids involved in signal transduction is the human protein pair RIPK1 and RIPK3, whose co-aggregation (coaggregation) is required to trigger necroptosis [107,108]. Many amyloid properties have been shown for these proteins *in vitro* and *in vivo*. RHIM (from Rip homotypic interaction motif) sequences are located at sites required for aggregation and implementation of the signaling cascade [107].

Similar motifs have been found in other proteins in various organisms [109], including the well-studied amyloid HET-s of *Podospora anserina*. Infective aggregates

of this protein give rise to prion [*Het-s*]. This cytoplasmic factor is necessary to trigger the incompatibility reaction of heterokaryons. The fusion of hyphae from different organisms, one of which carries this prion and the other does not, leads to programmed cell death. This process is triggered by the interaction of HET-s amyloid aggregates with the HET-S monomeric protein (products of different alleles of the same gene) that ended up in the same heterokaryon after cell fusion [110]. Subsequent aggregation of HET-S leads to a change in its conformation, enabling it to be incorporated into the cell membrane, compromising its integrity [111].

A further search for RHIM among other *P. anserina* proteins revealed another participant in this signalling cascade, the NWD2 protein. This protein is capable of triggering HET-s aggregation, which subsequently leads to cell death [112]. HELLP, SBP and PNT1 proteins of the fungus *Chaetomium globosum*, also carry RHIM and are possibly functional analogues of the HET-s, HET-S, and NWD2 system [113].

Cryptic RHIMs (cRHIM) were found in the *Drosophila melanogaster* proteins PGRP-LC, PGRP-LE and Imd, which are involved in triggering the antimicrobial response. According to the proposed model, aggregation of these proteins is a key event in signal transduction [114]. Since RHIMs have been found among various proteins related to signalling processes [115], we can expect to describe new functional amyloids.

Cell recognition of viral RNA initiates a signal transduction cascade that leads to the initiation of an antiviral response. The MAVS protein is one of the recently discovered participants in such signalling. This protein performs its function in an aggregated form. MAVS comprises a C-terminal transmembrane domain, through which it binds to the mitochondrial membrane, an N-terminal caspase-recruiting CARD domain exposed inside the cytosol, and an intermediate site that recruits downstream signalling molecules. The CARD domain interacts with the same site of the RIG-1 and MDA5 receptor proteins that recognize foreign RNA, triggering a cascade of antiviral response. In doing so, MAVS forms complexes that initiate aggregation of other MAVS molecules [116].

MAVS aggregates exhibit a number of properties characteristic of amyloids but have a special structure, so they do not interact with Congo red and thioflavin T dyes. MAVS proteins do not undergo conformational transitions of α -helices into β -sheets when they are aggregated (Figure 3). Two models of aggregates of this protein were proposed based on cryo-electron microscopy data. In both cases, MAVS filaments consist of individual protein subunits stacked on top of each other to form a central pore [116].

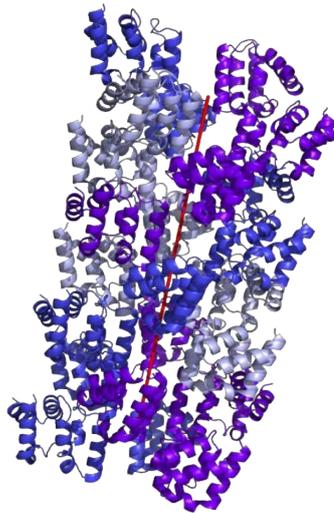


Figure 3. Model of the MAVS aggregate. The red line indicates the conditional axis of the fibril. Colours indicate alternating protein molecules. Identifier of the structure used in the preparation of the figure in the PDB database ID: 3J6C [30].

1.2.2.4 Toxins and antimicrobial peptides

Antimicrobial peptides (AMPs) are protective peptides found in many organisms that are part of innate immunity. Most AMPs are cationic and amphiphilic α -helical protein molecules. Their principle is to bind to the negatively charged bacterial membrane and disrupt its integrity [117]. Amyloid properties have been reported for some AMPs, which are presumably important for their function.

LL-37 was the first discovered human antimicrobial cationic peptide [118]. During bacterial invasion, proteases cut the precursor of hCAP-18, resulting in the peptide. LL-37 forms fibrous aggregates *in vitro* that stain Congo red and are

characterised by an apple-green birefringence in polarized light [118]. Fibrils formed by the short LL-37 fragment do not bind thioflavin T and have a structure uncharacteristic of amyloid: they consist of tightly packed amphipathic α -helices [119]. It has been shown that LL-37 protein aggregation can be directly related to its cytotoxicity [118].

The dermaseptins Drs S9 and aDrs PD-3-7 have been isolated from frog skin. They form β -layer-enriched fibrils for which several amyloid properties have been shown [120–122], but, as for many AMPs, no *in vivo* confirmation for them. In the skin of the frog *Xenopus laevis*, magainins have been found to have antimicrobial [123,124] and antitumour effects [125,126], and also to demonstrate amyloid properties. An antimicrobial mechanism with toroidal pore formation was first proposed for them. Magainins bind to the membrane and, reaching a threshold concentration, cause it to deform and destabilise. The peptides are then incorporated into the membrane, forming a toroidal pore [127]. Protegrin-1 (PG-1), a human AMP, forms fibrils *in vitro* that are specifically stained with thioflavin T. Protegrins are in an insoluble state in neutrophil and macrophage granules. When the pathogen enters the cell, the granules fuse with the vacuole, resulting in the release of peptides that form channels in the pathogen membrane, leading to its death [128]. Known protegrins with amyloid properties also include PG-4, isolated from porcine leukocytes. It has been shown to form fibrillar aggregates under *in vitro* conditions, which stain with Congo red and thioflavin T. PG-4 monomers and aggregates exhibit antimicrobial activity against *B. subtilis* [129]. Microcin E492 is a known pore-forming bacterial toxin produced by *Klebsiella pneumoniae* RYC492. It has been shown to be capable of forming β -layer-rich amyloid-like fibrils *in vivo* and *in vitro* [130]. Another example of a bacterial toxin is the PSM α 3 protein of *S. aureus*, which forms cross- α -structured fibrils that bind thioflavin T. There is evidence that the fibrils are toxic to human cells [131].

Human small intestine Paneth cells produce α -defensin 6 (HD6), which provides protection against infection by intestinal pathogens [132]. By binding to bacterial surface proteins, HD6 undergoes orderly self-assembly to form fibrils and nanogrids that surround and entangle pathogens. This creates an obstacle to physical contact

between bacteria and epithelial cells, which is necessary for attachment or invasion [132].

Amyloid-like AMPs have also been found in plants. Cn-AMP2, isolated from the liquid endosperm of the coconut *Cocos nucifera*, forms visible aggregates in aqueous buffer that bind Congo red, thioflavin T, and have a fibrillar morphology. However, there is currently no direct evidence that Cn-AMP2 has an antibacterial effect solely in its aggregated form [133].

It is worth noting that the proteins associated with human amyloidoses may also behave as toxins. For example, A β exhibits antimicrobial properties that target pathogenic bacteria and fungi *in vitro* and in model systems: in the nematode *Caenorhabditis elegans* and mouse [134,135]. Antimicrobial properties have been demonstrated for other amyloidogenic proteins, such as lysozyme. Its antimicrobial activity leads to permeabilisation of the pathogen cell membrane, presumably through pore formation [136].

1.2.2.5 Amyloids in memory processes

The presence of amyloids in the central nervous system has long been associated exclusively with pathologies. However, much has changed with the discovery of functional amyloids in the mollusk *Aplysia californica* CPEB protein and its homologues, *D. melanogaster* Orb2 and mouse CPEB3. CPEB proteins are RNA-binding, and they bind RNA better in the oligomerized state [137]. CPEB oligomerization in the brains of the animals studied occurs in response to neuronal stimulation [138,139]. If CPEB proteins do not form aggregates, this negatively affects long-term memory maintenance in *A. californica* and *D. melanogaster* [137,138]. These data suggest that CPEB proteins are functional precisely in the aggregated state. Researchers also refer to these proteins as functional prions [139], which is probably without sufficient justification since the *in vivo* infectivity of CPEB of *A. californica* and mouse CPEB3 has only been demonstrated in the yeast system [139,140]. Until recently, there was no direct evidence that this group of proteins forms amyloid aggregates directly in living organisms without artificial overproduction. However, the

amyloid nature has recently been proven for Orb2 fibrils isolated from *Drosophila* heads. Using cryo-electron microscopy, the structure of amyloid fibrils was reconstructed in high resolution *ex vivo* [141]. Orb2 fibrils exhibit a three-beam symmetry similar to that of A β 40 [141]. Thus, it is clear that amyloid structure alone may not be the cause of CNS pathologies, and an in-depth study of the factors affecting amyloidogenesis of a particular protein is required to understand the real causes of neurodegenerative amyloidosis.

CPEB/Orb2 does not represent the only example of amyloids associated with memory processes. The FXR1 protein, which is involved in the development of long-term memory, has been shown to be present in the rat brain as part of amyloid aggregates. Moreover, it could hardly be detected in the monomeric state. The detected aggregates exhibited amyloid properties. FXR1 is an RNA-binding protein for which it has been shown to be able to bind mRNA in amyloid form, protecting it from the action of RNase [142]. It probably thus affects the translation of certain mRNAs and, as a consequence, differential expression in neurons. Given that FXR1 is found exclusively as part of detergent-resistant aggregates in the rat brain, and that FXR1 is important for the regulation of memory and emotion, it can be assumed that FXR1 is also a functional amyloid. The amyloidogenic fragment of FXR1 is highly conserved in mammals [142], which allows us to extrapolate our results to orthologues of this protein in other organisms.

elihood, amyloids are involved in memory processes not only in the nervous system in animals. Alternative amyloid conformation may carry certain information, which somehow can be "deciphered" on the cellular level, so the use of such aggregates for long-term information storage may be a universal mechanism, which may have been repeatedly and independently realized in evolution. An example of such a cellular memory mechanism may be the existence of so-called "mnemons". They are aggregates of Whi3 protein in yeast that appear in response to failed fusion of cells of opposite mating types and remain in yeast cells for a lifetime as a memory of the past event [143]. Unlike prions, mnemons are not transferred to daughter cells during cell division. However, it is possible that the known prions of lower eukaryotes may also be units of

inheritance of such "memory", which, however, already carry information beyond the life of a single cell for many cell generations.

1.2.2.6 Amyloids related to reproduction

Amyloids have also been found in structures associated with sexual reproduction, such as the sperm acrosome. These fibrils are thought to contribute to the controlled release of proteins during the acrosome reaction, a key event in oocyte fertilization in which the contents of the acrosome are poured out. Amyloids formed by CRES (Cystatin-related epididymal spermatogenic) subgroup proteins such as CRES, CRES2, CRES3 and cystatin E2 (mCST E2) are present in the mouse epididymis [144–146]. In humans, cystatin C (CST3) aggregates have been found in the same organ [146,147]. The role of amyloid aggregates of CRES proteins is not fully understood, but it is suggested that they are functionally important. For example, they have antimicrobial activity, are necessary for the acrosome response, the normal functioning of the lysosomes in the epididymis, and play a role in sperm maturation. Seminal fluid contains amyloids and amyloid-like fibrils formed by fragments of prostatic acid phosphatase (PAP) peptide (PAP) [148] and semenogelin proteins (SEMG1 and SEMG2) [149,150]. Such fibrils, which were originally identified as enhancers of viral infection, bind to damaged spermatozoa and immobilise them for destruction by immune cells. Amyloids formed by the SEMG1 protein have also been found in some pathologies.

Balbani bodies, amyloid-like organelles consisting of mitochondria, endoplasmic reticulum and RNA, are found in oocytes of many vertebrates. Xvelo proteins form the fibrillar networks that make up the matrix of this compartment in *X. laevis*. Such fibrils bind thioflavin T and are resistant to treatment with detergents [151]. Amyloid properties have also been shown for proteins involved in oocyte membrane formation in insects, fish and mammals. The results of X-ray scattering experiments suggest that amyloid structures are present in the chorion of the butterfly *Antheraea polyphemus* [152]. It is worth noting that much of the amyloid properties have been demonstrated for individual peptides of these proteins corresponding to the

tandem repeat region (cA-peptides) [153,154]. In the chorion of bony fish, proteins of the ZPB group are present, whose individual peptides also tend to form amyloid aggregates [155]. Amyloid properties have also been shown for proteins in the glossy membrane (zona pellucida) of the mammalian oocyte. Proteins comprising this shell in mice exhibit characteristic aggregate morphology *in vivo*, as well as the X-ray diffraction pattern typical of a cross- β structure, and are able to bind amyloid-specific dyes [156]. Similar properties have been shown for aggregates of peptide fragments of human ZP1- ZP4 proteins *in vitro* [157]. The formation of amyloid fibrils in the shells of oocytes and embryos in various animals is thought to contribute to protection against elevated temperature, mechanical pressure and other external influences. Structural components of chicken oocytes and *D. melanogaster* egg shells have also been described in the literature *D. melanogaster* that stain with amyloid-specific dyes [158].

Amyloid-like proteins can act as cell cycle regulators and influence yeast sexual reproduction. For example, the detergent-resistant aggregates during the G1 phase of meiosis are formed by Rim4 protein in *S. cerevisiae*. This results in repression of Clb3 cyclin translation and subsequent initiation of division. Disassembly of Rim4 aggregates is triggered by phosphorylation of this protein [159].

1.2.2.7 Hormones and amyloids

The detection of protein fibrils in melanosomes formed by the PMel17 protein allowed the hormones to be linked to functional mammalian amyloids. It has become known that PMel17 in amyloid form is involved in melanin synthesis [160]. Proteolytic cleavage of this protein produces an M α fragment for which amyloid properties have been shown. Furthermore, its conversion to the amyloid form is several orders of magnitude faster than that of A β or α -synuclein [160–162]. It is still unknown which domains of PMel17 are directly involved in the formation of amyloid fibrils in the cell [161–163]. It can be assumed that different proteolysis products of PMel17 undergo the process of amyloidogenesis at different stages of melanosome formation. The fibrils present in the cell are thus complex coaggregates of different PMel17 fragments [164].

The formation of complex aggregates of PMel17 amyloid fibrils appears to maximize the efficiency of melanin synthesis.

Peptide hormones themselves can also form amyloid aggregates, which are thought to be stored in this form in secretory granules. In studies of peptide hormones *in vitro*, 10 showed spontaneous formation of amyloid fibrils, and 31 hormones led to fibril formation in the presence of heparin glycosaminoglycan [165].

An important property of the amyloids of some hormones is their ability to release monomers under conditions corresponding to the release of peptides from secretory granules. In addition, amyloids of only seven hormones have a toxic effect on cells [165]. These observations suggest that amyloids of some hormones may indeed have a hoarding function in the cell. Glucagon amyloid toxicity was found to be twice as strong as A β 40 [165], supporting the evidence that glucagon amyloids can be pathological [166]. Another hormone, prolactin, is found as part of the amyloid in patients with adenoma [167]. The protein semenogelin, aggregates of which are found both in amyloidosis and in normal spermatozoa, has been considered previously. Thus, it is possible that the amyloids of some other proteins found in various pathologies may in fact also be functional amyloids.

1.2.3 Amyloids with an undefined biological role

There is currently no consensus on the role of yeast prions, as there are opinions both for and against their possible functionality [168,169]. Proteins in non-membrane organelles are also capable of forming amyloid aggregates, but it is not always clear whether this feature is necessary for the functioning of these proteins. For example, many proteins in non-membrane organelles may be associated with pathological conditions such as ALS and some types of dementia. There are reports of aggregation of some enzymes and porins, but the functional significance of this phenomenon is not clear.

1.2.3.1 Membraneless organelles and protein aggregates

Non-membrane organelles are dynamic structures in the cell nucleus or cytoplasm that are formed by a collection of a large number of interacting biological molecules that perform a specific set of functions. A large number of such compartments with a variety of cellular functions have been described [170]. Examples of nuclear non-membrane organelles include the nucleus, Cathal's corpuscles, nuclear speckles and histone locus corpuscles. These organelles play an important role in the processes of transcription, maturation of various types of RNA, and ribosome biogenesis [171]. Cytoplasmic non-membrane organelles are associated with phenomena such as the processing, storage and degradation of proteins and mRNA. Examples of such organelles include P-bodies and stress granules [170], as well as the recently discovered A-bodies [172].

Many non-membrane organelles are formed as a result of liquid-liquid phase separation and therefore have liquid properties. This phase separation occurs during the interaction of protein molecules and leads to the formation of 'liquid drop' structures. Proteins of non-membrane organelles interacting with RNA include RNA recognition motifs. Intrinsically disordered sites play an important role in the formation of non-membrane organelles, which determine the ability of these proteins to engage in a variety of intermolecular interactions leading to phase transitions [173–178]. Such fragments often have a specific amino acid composition with low diversity and are called LC-domains. The amino acid composition of sites contributing to phase separation is usually characteristic of prion domains. Therefore, such sites are denoted as prion-like [170].

It is believed that usually non-membrane organelles do not contain aggregates with an amyloid structure in the first stages of formation. Later in the maturation process of these organelles, labile amyloid-like aggregates appear first, followed by stable amyloid fibrils [179–181]. It is worth noting that in ALS and frontotemporal dementia, the formation of amyloid fibrils of components of non-membrane organelles is observed. Whether the formation of amyloid fibrils is a necessary or incidental

property of the proteins in question is still relevant. In addition, aggregates formed by non-membrane organelles differ from typical amyloid fibrils (in particular, aggregates of several such proteins are sensitive to high temperature and detergents [182,183]).

The RNA-binding protein FUS, whose mutant forms are associated with ALS, is involved in P-body formation and is also capable of aggregating and actively interacting with aggregates of other proteins [184]. Its LC-domain is responsible for the formation of FUS aggregates. This fragment (and some parts of it) is designated RAC (from Reversible Amyloid Core). It has been shown to form amyloid aggregates with a fibrillar structure *in vitro* and interacts with amyloid-binding dyes [185,186].

The nuclear ribonucleoproteins hnRNPA1 and hnRNPA2B1 are involved in heteronuclear RNA processing and regulation of gene expression [187]. Mutant forms of these proteins, as well as the wild type, fibrillate *in vitro*. In addition, mutations in the prion-like domains associated with ALS accelerate the aggregation of hnRNPA1 and hnRNPA2B1 proteins [188].

Aggregates of the RNA-binding protein TDP-43 have been found in brain samples from patients with ALS and frontotemporal lobar degeneration (FTLD). This protein does not form long amyloid fibrils, forming only small oligomers that can induce aggregation of other amyloidogenic proteins such as A β [189]. When stressed, TDP-43 is found as part of stress granules. It is worth noting that TDP-43 is oligomerised by the interaction of monomers through their N-terminal sites. This process is required for the biological function of TDP-43 [189].

1.2.3.2 Aggregation-prone porins and enzymes

Porins can form amyloid and amyloid-like aggregates. Such prokaryotic porins are RopA, RopB, OmpA and OmpC proteins [190–193]. In eukaryotes, an example is the MSP2 protein [88]. At this point, it is difficult to say how common the process of porin aggregation is and what effect it leads to. The results of bioinformatics studies suggest that the sequences of proteins forming the inner part of the pore can lead to the formation of amyloid structures [194].

There are reports of aggregation of enzymes such as protease YghJ [195] and transglutaminase TGZ [196]. CarD, HelD and RepA proteins are also capable of aggregation [197–202].

Thus, it can be said that amyloids and amyloid-like proteins are found in a wide variety of organisms, and their range of functions is quite extensive. On the other hand, amyloids are still responsible for a large number of animal and human diseases. It can therefore be concluded that the study of both already known amyloids and the search for new proteins prone to aggregation are important tasks in modern biology and medicine.

Materials on amyloid diversity were published in the review article "Amyloid and amyloid-like aggregates: diversity and the term crisis" with Trubitsina N.P., Barbitov Y.A., Matveenko A.G., Zhuravleva G.A. and Bondarev S.A.

1.3 α -Synuclein

Synucleins are small and soluble proteins present mainly in nervous tissue and in some tumours. Unlike many other proteins, they are found only in vertebrates [203]. Three members of the synuclein family have been identified to date: α -, β - and γ -synuclein [203,204]. Interest in these proteins has increased following the discovery of a link (both genetic and neuropathological) between α -synuclein and Parkinson's disease [205].

α -Synuclein is a highly soluble protein consisting of 140 amino acid residues and has an unfolded native conformation [206,207]. Three domains are distinguished within this protein: an N-terminal region (residues 1-60) that weakly binds to the cell membrane, a hydrophobic region (residues 61-95) and a C-terminal hydrophilic proline-rich region (residues 96-140) [207,208]. The NAC (non-amyloid component) domain at positions 61-95 which has been identified in amyloid plaques in brains with Alzheimer's disease is highlighted in the α -synuclein structure [209]. NAC is involved in aggregation and formation of cross- β structures. α -Synuclein is widely distributed in the brain and localized in presynaptic terminals [207,208].

1.3.1 Functions of α -synuclein

α -Synuclein is known to be a protein that is synthesized in the cell under physiological conditions, but all functions of this protein are not fully understood. The most important known functions are reduction of apoptosis in dopaminergic neurons [210], prevention of oxidation of unsaturated fatty acids [211], regulation of synaptic vesicle transport at presynaptic terminals [212], involvement in SNARE complex formation [213] and clathrin-dependent endocytosis [214].

1.3.2 α -Synuclein aggregation

Despite numerous studies, the structure of α -synuclein under physiological conditions remains unclear. α -Synuclein is thought to occur predominantly in the cytosol as a disordered monomer [215]. It has been shown that various conditions, such as acidity of the medium, can lead to *in vitro* misfolding and aggregation of α -synuclein [216], temperature increase [217], 'molecular crowding' [218], presence of metal ions (such as aluminium, copper, iron, cobalt and manganese [219]), organic solvents [220], pesticides [221] and α -synuclein-binding proteins [222,223]. In addition, the neurotoxicity and aggregation tendency of α -synuclein can be affected by post-translational modifications. Such modifications include phosphorylation [224,225], ubiquitination [226], nitration [227], sumoylation [228], proteolysis [229] and N-terminal acetylation [230]. Among the α -synuclein aggregates found in Lewy bodies, approximately 90% are phosphorylated at serine residue 129 (Figure 4), so hyperphosphorylation of S129 α -synuclein is considered a pathological feature of Parkinson's disease and other synucleinopathies [231]. However, it is unclear whether phosphorylation of α -synuclein stimulates or inhibits its aggregation and whether it contributes to its neurotoxicity [232].

Missense mutations resulting in amino acid substitutions at the N-terminus (A53E, A53T, A30P, E46K, H50Q and G51D) (Figure 4), correlate with autosomal dominant forms of Parkinson's disease, whereas duplication and triplication of the *SNCA* gene have been shown to cause parkinsonism with early onset [233]. Variants of

α -synuclein with substitutions differ only in a few amino acid residues, but this leads to significant changes in their conformation and the type of aggregates formed [234].

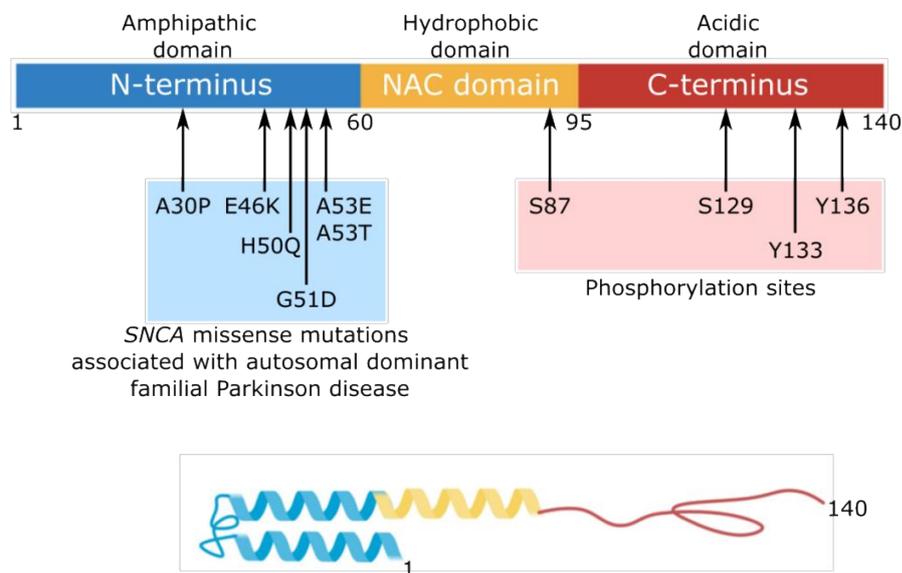


Figure 4. Structure of α -synuclein. A schematic representation of the structure of α -synuclein is presented. The protein sequence of 140 amino acid residues can be divided into three distinct domains. The N-terminal amphipathic domain (blue) contains amino acid substitutions (A30P, E46K, H50Q, G51D, A53T, A53E) caused by major mutations in the *SNCA* gene associated with autosomal dominant Parkinson's disease. N-terminal domain to helix formation and is responsible for binding to the membrane. The hydrophobic domain corresponding to the non- β -amyloid component of the plaques (NAC) is responsible for α -synuclein aggregation (yellow). The C-terminal domain (red) forms an acidic 'tail' containing the main S129 phosphorylation site. The C-terminal domain modulates α -synuclein aggregation. Adapted from [235].

Oligomeric aggregates can be divided into active (on-pathway) and inactive (off-pathway), depending on whether they lead to the formation of mature amyloid fibrils or form amorphous, non-fibrillar entities [236] (Figure 5). In addition, it is unclear whether low-molecular-weight α -synuclein oligomers are more toxic than mature fibrils. For example, severe damage to dopaminergic substantia nigra neurons is known to occur in transgenic animals producing α -synuclein variants that form ring/shaped oligomers (e.g. E57K and E35K), whereas protein variants that rapidly form fibrils were relatively less toxic [237]. It can be suggested that fibril-forming variants can be actively recruited to Lewy bodies into aggresome-like structures, which prevents their interaction with other cytoplasmic proteins and harmful effects on the cell [238,239]. It is also worth

noting that elevated levels of α -synuclein oligomers have been found in the brain and cerebrospinal fluid of patients with synucleinopathies compared to healthy individuals [240].

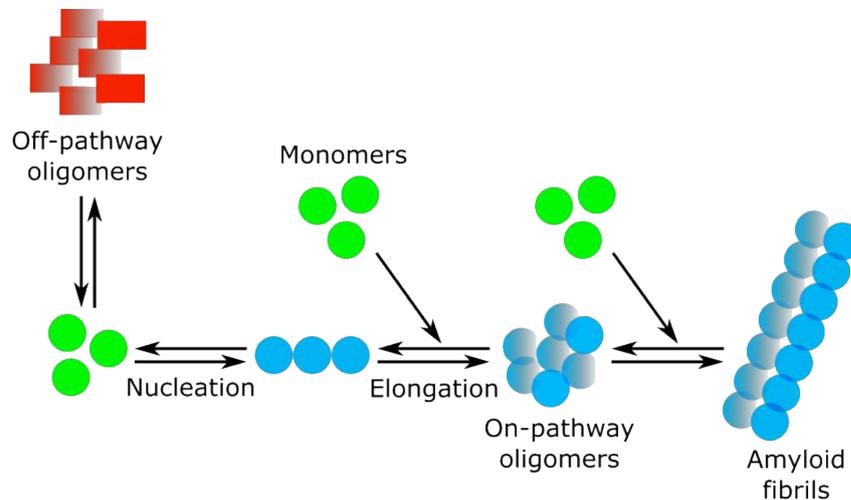


Figure 5. Scheme of the formation of on-pathway and off-pathway α -synuclein oligomers. Based on [236].

Results from experiments in animal models and cell cultures, including neuronal cultures, indicate a pathogenic role for α -synuclein aggregation, which leads to disruption of synaptic transmission, mitochondrial function, endoplasmic reticulum stress, defective autophagy, neuroinflammation and oxidative stress [241,242]. It has also been suggested that α -synuclein aggregation at presynaptic endings affects the assembly of SNARE complexes, thus reducing the efficiency of dopamine release [243]. Moreover, some synaptic proteins and neurotransmitter receptors (e.g. NMDA receptors) have been identified as putative interaction partners of α -synuclein [244], suggesting the involvement of α -synuclein in various diseases associated with neurotransmission disorders. For example, we have shown that α -synuclein coaggregates with the NOS1AP protein mediated interaction with NMDA receptors [245].

1.3.3 Prion-like properties of α -synuclein

Prions are infectious agents in which the PrP^{Sc} protein with an altered conformation recruits and transforms its normal PrP^C counterpart, thus creating self-propagating protein particles with irregular stacking that can be transmitted from cell to cell [35,246]. In recent years, it has been suggested that several amyloid proteins appear to have a similar prion-like spreading mechanism, among them α -synuclein [247,248], β -amyloid [249], tau [250] and huntingtin [251].

Consistent with Braak's hypothesis, the neuropathological stage of Parkinson's disease follows a strictly stereotyped and spatiotemporal progression of the Levy pathology, suggesting the spread of misfolded α -synuclein through vulnerable neuroanatomically linked pathways [252]. Initial evidence supporting the prion-like spread of α -synuclein came from the observation of α -synuclein aggregation in transplanted embryonic mesencephalic neuronal progenitors several years after transplantation and suggested host-to-graft transmission of Levy pathology [253,254]. Since then, accumulated data have shown that small aggregates (seeds) of α -synuclein derived from recombinant protein or lysates obtained from diseased brain can spread in a prion-like manner in neuronal cells and in rodents [247,248,255].

Some studies show that α -synuclein can be transferred from cell to cell. The protein, via vesicles, can be transported out of the cell by exocytosis followed by release [256]. There are also some studies claiming that α -synuclein can spread between cells like prions [257,258].

1.4 Bioinformatics search for potentially amyloidogenic proteins

It has been noted in the literature that specific sequences in amyloid proteins, called 'hot spots', may act as seeds for amyloidogenesis [42,259,260]. Identification of these regions may help to understand the biological function of these proteins. Similarly, studying the effects of point mutations on amyloidogenic proteins or peptides is of biological interest [259]. Given the crucial role of amyloid proteins in many

diseases, the proper identification and prediction of amyloid proteins, their hot spots and the effects of mutations on their amyloidogenicity are very important.

Identifying proteins capable of forming amyloids using biological and biochemical methods is time consuming and expensive [261]. Bioinformatic approaches can be used to simplify the search for new amyloids. However, computational prediction of amyloidogenic proteins and their specific 'hot spots' responsible for aggregation as well as the effect of point mutations on amyloidogenicity is challenging because the proteins that form amyloids are little similar in sequence and structure.

A variety of methods have been described in the literature for the identification of amyloidogenic proteins. In general terms, they can be divided into two groups based on the analysis of structural data, or protein sequences. Methods in the first group, such as Aggrescan 3D [262] and AggScore [263] use tertiary 3D protein structure for prediction. However, they have the disadvantage that the tertiary structure of the protein needs to be available and obtaining it is time-consuming and costly. Predicting the amyloidogenicity of proteins using structure can be a bottle neck in large-scale selection of amyloid protein candidates. Consequently, methods based on protein sequence are more widely used.

AGGRESCAN [264,265] and FoldAmyloid [266] algorithms predict amyloidogenicity by relying on the aggregation propensity of individual residues in the polypeptide chain. Zyggregator and TANGO use the propensity to aggregate individual amino acid residues in their analysis to predict amyloidogenic proteins. Waltz uses information from position specific scoring matrices (PSSM), amino acid physicochemical properties and structures from the FoldX software to evaluate hexapeptides based on their amyloidogenicity [267,268]. APPNN is a neural network-based amyloid predictor that uses biochemical and physicochemical properties of amino acids [269].

ArchCandy takes into account the geometry of the fibril formation [10]. The core of an amyloid fibril forms a β -arcade, a large number of stacked β -arcs, which are stabilised by hydrogen bonds and formed by two β -chains communicating by means of a loop. ArchCandy determines the probability of such motifs by taking into account the

amino acid sequence. In amyloid aggregates, β -archs can form either single β -arch structures or serpentines – β -structures with several adjacent β -archs. A development to reconstruct possible β -serpentines from single β -arcs predicted by ArchCandy has resulted in the BetaSerpentine tool [270].

1.5 Nitric oxide synthase 1 adaptor protein (NOS1AP)

1.5.1 Synthesis of nitric oxide and its role in the pathophysiology of mental illness

A bioinformatics analysis was carried out in our laboratory using ArchCandy software, which predicted that the NOS1AP protein (also known as CAPON) could be a potential amyloid interacting with α -synuclein. The nitric oxide synthase adaptor protein 1 (NOS1AP) is cytosolic. It binds neuronal nitric oxide synthase 1 (nNOS/NOS-I), and is thus involved in the regulation of nitric oxide (NO) formation. NO is a gaseous chemical messenger that has several functions in the human body [271]. In the central nervous system, NO is thought to be involved in neurotransmission, e.g. by regulating neurotransmitter biosynthesis and acting as a retrograde messenger at glutamatergic synapses to facilitate long-term potentiation [272,273].

NO is synthesised from L-arginine by NO synthase (NOS). There are three main forms of this enzyme: neuronal NOS (nNOS/NOS-I), inducible NOS (iNOS/NOS-II) and endothelial NOS (eNOS/NOS-III). These are encoded by the *NOS1*, *NOS2* and *NOS3* genes, respectively [274,275]. nNOS has been shown to interact with the adaptor protein NOS1AP (encoded by the *NOS1AP* gene) [276,277], which binds nNOS to other effectors such as Dexas1 and synapsin [278]. The production and activity of different forms of NOS is considered highly specific depending on cell type, and it is additionally influenced by environmental conditions, which helps to explain the wide range of NO functions [279,280]. Due to the short half-life of NO *in vivo*, indicators of NOS activity consider its more stable metabolites, such as nitrite (NO_2^-) and nitrate (NO_3^-), which are often grouped as NO metabolites (NO_x^-) [281].

In recent years, NO signalling has been studied in terms of its role in the pathophysiology of several psychiatric diseases, including major depressive disorder

(MDD) [282], bipolar affective disorder (BAD) [283] and schizophrenia [284]. Significant changes in peripheral NO_x^- concentrations were observed for all three diseases, although the data were conflicting [277]. For example, some researchers have reported decreased NO_x^- concentrations [284] in patients with schizophrenia, whereas other studies have found no significant differences in plasma and serum NO_x^- concentrations between patients with schizophrenia and healthy controls [285]. In addition, studies usually focus only on a single mental illness, and sample sizes are often limited. Thus, the relationship between peripheral NO_x^- concentrations and psychiatric disorders is currently unclear.

1.5.2 Functions of NOS1AP

The *NOS1AP* gene is located on human chromosome 1q22. NOS1AP consists of 506 amino acid residues and includes two domains: the N-terminal phosphotyrosine-binding domain (PTB) and the C-terminal PDZ-binding domain (PDZ-BD) [286]. Several alternative transcripts for *NOS1AP* have been described [287,288]. NOS1AP interacts with nNOS via PDZ-BD. Through the PTB domain, NOS1AP binds to Dexas1, resulting in the triple protein complex of NOS1AP, Dexas1 and nNOS, which is required by nNOS during Dexas1 activation [289]. Through the PTB domain, NOS1AP interacts with synapsins I, II and III to form the complex required for nNOS localization to presynaptic endings [290]. Moreover, using the same domain, NOS1AP integrates with the Scribble protein, allowing NOS1AP to become a link between Scribble and Rho GTPase signalling via β -Pix and Git1 [291]. NOS1AP is known to colocalise with both Scribble and Vangl1 proteins in breast cancer cells, which however is not observed in healthy cells. This suggests that NOS1AP may contribute to this type of cancer [292]. All this makes it possible to suggest that NOS1AP is an important adaptor protein that is part of a number of different signalling complexes.

NOS1AP interacts with nNOS, suggesting its mediated role in NO production [293]. This assumption is indirectly supported by the finding of two SNPs in the *NOS1AP* gene that are associated with a significant increase in NO_x^- concentration in patients with BAD [294]. As for other NOS, NOS1AP has been shown to not interact

with eNOS in cardiomyocytes [293] and with iNOS or eNOS in the central nervous system [276].

NOS1AP binds nNOS to specific target proteins. For example, Dexas1 (present in large quantities in the brain), whose activity is dependent on NO. It has been shown that nNOS is able to affect Dexas1 in the Dexas1/NOS1AP/nNOS complex. In addition, Dexas1 activity can be regulated by N-methyl-D-aspartate (NMDA) in a NO-dependent manner [289].

NOS1AP is involved in the regulation of NMDA receptor activity, possibly reducing it. This is one of the putative mechanisms underlying the development of schizophrenia. There are various models describing the interaction between NOS1AP and nNOS [295]. For example, the nNOS/PSD95 complex can be thought of as a dimerisation of PDZ domains, and nNOS-PDZ ligands such as NOS1AP would compete with PSD95 for interaction (Figure 6, A). Another model allows for the possibility that the ligand-binding pocket of the PDZ domain remains available for further recruitment of its own specific targets (Figure 6, B). According to another model, if the C-terminus of NOS1AP were to anchor into the PDZ domain binding pocket of nNOS in a manner different to those mentioned above, stabilising an allosteric conformational change that prevents PSD95 binding to the β -finger of nNOS, this could explain the inhibition of PSD95/nNOS interaction by NOS1AP (Figure 6, C). Finally, it is possible that NOS1AP acts as an inhibitor of the nNOS/PSD95 interaction only after some delay in order to disable signal transduction once it has been activated (Figure 6, D).

NOS1AP is able to influence NMDA receptor-related processes. NOS1AP has been demonstrated to regulate NMDA receptor-mediated neuronal cell death [296]. Thus, NOS1AP is thought to promote neurotransmission and excitotoxicity. On the other hand, NOS1AP has been reported to inhibit Ca^{2+} entry via NMDA receptors into neurons [276]. Overproduction of NOS1AP has been demonstrated to impair the current through L-type calcium channels, leading to a shortened action potential duration in ventricular myocytes [293]. NOS1AP has been shown to regulate Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum [297].

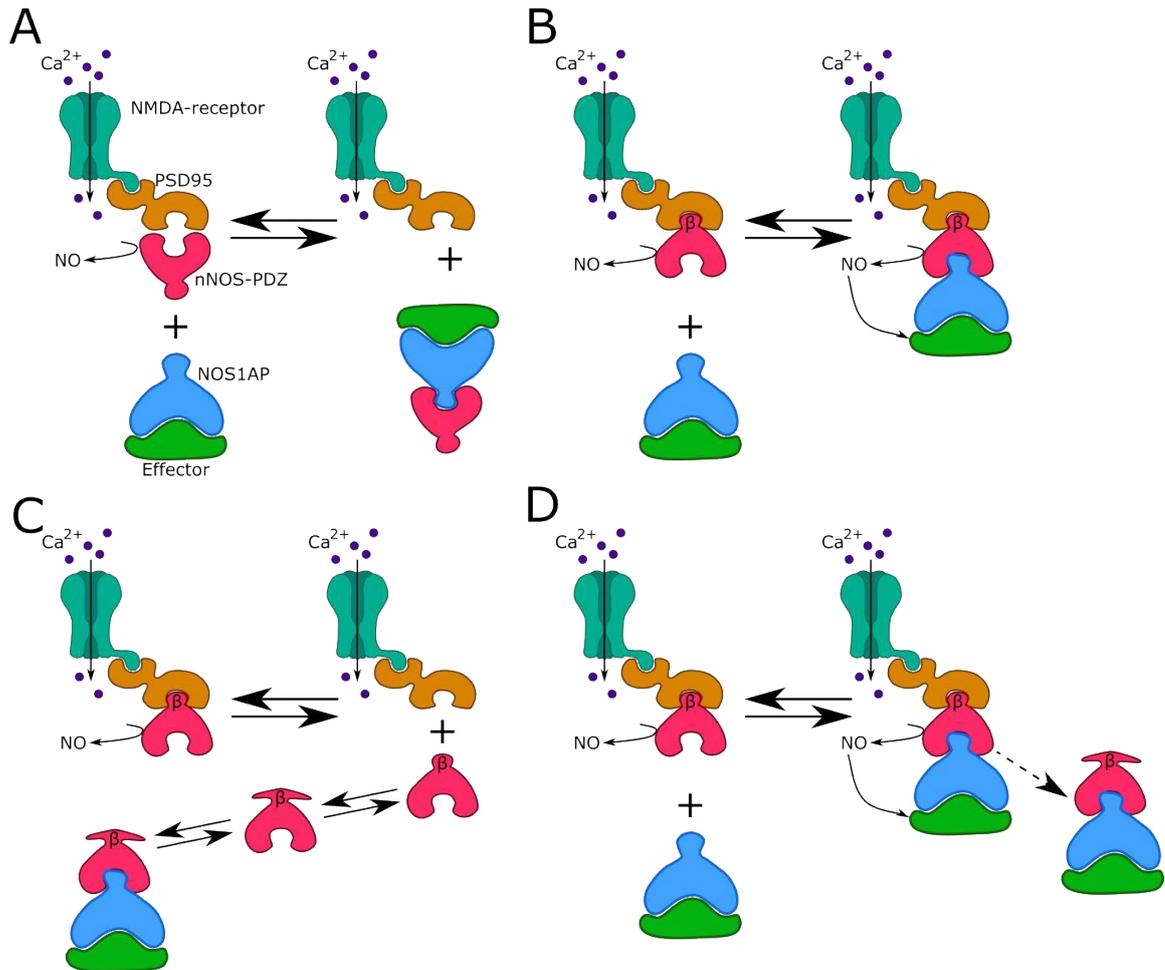


Figure 6. Different patterns of interaction between NOS1AP and nNOS and their intended consequences. A – **Exclusion model.** Binding of PSD95 to nNOS excludes binding to NOS1AP due to interaction of PDZ-PDZ domains of PDZ proteins PSD95 and nNOS and direct competition. In this scheme, nNOS coupled to NMDAR (via PSD95) produces active NO. In this model, nNOS/NOS1AP complexes with effectors such as Dexas1 would not be directly localised to the receptor. B – **Scaffold model.** Binding of nNOS via a β -finger (flanking motif outside the main PDZ domain) to PSD95 facilitates the formation of a large complex involving NOS1AP (or other ligands with C-terminal motifs). This model places nNOS close to the site of calcium influx and NOS1AP effectors close to the produced NO. C – **Two-state model.** It is assumed that the PDZ domain of nNOS can exist in two conformational states. In one, it can bind PSD95 but not NOS1AP; in the other, it can bind NOS1AP but not PSD95. This may explain the competition between PSD95 and NOS1AP. In this model, the nNOS-NOS1AP complex is located at a distance from the NMDA receptor, which limits nNOS activation in the nNOS-NOS1AP complex. D – **Delayed release model.** In this model, NOS1AP can interact with the unoccupied PDZ pocket, but as yet undefined mechanisms gradually lead to loss of PSD95 binding to the β finger, presumably through conformational changes, leading to delayed dissociation of the nNOS/NOS1AP complex from the receptor. The effector nNOS/NOS1AP complex localises near the receptor and the associated calcium influx only for a limited time. Based on [295].

There is some evidence on the relationship between NOS1AP and the development of diabetes. Increased Ca^{2+} levels in the islets of Langerhans have been shown to activate nNOS in the surface layer of insulin secretory granules and to be involved in the process of insulin secretion [298]. In addition, the administration of cholesterol to inhibit nNOS activity can inhibit the process of insulin secretion, indicating a biological role for the enzyme in this process [299,300]. The *NOS1AP* polymorphism has been found to be associated with a predisposition to the primary onset of diabetes in patients receiving calcium channel blockers. Pharmacogenomic studies have shown that *NOS1AP* gene variants are an important factor influencing differences in the efficacy of hypoglycaemic agents, particularly sulfonylurea derivatives [301,302]. One clinical study showed that a variant of the *NOS1AP* gene was associated with an increased predisposition to type 2 diabetes in the Chinese population [303]. There is also evidence that *NOS1AP* polymorphism may influence the therapeutic efficacy of nateglinide in patients with type 2 diabetes [304].

Overproduction of NOS1AP has been shown to increase liver insulin sensitivity and block p-p38MAPK in the liver of mutant mice homozygous for the *ob* gene encoding leptin [305]. In another study, NOS1AP production in the liver was inversely correlated with the formation of active forms of nNOS. Binding of NOS1AP to nNOS in neurons promoted nNOS activity towards the target protein. Thus, it can be assumed that NOS1AP exerts its effect on the liver through the inactivation of nNOS [306].

At the cellular level, NOS1AP also regulates actin dynamics, neuronal dendrite formation and cancer cell migration [11,287,288,291,292]. Mutant mice homozygous for the *NOS1AP* gene are viable as adults, but are prone to cardiac arrhythmias and dysfunction when exposed to oxidative stress agents [286,297]. This is consistent with the literature showing that common *NOS1AP* variants are associated with arrhythmias in adults [307,308]. Recessive *NOS1AP* variants have been shown to disrupt CDC42/DIAPH-dependent actin remodeling, cause aberrant organoid glomerulogenesis, and lead to glomerulopathy in humans and mice [286].

1.5.3 Association of NOS1AP with psychiatric disorders

There is a link between NOS1AP and various psychiatric disorders. Some studies report that *NOS1AP* gene polymorphisms are associated with schizophrenia and other psychiatric disorders [23,277]. For example, patients with schizophrenia have increased levels of *NOS1AP* gene mRNA in the blood [309] and dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC) [22]. If mRNA levels, and consequently protein levels, are elevated due to illness, the putative link between NOS1AP and the glutamate hypothesis of schizophrenia, which accounts for the lack of NMDA receptor activation [22,310,311] may be correct (Figure 7).

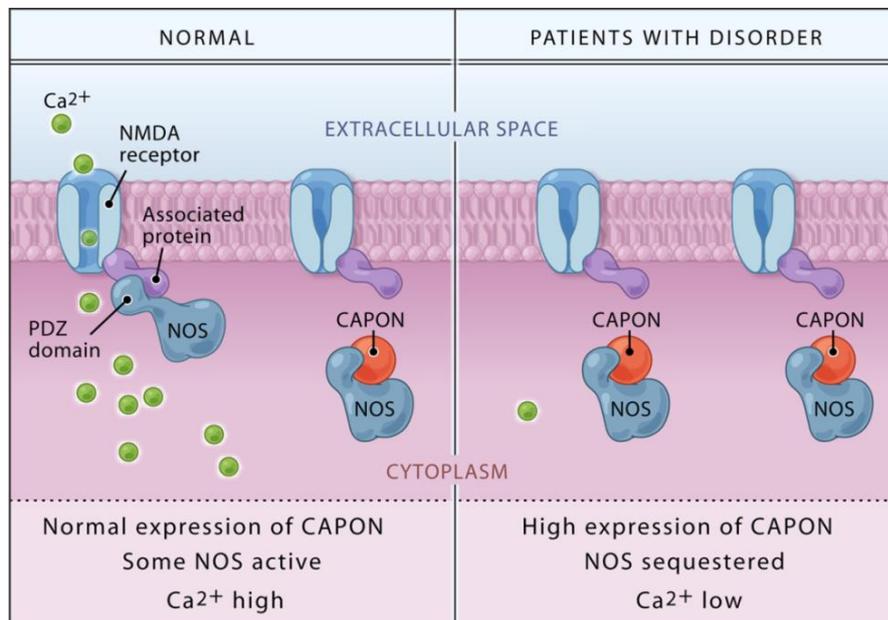


Figure 7. NOS1AP binds nitric oxide synthase and thus regulates NMDA receptor-mediated glutamate neurotransmission. Binding of NOS1AP leads to a reduction in the number of NMDA receptor-nitric oxide synthase (NOS1) complexes, resulting in a decrease in calcium influx controlled by the NMDA receptor and catalytic inactivation of nitric oxide synthase. This process, it is suggested, may link increased levels of NOS1AP expression to the glutamate hypothesis of schizophrenia development. Adapted from [310].

Patients with major depressive disorder show increased NOS1AP immunoreactivity in the DLPFC and anterior cingulate cortex [312]. *NOS1AP* gene variants are associated with endophenotypes of schizophrenia [313–315] and depression

phenotypes in schizophrenia [316]. In addition, *NOS1AP* variants are associated with symptom severity as well as symptoms of depression and anxiety in post-traumatic stress disorder (PTSD) [317,318]. In addition to the association with schizophrenia, two rare non-synonymous substitutions have been shown to separate obsessive-compulsive disorder (OCD) and autism spectrum disorder (ASD) [319], which may suggest a pleiotropic effect of *NOS1AP* on mental illness.

NOS1AP has been shown to be activated in CA1 pyramidal cells in the brains of Alzheimer's patients [320]. *NOS1AP* expression induces increased levels of phosphorylated, oligomeric and insoluble tau protein. In contrast, *NOS1AP* deficiency facilitates Alzheimer's disease-related pathological phenotypes in tauopathy models [25]. These findings suggest that *NOS1AP* may play an important role in the pathogenesis of Alzheimer's disease.

1.6 Conclusion

The development of various neurodegenerative diseases is associated with the appearance of protein aggregates, often possessing amyloid properties. Amyloids are protein aggregates with a cross- β structure [1,2,30,321]. The discovery of coaggregation of proteins with amyloids has revealed a new type of intermolecular interactions. It is now becoming increasingly clear that such interactions may play an important role in the pathogenesis of human and animal amyloidoses [13].

Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disease. It is characterised by abnormal accumulation and aggregation of α -synuclein in Lewy bodies and Lewy neurites [322]. There is evidence that α -synuclein can coaggregate with other amyloids [13]. Thus, investigating the coaggregation of α -synuclein with other proteins may help to understand the mechanisms of Parkinson's disease and develop new treatment strategies for this disease.

One of the proteins with which α -synuclein physically interacts is *NOS1AP*. This is indicated by the results of a proteomic screening based on co-immunoprecipitation followed by mass spectrometry [26]. The *NOS1AP* protein has been associated with the development of various psychiatric disorders, mainly schizophrenia [23,277]. Thus, it

can be said that studying the ability of NOS1AP protein to form stable aggregates and interact with α -synuclein may help to understand the possible molecular mechanisms of the development of diseases such as schizophrenia and Parkinson's disease.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Plasmids

The plasmids used in this work are listed in Table 1. Plasmids from the pDONR221 series (pDONR221-NOS1AP, pDONR221-SNCA) are commercial plasmids from Thermo Fisher Scientific. Plasmids of the same series encoding NOS1AP fragments (pDONR221-NOS1AP-1-291, pDONR221-NOS1AP-292-390, pDONR221-NOS1AP-391-506) were obtained by PCR with primers (Table 4 as well as section 2.4) to these sequences and subsequent insertion of the PCR product into the pDONR221 vector using cloning (GateWay).

Plasmids for the C-DAG system were obtained using plasmids from the pDONR221 series with the coding sequences of the proteins studied; pVSGW was used as the target vector. Plasmids based on pAG416GPD-EGFP, pAG416GPD-EYFP and pAG415GPD-Cerulean vectors were obtained for work with yeast cells. For work with mammalian cell cultures pDONR221 plasmids were used to produce pgLAP1, pDEST-V1-ORF and pDEST-V2-ORF based vectors. Plasmids for protein production were derived from pDest-527. Recombination cloning technique was used to obtain these constructs. The pDest-527-nSNCA plasmid was obtained by restriction and ligation.

Table 1 – Plasmids used in this work. CsgAss – signal peptide of CsgA protein, necessary for protein export to cell surface. araBAD – arabinose operon. GAP – *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) gene promoter. CMV is a cytomegalovirus promoter. T7 – T7 phage promoter.

Plasmid name	Protein of interest	Selection marker	Promoter	Origin
pDONR221	–	<i>kanR</i>	–	Thermo Fisher Scientific (Ultimate ORF Clones) (12536017)
pDONR221-NOS1AP	NOS1AP	<i>kanR</i>	–	Thermo Fisher Scientific (Ultimate ORF Clones)

Continuation of Table 1

Plasmid name	Protein of interest	Selection marker	Promoter	Origin
pDONR221-SNCA	α Syn	<i>kanR</i>	–	Thermo Fisher Scientific (Ultimate ORF Clones)
pDONR221-SNCA(A53T)	α Syn(A53T)	<i>kanR</i>	–	Obtained in this work
pDONR221-SNCA(A53E)	α Syn(A53E)	<i>kanR</i>	–	
pDONR221-SNCA(E46K)	α Syn(E46K)	<i>kanR</i>	–	
pDONR221-SNCA(A30P)	α Syn(A30P)	<i>kanR</i>	–	
pDONR221-NOS1AP-1-291	NOS1AP(1-291)	<i>kanR</i>	–	Obtained in this work
pDONR221-NOS1AP-292-390	NOS1AP(292-390)	<i>kanR</i>	–	
pDONR221-NOS1AP-391-506	NOS1AP(391-506)	<i>kanR</i>	–	
pVS72	CsgAss-Sup35NM	<i>ampR</i>	araBAD	[36]
pVS105	CsgAss-Sup35M	<i>ampR</i>	araBAD	[36]
pVSGW-ccdB		<i>ampR</i>	araBAD	[323]
pVSGW-NOS1AP	CsgAss-NOS1AP	<i>ampR</i>	araBAD	Obtained in this work
pVSGW-NOS1AP-1-291	CsgAss-NOS1AP(1-291)	<i>ampR</i>	araBAD	
pVSGW-NOS1AP-292-390	CsgAss-NOS1AP(292-390)	<i>ampR</i>	araBAD	
pVSGW-NOS1AP-391-506	CsgAss-NOS1AP(391-506)	<i>ampR</i>	araBAD	
pAG416GPD-EGFP-ccdB	EGFP	<i>URA3</i>	GAP	
pAG416GPD-EGFP-NOS1AP-1-291	EGFP-NOS1AP(1-291)	<i>URA3</i>	GAP	Obtained in this work
pAG416GPD-EGFP-NOS1AP-292-390	EGFP-NOS1AP(292-390)	<i>URA3</i>	GAP	
pAG416GPD-EGFP-NOS1AP-391-506	EGFP-NOS1AP(391-506)	<i>URA3</i>	GAP	
pgLAP1	EGFP	<i>hygR</i>	CMV	Addgene (Plasmid #19702)

Continuation of Table 1

Plasmid name	Protein of interest	Selection marker	Promoter	Origin
pgLAP1-SNCA	EGFP- α Syn	<i>hygR</i>	CMV	Obtained in this work
pgLAP1-NOS1AP	EGFP-NOS1AP	<i>hygR</i>	CMV	
pgLAP1-NOS1AP-1-291	EGFP-NOS1AP(1-291)	<i>hygR</i>	CMV	
pgLAP1-NOS1AP-292-390	EGFP-NOS1AP(292-390)	<i>hygR</i>	CMV	
pgLAP1-NOS1AP-391-506	EGFP-NOS1AP(391-506)	<i>hygR</i>	CMV	
pDEST-V1-ORF	V1	<i>bleoR</i>	CMV	Addgene (Plasmid #73635)
pDEST-V1-SNCA	V1- α Syn	<i>bleoR</i>	CMV	Obtained in this work
pDEST-V1-NOS1AP	V1-NOS1AP	<i>bleoR</i>	CMV	
pDEST-V1-NOS1AP-1-291	V1-NOS1AP(1-291)	<i>bleoR</i>	CMV	
pDEST-V1-NOS1AP-292-390	V1-NOS1AP(292-390)	<i>bleoR</i>	CMV	
pDEST-V1-NOS1AP-391-506	V1-NOS1AP(391-506)	<i>bleoR</i>	CMV	
pDEST-V2-ORF	V2	<i>bleoR</i>	CMV	Addgene (Plasmid #73636)
pDEST-V2-SNCA	V2- α Syn	<i>bleoR</i>	CMV	Obtained in this work
pDEST-V2-NOS1AP	V2-NOS1AP	<i>bleoR</i>	CMV	
pDEST-V2-NOS1AP-1-291	V2-NOS1AP(1-291)	<i>bleoR</i>	CMV	
pDEST-V2-NOS1AP-292-390	V2-NOS1AP(292-390)	<i>bleoR</i>	CMV	
pDEST-V2-NOS1AP-391-506	V2-NOS1AP(391-506)	<i>bleoR</i>	CMV	
pAG416GPD-EYFP- <i>ccdB</i>	EYFP	<i>URA3</i>	GAP	Addgene (Plasmid #14220)
pAG416GPD-EYFP-SNCA	EGFP- α Syn	<i>URA3</i>	GAP	Obtained in this work
pAG416GPD-EYFP-NOS1AP	EYFP-NOS1AP	<i>URA3</i>	GAP	
pAG416GPD-EYFP-NOS1AP-1-291	EYFP-NOS1AP(1-291)	<i>URA3</i>	GAP	
pAG416GPD-EYFP-NOS1AP-292-390	EYFP-NOS1AP(292-390)	<i>URA3</i>	GAP	
pAG416GPD-EYFP-NOS1AP-391-506	EYFP-NOS1AP(391-506)	<i>URA3</i>	GAP	

End of Eable 1

Plasmid name	Protein of interest	Selection marker	Promoter	Origin
pAG415GPD-Cerulean-ccdB	Cerulean	<i>LEU2</i>	GAP	Addgene (Plasmid #14410)
pAG415GPD-Cerulean-SNCA	Cerulean- α Syn	<i>LEU2</i>	GAP	Obtained in this work
pAG415GPD-Cerulean-SNCA(A53T)	Cerulean- α Syn(A53T)	<i>LEU2</i>	GAP	
pAG415GPD-Cerulean-SNCA(A53E)	Cerulean- α Syn(A53E)	<i>LEU2</i>	GAP	
pAG415GPD-Cerulean-SNCA(A30P)	Cerulean- α Syn(A30P)	<i>LEU2</i>	GAP	
pAG415GPD-Cerulean-SNCA(E46K)	Cerulean- α Syn(E46K)	<i>LEU2</i>	GAP	
pAG415GPD-Cerulean-NOS1AP	Cerulean-NOS1AP	<i>LEU2</i>	GAP	
pDest-527	–	<i>ampR</i>	T7	Addgene (Plasmid #11518)
pDest-527-SNCA	α Syn-6xHis	<i>ampR</i>	T7	Obtained in this work
pDest-527-nSNCA	α Syn	<i>ampR</i>	T7	
pDest-527-NOS1AP(292-390)	NOS1AP(292-390)-6xHis	<i>ampR</i>	T7	Obtained in this work
pDest-527-NOS1AP(391-506)	NOS1AP(391-506)-6xHis	<i>ampR</i>	T7	

The resulting plasmids were verified either by restriction analysis with BglI, EcoRV, PvuI, NsiI, PvuII, NcoI, HincII (depending on the plasmid) or by sequencing (section 2.4.5).

2.2 Microbial strains and cell lines

2.2.1 Microbial strains

2.2.1.1 Bacteria strains

Escherichia coli strain TOP10 and DH5 α were used for routine plasmid production. The *E. coli* XL10-Gold strain was used to produce the pDest527-nSNCA plasmid.

E. coli strain VS39 was used for the C-DAG system [36]. The VS39 strain is a derivative of the MC4100 strain, which is capable of forming kerl. The *csgA*, *csgB* and *csgC* kerl genes are deleted from VS39, with a replacement for the *neo* gene that provides resistance to kanamycin. VS39 additionally includes plasmid pVS76, which contains a gene encoding the kerli protein CsgG.

E. coli strains used for heterologous protein overproduction were NiCo21(DE3), BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, Origami and T7 (Table 2) (New England Biolabs).

Table 2 – Bacterial strains used for plasmid and protein production

Strain	Genotype
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>
XL10-Gold	Tet ^r Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> Hte [F' <i>proAB</i> <i>lacI</i> ^r ZDM15 Tn10 (Tet ^r) Amy Cam ^r]
DH5 α	F ⁻ <i>endA1</i> <i>glnV44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>gyrA96</i> <i>deoR</i> <i>nupG</i> <i>purB20</i> ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (<i>r_K⁻m_K⁺</i>), λ ⁻
NiCo21(DE3)	<i>can::CBD</i> <i>fhuA2</i> [<i>lon</i>] <i>ompT</i> <i>gal</i> (λ DE3) [<i>dcm</i>] <i>arnA::CBD</i> <i>slyD::CBD</i> <i>glmS6Ala</i> Δ <i>hsdS</i> λ DE3 = λ <i>sBamHI</i> Δ <i>EcoRI-B</i> <i>int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1)</i> <i>i21</i> Δ <i>nin5</i>
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻</i> , <i>m_B⁻</i>) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3)
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻</i> , <i>m_B⁻</i>) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3) pLysS(Cam ^R)
Origami	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻</i> <i>m_B⁻</i>) <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>lacY1</i> <i>ahpC</i> <i>gor522::</i> Tn10 <i>trxB</i> (Kan ^R , Tet ^R)
T7	<i>fhuA2</i> <i>lacZ::T7</i> <i>gene1</i> [<i>lon</i>] <i>ompT</i> <i>gal</i> <i>sulA11</i> <i>R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2</i> [<i>dcm</i>] <i>R(zgb-210::Tn10--Tet^S)</i> <i>endA1</i> Δ (<i>mcrC-mrr</i>)114::IS10

2.2.1.2 Yeast strains

The *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains 74-D694 (*MATa ade1-14(UGA) trp1-289(UAG) ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 [psi⁻] [PIN⁺]*) [324] and 2-74-D694 (*MATa ade1-14(UGA) trp1-289(UAG) ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 [psi⁻] [pin⁻]*) were used (Courtesy of Matveenko A.G.).

2.2.2 Mammalian cell lines

The HEK293T cell line was kindly provided by Natalia Viktorovna Katolikova. The HEK293T line is a variant of the HEK293 line derived from human embryonic kidneys. HEK293T expresses a mutant temperature-sensitive variant of the SV40 T-antigen [325]. It is used for transient transfection and protein expression.

The IMR-32 cell line was kindly provided by Daniel Valerievich Kachkin. IMR-32 cells were originally obtained from brain neuroblastoma tissue [326].

2.2.3 Media and cultivation conditions

Standard LB media (liquid and solid) were used for routine cultivation of bacterial strains [327]. For solid media, agar was added to a final concentration of 2.5-3% (w/v). The strains were incubated at 37 °C. Ampicillin (100 µg/ml) or kanamycin (50 µg/ml) was used for selection. When cultured in liquid medium, agitation at 200 rpm was used.

For the C-DAG method, transformants of strain VS39 were grown on solid LB medium supplemented with ampicillin (100 µg/ml), chloramphenicol (25 µg/ml), 0.2% (w/v) L-arabinose, 1 mM IPTG (isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside) and Congo red dye (10 µg/ml) in a combination depending on the media designation (

Table 3) [36]. Cells were incubated at 22 °C, 26 °C and 37 °C to select the optimum conditions under which the positive and negative controls would make a clear difference.

Table 3 – Composition of media for the C-DAG bacterial system

Component of the medium	Control medium	Medium for induction	Congo Red induction medium
ampicillin	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml
chloramphenicol	25 µg/ml	25 µg/ml	25 µg/ml
L-arabinose	0	0.2% (w/v)	0.2% (w/v)
IPTG	0	1 mM	1 mM
Congo red	0	0	10 µg/ml

Yeast cells were grown on complete YEPD medium. Yeast transformants were cultured on synthetic media (SC), with the addition of the necessary amino acids and nitrogenous bases except for uracil and/or leucine (SC-U and SC-UL) at 30 °C [328].

HEK293T cell cultures were grown on DMEM medium (Thermo Fisher Scientific), IMR-32 cell cultures were grown on RPMI medium (Thermo Fisher Scientific). Fetal bovine serum up to 10% (w/v) and antibiotics (penicillin and streptomycin to final concentrations of 100 units/ml and 100 µg/ml, respectively) were added to the medium. The cells were cultured at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂.

2.3 Genetic methods

2.3.1 Transformation of yeast and bacteria

The bacterial strains TOP10 and XL10-Gold were transformed according to standard procedures using chemically competent cells. Transformation of strains VS39, NiCo21(DE3), BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, Origami and T7 was performed by standard technique using CaCl₂ [329]. Yeast transformation was performed according to standard procedures using lithium acetate [330].

2.3.2 Transfection of mammalian cells

HEK293T and IMR-32 cells were transfected using TurboFect Transfection Reagent (Thermo Scientific) or TransIntro EL Transfection Reagent (TransGen Biotech) according to the manufacturers' protocols. To investigate the physical

interaction between the two proteins, cells were transfected simultaneously with two plasmids, each containing a sequence encoding one of the proteins of interest.

2.4 . Methods of molecular biology

Standard nucleic acid techniques were used: DNA electrophoresis in agarose gel, restriction and ligation [327]. When performing restriction and ligation reactions, the recommendations of the manufacturers of the respective enzymes were also taken into account. For purification of PCR products, plasmids, and DNA extraction from the gel, appropriate reagent kits were used according to the methodology recommended by the manufacturer (Thermo Fisher Scientific).

2.4.1 Obtaining constructs encoding fragments of proteins of interest

To obtain plasmids encoding NOS1AP protein fragments, we performed a PCR reaction using pDONR221-NOS1AP plasmid DNA as a matrix. We used Taq polymerase (SibEnzyme) for DNA synthesis. Reaction mixture was prepared using the technique described in [327]. The primers listed in Table 4 were used for amplification. For the reaction, the programme given in Table 5 was used. The annealing temperature of the primers was chosen experimentally.

The mixture was further treated with DpnI restrictase (Thermo Scientific) after PCR. To 15 μ l of PCR product was added 3 μ l of 10x Buffer Tango (Thermo Scientific), 0.2 μ l of DpnI and 11.8 μ l of water. The mixture was incubated at 37 °C for 6 h before being used for recombinant cloning with the BP Clonase II kit (section 2.4.3.1). The transformation of the E. coli DH5 α strain was then performed using the post-cloning mixture. The bacterial cells were seeded on selective medium, cultured for 12-16 hours at 37 °C, after which the transformants were selected.

Table 4 – Primers for amplification of sequences encoding NOS1AP fragments.
attB sites are underlined in the primer sequences.

Primer name	Sequence	Amplifiable fragment
NOS1AP-F-292-390	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTA</u> CCAGATGCAGCTCC	NOS1AP(292-390)
R_NOS1AP(HindIII)_ attB2	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA</u> AGCTTCTAGTCACAGAGCACGGGCAG	
NOS1AP_1_291_ NAR_attB1_forward_ primer	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT</u> CATGCCTAGCAAAACCAAG	NOS1AP(1-291)
NOS1AP_1_291_ NAR_attB2_reverse_ primer	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT</u> CTAGTGGTGAGTGGACAG	
NOS1AP_391_506_ NAR_attB1_forward_ primer	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT</u> CCCCACGACCCCTAAGCC	NOS1AP(391-506)
NOS1AP_391_506_ NAR_attB2_reverse_ primer	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT</u> CTACACGGCGATCTCATC	

Table 5 – PCR protocol for sequences amplification encoding fragments of proteins of interest

DNA denaturation	DNA amplification				Completion of DNA synthesis
	DNA denaturation	Primer annealing	DNA synthesis	Number of amplification cycles	
5 min, 94 °C	30 s, 94 °C	30 s, 55 °C	90 s, 72 °C	30	5 min, 72 °C

2.4.2 Obtaining constructs encoding α -synuclein variants with amino acid substitutions

To obtain plasmids encoding α -synuclein variants with substitutions, we performed a PCR reaction using pDONR221-SNCA plasmid DNA as a matrix. We used AccuPrime Pfx polymerase (Invitrogen) for DNA synthesis. Primers listed in Table 6. were used for amplification. For the reaction, we used the program given in Table 7. The annealing temperature of the primers was chosen experimentally.

The mixture was further treated with DpnI restrictase (Thermo Scientific) after PCR. To 10 μ l of PCR product were added 2 μ l of 10x Buffer Tango (Thermo Scientific), 1 μ l of DpnI enzyme and 7 μ l of water. The mixture was incubated at 37 °C for 6 hours. Then transformation of E. coli strain DH5 α was performed using the mixture after incubation. The bacterial cells were plated on selective medium, cultured for 12-16 hours at 37 °C, and then the transformants were selected.

Table 6 – Primers for amplification of sequences encoding α -synuclein variants with substitutions. Introduced nucleotide substitutions are underlined.

Primer name	Sequence	Substitution made
SNCA_Ala53Thr_Forward	GGTGCATGGTGTG <u>A</u> CAACAGTGGCTGAGAAG ACC	Ala53Thr
SNCA_Ala53Thr_Reverse	GGTCTTCTCAGCCACTGTTG <u>T</u> CACACCATGCA CC	
SNCA_Ala53Glu_Forward	GGTGCATGGTGTGG <u>A</u> AACAGTGGCTGAGAA GACC	Ala53Glu
SNCA_Ala53Glu_Reverse	GGTCTTCTCAGCCACTGTT <u>T</u> CCACACCATGCA CC	
SNCA_Ala30Pro_Forward	GGTGTGGCAGAAGCACCAGGAAAGACAAAA GAGG	Ala30Pro
SNCA_Ala30Pro_Reverse	CCTCTTTTGTCTTTCCTGGT <u>G</u> CTTCTGCCACA CC	

Continuation of Table 6

Primer name	Sequence	Substitution made
SNCA_Glu46Lys_Forward	GGCTCCAAAACCAAG <u>A</u> AGGGAGTGGTGCAT GG	Glu46Lys
SNCA_Glu46Lys_Reverse	CCATGCACCACTCCCTT <u>T</u> CTTGGTTTTGGAGCC	

Table 7 – PCR protocol to amplify sequences encoding α -synuclein variants with substitutions

DNA denaturation	DNA amplification				Completion of DNA synthesis
	DNA denaturation	Primer annealing	DNA synthesis	Number of amplification cycles	
5 min, 95 °C	30 s, 95 °C	30 s, 63 °C	15 min, 68 °C	18	30 min, 68 °C

2.4.3 Gateway recombinatorial cloning**2.4.3.1 Gateway BP Clonase reaction**

Gateway™ BP Clonase™ II kit (Thermo Fisher Scientific) was used for cloning.

Components of the reaction mixture:

- 1) PCR fragment with *att* sites – 1 μ l;
- 2) Destination vector (pDONR221) – 150 ng;
- 3) BP clonase II – 1 μ l;
- 4) TE buffer – up to 9 μ l.

The mixture was incubated at 25 °C for 2 h, followed by the addition of 1 μ l of Proteinase K solution from the kit and incubated for 10 min at 37 °C.

2.4.3.2 Gateway LR Clonase reaction

Gateway™ LR Clonase™ II kit (Thermo Fisher Scientific) was used for cloning. Components of the reaction mixture:

- 1) pDONR221 with gene of interest – 150 ng;
- 2) Destination vector (pDest527, pVSGW-ccdB, pAG416GDP-EGFP, pAG416GPD-EYFP-ccdB, pAG415GPD-Cerulean-ccdB) – 150 ng;
- 3) LR clonase II – 1 μ l;
- 4) TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)) – up to 9 μ l.

The mixture was incubated at 25 °C for 2 hours, followed by the addition of 1 μ l of the kit proteinase K solution and incubated for 10 minutes at 37 °C.

2.4.4 Obtaining the pDest527-nSNCA plasmid

To produce native α -synuclein (α Syn) in *E. coli* bacterial cells, the plasmid pDest527-nSNCA (n is for native) was constructed. For this purpose, we cut a 72 bp long fragment carrying the site encoding the 6xHis tag using restriction using the enzymes NdeI (Fermentas) and NcoI (Fermentas) from the pDest527-SNCA plasmid (Figure 8).

Plasmid fragments after treatment with NdeI and NcoI restrictases were separated in a 2% (w/v) agarose gel. DNA was isolated from the gel, the concentration was measured on a NanoDrop 2000C spectrophotometer, and then treated with Klenow Fragment (Thermo Scientific) according to the manufacturer's procedure. The resulting mixture was incubated for 10 min at 37 °C, followed by 10 min at 75 °C to cycle the plasmid. Afterwards, a ligase reaction was performed using DNA ligase T4 (Thermo Scientific). The competent cells of the bacterial strain *E. coli* XL10-Gold were then transformed with the mixture after the ligase reaction. The transformants were inoculated on cups with LB medium supplemented with ampicillin to a concentration of 100 μ g/ml.

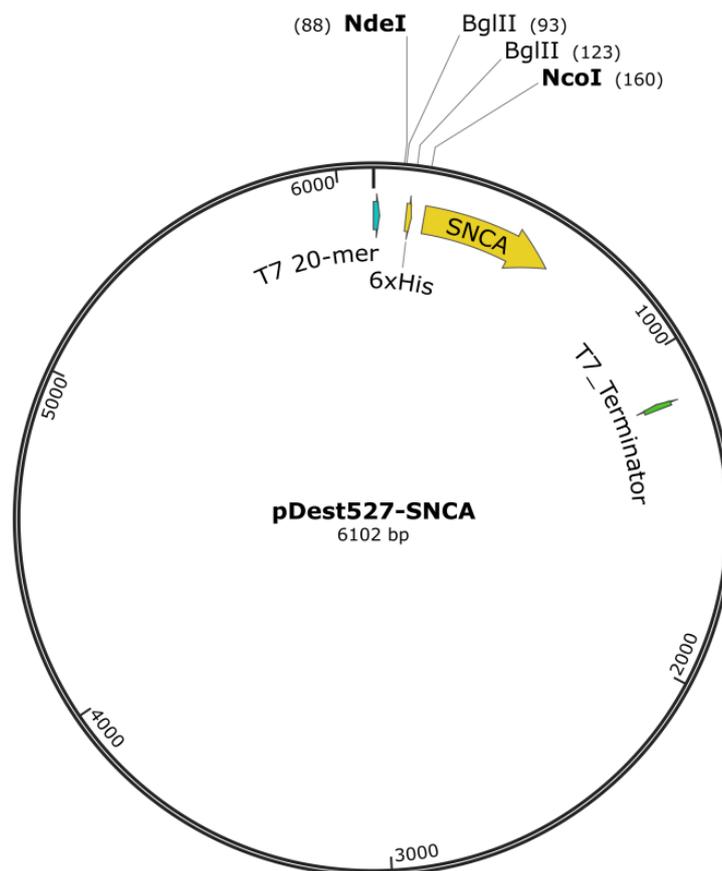


Figure 8. Physical map of the pDest527-SNCA plasmid. NdeI, NcoI and BglII indicate the locations of the restriction sites. T7 20-mer and T7_Terminator indicate primer landing sites used for PCR from colonies.

On the next day (about 12-16 hours later), transformant colonies were taken from the cup and checked for the presence of the desired one by PCR from the colony. For this purpose, colonies were taken from the cup with a sterile stick, each of them was resuspended in 20 μ l of sterile water and then the sample was incubated for 5 minutes at 95 $^{\circ}$ C. The mixture was centrifuged at 14000 rpm for 5 minutes. 1 μ l of supernatant fraction was taken and used as a template for PCR with primers T7_Terminator (GCTAGTTATTGCTCAGCG) and T7 20-mer (TAATACGACTCACTATAGGG). Taq polymerase (SibEnzyme) was used for DNA synthesis according to the manufacturer's recommendations. The PCR programme is shown in Table 8. A total of 53 transformants were analysed.

Table 8 – Amplification protocol for DNA encoding α -synuclein

DNA denaturation	DNA amplification				Completion of DNA synthesis
	DNA denaturation	Primer annealing	DNA synthesis	Number of amplification cycles	
5 min, 94 °C	30 s, 94 °C	30 s, 55 °C	60 s, 72 °C	30	5 min, 72 °C

The presence and size of PCR products were checked by electrophoresis in 2% (w/v) agarose gel. When a fragment carrying the 6xHis tag is excised from the pDest527-SNCA plasmid, the plasmid size is reduced by 72 bp. We detected the PCR product of the expected size (72 bp smaller than the original plasmid).

An additional check for the absence of the fragment encoding the 6xHis tag in the plasmid is treatment with BglII restrictase, since in the original plasmid the restriction sites of this enzyme are only in the excised fragment (Figure 8). Plasmids were isolated from the selected clones and then treated with BglII enzyme to check whether plasmid cleavage occurred or not. Plasmids that were not hydrolysed by BglII were used to transform the bacterial strain *E. coli* NiCo21(DE3).

Another test of the successful excision of the fragment carrying the 6xHis tag was western blot hybridisation with antibodies to the 6xHis tag, as the protein synthesised in the cells by the transformant should not bind these antibodies if this tag is lost. It was necessary to make sure that the cells overproduce the right size protein. Transformants of the bacterial strain *E. coli* NiCo21 were seeded in LB selective liquid medium with ampicillin and incubated overnight. The next day, these cultures were diluted to OD(600 nm) = 0.3, a 1 ml aliquot "before induction" was taken and 1 mM IPTG was added to the remaining culture to induce overproduction of α -synuclein. Two hours later, samples were taken to check the presence of α -synuclein using the SDS-PAGE method. Before plating, the precipitated cells were incubated at 100 °C for 5 min and then the resulting mixture was centrifuged at maximum speed for 30 s. Electrophoresis was performed in two replicates. Proteins from a single gel were eluted onto a membrane using a semi-dry transfer. Western blot hybridization was performed as described in section 2.5.8. Anti-His antibody (GE Healthcare) at a dilution of 1:4000 in

TTBS buffer with Blocking Agent (Amersham) added to 1% (w/v) was used to identify α -synuclein with the 6xHis tag, and mouse IgG antibody (Amersham) at a dilution of 1:20000 in TTBS buffer with Blocking Agent (Amersham) added to 0.2% (w/v) as the secondary antibody. A second gel was used for Coomassie blue staining to control protein application.

2.4.5 Sequencing

Sequencing of the plasmids obtained in the course of this work was performed at the Molecular and Cell Technology Development Resource Center, SPbSU. The obtained chromatograms were analyzed using Unipro UGENE [331] and Chromas (version 2.6.6 (2018)). Standard primers were used for plasmid sequencing: EGFP-C, BGH Reverse, CMV Forward, T7, T7 Terminal, M13 Fwd(GW) and M13 Rev(GW).

2.4.6 MTT assay protocol for cell viability

A 96-well culture plate was seeded with 5000 HEK293T cells per well in 100 μ l of medium and incubated at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂. After 24 hours, the cells were transfected with constructs containing sequences encoding proteins of interest. EGFP-producing cells transfected with the pgLAP1 vector were used as a negative control. Twenty-four hours after transfection, 10 μ l MTT solution was added to the wells and incubated for 4 hours, then 100 μ l Formazan Solution (FineTest) was added to the cells and incubated for another 4 hours. Optical absorbance was measured using a CLARIOstar Plus multi-mode microplate reader (BMG LABTECH) in the range of 560 to 600 nm. To measure the number of surviving cells, the absorbance value in the experimental wells was divided by the value in the control wells with untransfected cells.

2.5 Biochemical methods

2.5.1 Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Electrophoresis was performed according to standard procedures [327,332] at 180V for 50-60 minutes. A 5% (w/v) concentrating and 15% (w/v) separating gels were used. Quadruple application buffer (8% (w/v) SDS, 0.25 M Tris-HCl (pH 6.8), 20% (w/v) glycerol, 8% (w/v) β mercaptoethanol (BME), 0.2% (w/v) bromophenol blue) was added to the protein sample and boiled for 5 minutes at 100 °C. If protein aggregation was to be assessed, samples were prepared in two replicates: one boiled for 5 min, the other incubated at room temperature.

2.5.2 Coomassie Brilliant Blue staining of polyacrylamide gels

After SDS-PAGE, the gel was washed with water and then placed in Coomassie solution (0.25% (w/v) Coomassie Brilliant blue, 40% (v/v) ethanol, 10% (v/v) acetic acid) and boiled for 1 minute. Excess dye was washed off by boiling in water.

2.5.3 Semi-dry protein transfer

A Trans-Blot Turbo rapid transfer system (Bio-Rad), Amersham PVDF membrane and Whatman International Ltd. wad were used to transfer proteins to the membrane according to the methodology [333]. The membrane was pre-activated in methanol and washed in transfer buffer (20% (v/v) methanol, 0.2 M Tris, 25 mM glycine) before use. The following were placed sequentially on the lower electrode: a special sponge; 1 sheet of cotton wool corresponding to the size of the membrane and gel; the membrane; the gel; 1 sheet of cotton wool; and a second sponge. Each component was pre-wetted in transfer buffer before use. Transfer was performed at 25V for 30 minutes.

2.5.4 Protein isolation from mammalian cells

HEK293T cells were washed off the plates one day after transfection with trypsin-Versen solution (Biolot). The cells were precipitated by centrifugation at 1200 rpm for 5 min. An equal volume of RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% (w/v) Triton X-100, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 0.1% (w/v) SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM PMSF, 10 mg/ml leupeptin, 20% (v/v) protease inhibitors (Sigma P8340-5ML)) was added to the cell precipitate. The cells were incubated in the buffer for 30 min on ice. The solution was then treated with ultrasound (10 seconds at 50% power on a Bandelin SONOPULS HD 2070 ultrasonic homogeniser). The cell debris was collected by centrifugation at 2000 rpm at 4 °C for 10 minutes. The supernatant was used to prepare samples for SDD-AGE.

2.5.5 Protein extraction from yeast cells

S. cerevisiae yeast cells were cultured on selective medium to OD(600 nm) = 0.4 and collected by centrifugation at 5000 rpm. Proteins were extracted according to a published protocol [33], except for a modified lysis buffer (100 mM Tris-HCl (pH 7.6), 2 mM PMSF, 10 mM BME, 4% (v/v) protease inhibitors (Sigma, P8215)). The resulting protein lysate was used for semi-denaturing detergent agarose gel electrophoresis (SDD-AGE).

2.5.6 Semi-denaturing detergent agarose gel electrophoresis (SDD-AGE)

For electrophoresis, a 1.5% (w/v) agarose gel was prepared in one fold TAE (40mM Tris, 20 mM acetic acid, pH 8.3, 1 mM EDTA) buffer with 0.1% (w/v) SDS added. The gel was poured onto a substrate and allowed to solidify. The electrophoresis chamber was set in ice. Electrophoresis was performed for 4 hours at 30 V. Two samples were prepared to evaluate aggregation. Quadruple application buffer (8% (w/v) SDS, 2X TAE, 20% (w/v) glycerol, 0.2% (w/v) bromophenol blue) was added to the samples. BME up to 2% (v/v) was added to one sample and water was added to the other. The samples were incubated for 5 min at room temperature [334].

2.5.7 Capillary transfer of proteins

Amersham PVDF membrane and Whatman International Ltd paper were used for transfer. The system consisted of the following components corresponding to the size of the gel: a 2-3 cm high stack of filter paper; three dry Whatmans paper sheets; two Whatmans paper sheets soaked in TBS buffer (30 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl). The membrane, the gel and two Whatmans paper sheets soaked in TBS were placed on top. The system was covered with a "wick", a strip of Whatmans paper equal to the width of the gel, and lowered with its ends into the TBS cuvettes above the system. Before use, the membrane was pre-activated in methanol and washed in TBS buffer. A weight was placed on top of the system and incubated at 4 °C overnight.

2.5.8 Western blotting

Western blot hybridization was performed as described [335]. The membrane after transfer was incubated under stirring in TTBS buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween-20) with Blocking Agent (Amersham) added to 1% (w/v) for 15 min. The membrane was then incubated with primary antibodies for 1 hour and then washed with TTBS buffer three times for 15 min each. For EGFP-tagged protein detection, Anti Tag(CGY)FP (Eurogen) was used as primary antibodies at a dilution of 1:4000 in TTBS buffer with Blocking Agent (Amersham) added to 1% (w/v), and Rabbit IgG antibodies (Cytiva) at 1:20000 in TTBS buffer with Blocking Agent (Amersham) added to 0.2% (w/v) as secondary. For 6xHis tagged protein detection, Anti-His (GE Healthcare) in a dilution of 1:4000 in TTBS buffer with addition of Blocking Agent (Amersham) up to 1% (w/v) was used as primary antibody and mouse IgG antibody (Amersham) in a dilution of 1:20000 in TTBS buffer with addition of Blocking Agent (Amersham) up to 0.2% (w/v) as secondary antibody. After washing, the membrane was incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1 hour. The membrane was then washed again with TTBS buffer three times for 15 min each. The membrane was then treated with a mixture of reagents (luminol solution and hydrogen peroxide solution in a 1:1 ratio) (Amersha

ECL Select Western Blotting Detection Reagent). Chemiluminescence detection was performed on a GeneGnome instrument (SynGene).

2.6 Extraction and purification of recombinant proteins from *E.coli*

2.6.1 Extraction and purification of native α -synuclein

To generate a preparative amount of protein, an overnight culture of *E. coli* NiCo21(DE3) bacterial strain transformed with pDest527-nSNCA plasmid was diluted 100-fold and cultured for approximately two hours at 37 °C. Once OD(600 nm) = 0.3 was reached, induction was carried out by adding IPTG to a concentration of 1 mM and the cells were grown for 5 hours.

Extraction and purification of preparative amounts of α -synuclein protein from the bacterial strain was carried out according to a previously published protocol [336]. Cell precipitate from 1 L culture was resuspended in 100 ml of osmotic shock buffer (30 mM Tris-HCl (pH 7.2), 40% (w/v) sucrose, 2 mM EDTA) and incubated for 10 min at room temperature and agitation. The supernatant containing periplasmic protein was collected by centrifugation at 13500 g for 20 min at 4 °C and dialyzed in special cassettes (Thermo Scientific) against buffer A (20 mM Tris-HCl (pH 8.0)) in a ratio of 1:50 overnight. The precipitate remaining after centrifugation was stored at 4 °C to control protein extraction.

The supernatant fraction containing periplasmic protein in buffer A was applied to a HiTrap Q HP column (5 ml) (GE Healthcare) equilibrated with buffer A and eluted with a 0-1 M NaCl gradient in buffer A using an NGC chromatography system (Bio-Rad). The flow rate in all steps was 5 ml/min. The eluted fractions were collected on a BioFrac fraction collector (Bio-Rad) and analysed by SDS-PAGE using a 15% (w/v) separating polyacrylamide gel. The fractions containing the target protein were combined and concentrated using an Amicon Ultra-15 centrifuge concentrator with a pore diameter of 3 kDa (Merck).

Additional purification of α -synuclein was carried out by gel filtration on a HiLoad 16/600 Superdex 75 pg column (GE Healthcare) using an NGC instrument

(Bio-Rad). Concentrated protein in 0.5 ml buffer A was applied to the column at a flow rate of 0.5 ml/min and eluted with 1.5 column volumes of the same buffer at a flow rate of 0.5 ml/min. The fractions containing the target protein were combined and concentrated using an Amicon Ultra-15 centrifuge concentrator with a pore diameter of 3 kDa (Merck) and then stored at -80 °C.

2.6.2 Extraction and purification of NOS1AP fragments

To generate a preparative amount of protein, an overnight culture of *E. coli* T7 bacterial strain transformed with pDest527-NOS1AP(292-390) and pDest527-NOS1AP(391-506) plasmids was diluted 100-fold and cultured for about two hours at 37 °C. Once OD(600 nm) = 0.5, induction was carried out by adding IPTG to a concentration of 1 mM and the cells were cultured at 26 °C for 5 hours.

After precipitation *E. coli* cells were resuspended in lysis buffer (85 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 M urea) at a ratio of 10 ml per 1 g cells and incubated at 26 °C for 40-50 min. The suspension was sonicated (3 cycles of 10 s at 50% power on a Bandelin SONOPULS HD 2070 ultrasonic homogenizer). Cell debris was collected by centrifugation at 30000 rpm at 10 °C for 20 min. The supernatant with imidazole added to a concentration of 5 mM was applied to an HisTrap HP column (5 ml) (GE Healthcare) equilibrated with wash buffer (85 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 M urea, 5 mM imidazole). In order to remove non-specific proteins bound to the column after the supernatant had been applied, the column was washed with the same buffer with imidazole added to 20 mM. The NOS1AP(292-390) and NOS1AP(391-506) proteins were eluted with an imidazole gradient of 20-400 mM. Eluted fractions were collected on a BioFrac fraction collector (Bio-Rad) and analysed by SDS-PAGE using 15% (w/v) separating polyacrylamide gel. Fractions containing the target protein were pooled and concentrated using an Amicon Ultra-15 centrifuge concentrator with a pore diameter of 3 kDa (Merck). Additionally, the protein was concentrated using an Amicon Ultra-0.5 centrifuge concentrator with a pore diameter of 3 kDa (Merck).

2.7 Analysis of the protein aggregation

2.7.1 Aggregation of α -synuclein *in vitro*

α -Synuclein monomers at a concentration of 5 mg/ml in sterile PBS buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄ (pH 7.4)) were incubated at 37 °C and flipped 'over the head' on a rotator (BioSan). Before incubation, a sample of monomeric protein was taken and stored. A sample was then taken after two weeks of incubation. Samples were stained with thioflavin T and its fluorescence intensity was compared.

2.7.2 Aggregation of the NOS1AP(292-390) fragment *in vitro*

To investigate the ability of the amyloidogenic fragment NOS1AP(292-390) to form aggregates *in vitro*, the purified protein was dissolved in PBS buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄ (pH 7.4)) to a concentration of 1 mg/ml and incubated at 37 °C in a rotator with stirring "over the head" (BioSan). After 7 days, thioflavin T was added to the protein sample and its fluorescence intensity was measured.

2.7.3 Protein staining with thioflavin T

Thioflavin T (ThT) was added to the protein solution in PBS to a concentration of 40 μ M, stirred, then 150 μ l of sample was applied to a black-walled plate (Corning 3603). The fluorescence of ThT was excited by radiation at 450 \pm 16 nm and recorded in the wavelength range from 478 \pm 10 to 600 \pm 10 nm, measured using a CLARIOstar Plus multi-mode microplate reader (BMG LABTECH).

2.7.4 Analysis of protein aggregation kinetics

For the reaction, 96-well plates with transparent bottoms and black well walls (Corning 3603) were used. The wells at the periphery of the plate were filled with 150 μ l water. All interwells were also filled with 100 μ l water. Protein monomers at a

concentration of 1.5 μ g/ml, thioflavin T at 40 μ M and sodium azide to prevent contamination at a concentration of 0.05% (w/v) were added to the wells. The α synuclein monomers were pre-centrifuged for 30 min at 4 °C and an acceleration of 21130 g. To investigate the effect of inoculum on the acceleration of fibrillogenesis, pre-treated α -synuclein aggregates were added (10 seconds at 50% power of Bandelin SONOPULS HD 2070 ultrasonic homogenizer) when working out the method of aggregation kinetics analysis. In other cases the fibrils were not pre-treated with ultrasound. A glass bead about 3 mm in diameter was placed in each well to mix the reaction mixture evenly. Up to 150 μ l PBS buffer was added to the wells. The plate was covered with a lid and the seam was sealed with Parafilm tape. Detection of aggregation was performed at 37 °C using a CLARIOstar Plus multi-mode microplate reader (BMG LABTECH). ThT fluorescence was excited by radiation at 448 \pm 10 nm and recorded at 483 \pm 10 nm. The duration of a single measurement cycle was 15 min, with orbital agitation at 400 rpm for 30 s before each measurement.

In the subsequent analysis of the results for each reaction, we normalised the fluorescence values by taking the minimum value in each repetition as zero and the median fluorescence at the 'plateau' stage, when the aggregation process ended, as one. Then, for each reaction, we fitted the parameters of the following model (Figure 9) [337]:

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{(x - x_0)}{dx}}}, \quad (1)$$

where A_1 and A_2 are the initial and final fluorescence levels, x_0 is the half-reaction time, dx is the inverse of the aggregation rate. Taking into account the selected parameters we also calculated the lag-phase reaction time: $\text{lag} = x_0 - 2dx$.

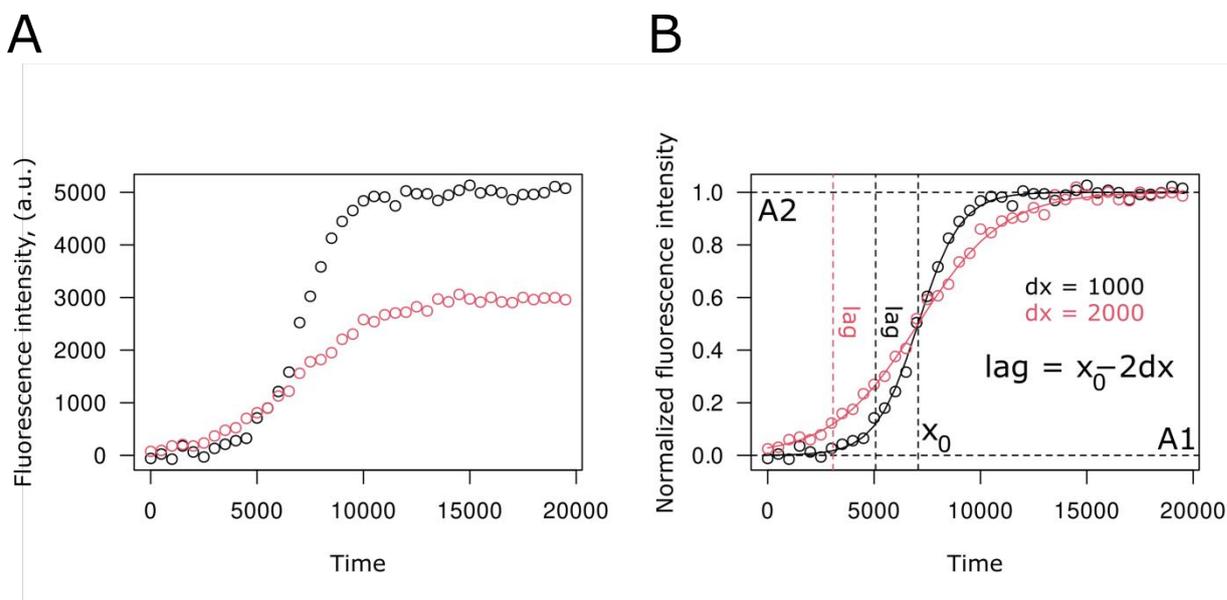


Figure 9. Schematic representation of α -synuclein aggregation kinetics model parameters. A – fluorescence growth curve of thioflavin T in two samples plotted against initial values. B – Fluorescence growth curve of thioflavin T in two samples plotted against normalized values. The main parameters of the model of aggregation kinetics are indicated. A1 and A2 are the initial and final fluorescence levels, x_0 is the time when the fluorescence reaches half of A2, dx is the inverse of the aggregation rate. The lag-phase reaction time is calculated as $\text{lag} = x_0 - 2dx$.

2.7.5 Protein concentration measurements

Protein concentration was measured by absorbance at 280 nm, corrected for scattering of the solution. The molar extinction coefficient value of $5120 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ was used to calculate the α -synuclein concentration. Absorption spectra were taken with a CLARIOstar Plus multi-mode microplate reader (BMG LABTECH) in an LVis plate (BMG LABTECH).

2.8 Statistical analysis

All statistical processing and plotting was done using the R package v. 4.0.2 (2020-06-22) (The R Foundation for Statistical Computing). For data visualisation, the package "ggplot2" [338] was used. Quantitative measures were compared using Wilcoxon-Mann-Whitney test [339].

2.9 Microscopy

2.9.1 Fluorescence microscopy

HEK293T cell cultures were analyzed in a 24-well culture plate 24 hours after transfection using a Leica DMI6000 inverted microscope at the Centre for Molecular and Cell Technologies, SPbU.

For the analysis of *S. cerevisiae* yeast cells, transformants were seeded into selective medium and cultured until $OD(600\text{ nm}) = 0.5 - 0.6$. Then 1 ml cells were collected by centrifugation at 5000 g for 1 minute, washed with water and harvested under the same conditions. The precipitate was resuspended in 20 μl water. The cell suspension was applied to a slide and covered with a coverslip. The preparations were analyzed on an Axio Scope.A1 fluorescence microscope with an AxioCam 506 color camera (Zeiss).

2.9.2 Transmission electron microscopy

Copper grids (100 or 200 mesh) were covered with a formvar film (0.3% (w/v) polyvinylformal solution in chloroform). Then 10 μl of the test solution was applied to the meshes and incubated for 30 seconds, and the liquid was removed with filter paper. To remove excess buffer, 10 μl of water was applied to the grid, which was then removed with filter paper. Finally 10 μl of 1% (w/v) uranyl acetate solution was applied, incubated for 30 seconds, and the remaining liquid was removed. Afterwards, the preparation was further washed with 10 μl of water [340]. The preparations were analyzed using a Jeol JEM-1400 electron microscope at the Centre for Molecular and Cell Technologies, SPbU. Fibril length was measured using ImageJ software [341].

2.9.3 Polarized light microscopy

A bacterial colony of cells grown on Congo red medium was resuspended in 10 μl of water and applied to a slide and covered with a coverslip. The sample was examined in transmitted and polarized light using a Leica DMI6000 inverted fluorescence microscope (the Centre for Molecular and Cell Technologies, SPbU).

2.10 Search for potentially amyloidogenic regions of NOS1AP

To identify the amyloidogenic site in the NOS1AP protein, we used ArchCandy software [10]. The choice of the program was based on a series of articles demonstrating its high accuracy compared to counterparts [10,342,343]. Using ArchCandy, we searched for potential β -arcs in the NOS1AP protein (threshold value 0.575, without additional built-in filters). According to the original article [10], the presence of at least one such structure indicates the ability of the protein to form amyloid aggregates. We also analyzed the amino acid sequence of NOS1AP protein for potential amyloidogenic sites using other algorithms such as Waltz [268], AGGRESCAN [264] and FoldAmyloid [266].

3. RESULTS

3.1. Bioinformatics search for the region of NOS1AP responsible for aggregation

NOS1AP protein was predicted as a potential amyloid using ArchCandy software [10]. We performed bioinformatics analysis to identify the NOS1AP site contributing to protein aggregation. As a result of this analysis, all the tools we used predicted an amyloidogenic fragment in the N-terminus of the protein at positions 1-291. The central region (amino acid positions 292-390) of NOS1AP and its C-terminal part (positions 391-506) are amyloidogenic according to Waltz and FoldAmyloid (Figure 10). Based on our analysis, we hypothesized that the NOS1AP fragment 292-390 is amyloidogenic. For the *NOS1AP* gene, two transcripts have been experimentally shown to exist, one corresponding to the full-length protein and the other to its C-terminal region (starting at 295 amino acid) that captures the amyloidogenic protein fragment (see reviews [277,278]).

We selected three NOS1AP sites for further analysis: 1-291, 292-390 и 391-506. The selection of these sites was primarily based on the results of the ArchCandy programme. For further work, pDONR221 series plasmids encoding sequences of these fragments were obtained. These constructs were subsequently used to obtain expression vectors for various model systems. All plasmids were verified by restriction analysis as well as by PCR. A summary list of the plasmids used in this work is presented in Table 1.

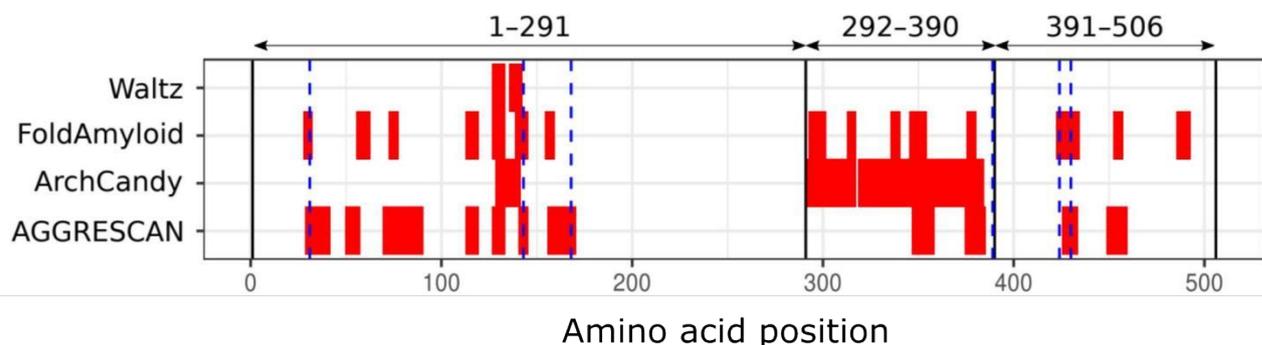


Figure 10. Potentially amyloidogenic fragments of the NOS1AP protein. Red rectangles correspond to potentially amyloidogenic sites predicted by different bioinformatic algorithms. Vertical black lines indicate three regions corresponding to the fragments analysed in this work. Blue dashed lines indicate cysteine positions.

3.2 NOS1AP and its fragments aggregate in different model systems

We used three model systems to study NOS1AP aggregation: the C-DAG for bacteria, *S. cerevisiae* yeast cells, and human cell cultures.

3.2.1 Investigation of the amyloid properties of NOS1AP and its fragments in the C-DAG system

The C-DAG system allows the rapid testing of amyloid properties of proteins *in vivo* in bacterial cells. It can be used to detect the formation of amyloid aggregates with a characteristic fibrillar morphology on the cell surface and to evaluate their ability to bind the amyloid-specific dye Congo red. However, the method has disadvantages. For example, it is difficult to examine large proteins in this system, which may be difficult to export outside the bacterial cell [36,323]. Another problem could be the toxic effect of the foreign protein on *E. coli* cells. Finally, the stacking of the protein may be different to that of an organism that produces the protein in the natural environment [344].

In the pVSGW plasmids used in the C-DAG system, the target protein is fused with the sequence encoding the signal peptide of the CsgA protein (CsgAss). This peptide is required to export the protein to the cell surface. Production of the chimeric protein is under the control of the arabinose-inducible promoter. The pVSGW plasmid was previously obtained in our laboratory and is a modification of the original pVS105 and pVS72 constructs [36]. For subsequent tests in the C-DAG system, we used the original bacterial strain *E. coli* VS39 [36], which was transfected with the obtained vectors. These cells also contain an auxiliary plasmid to overproduce the proteins responsible for the export of CsgA to the cell surface. The corresponding construct is under the control of a lactose promoter induced by isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Transformants were cultured in liquid medium according to the published protocol and seeded on the following set of media: selective medium for plasmid conservation, medium with arabinose and IPTG for overproduction of test proteins, and its derivative with the addition of Congo red dye. Cells carrying amyloid

aggregates on the surface are stained red as a result of amyloid binding to Congo red. The experiment in each case was performed for six independent transformants. The results suggest that neither NOS1AP nor its truncated variants form amyloid aggregates on the surface of bacterial cells. The colour of the colonies tested did not differ from the negative control (Sup35M). Cells overproducing Sup35NM (positive control) stained Congo red under the same conditions (Figure 11).

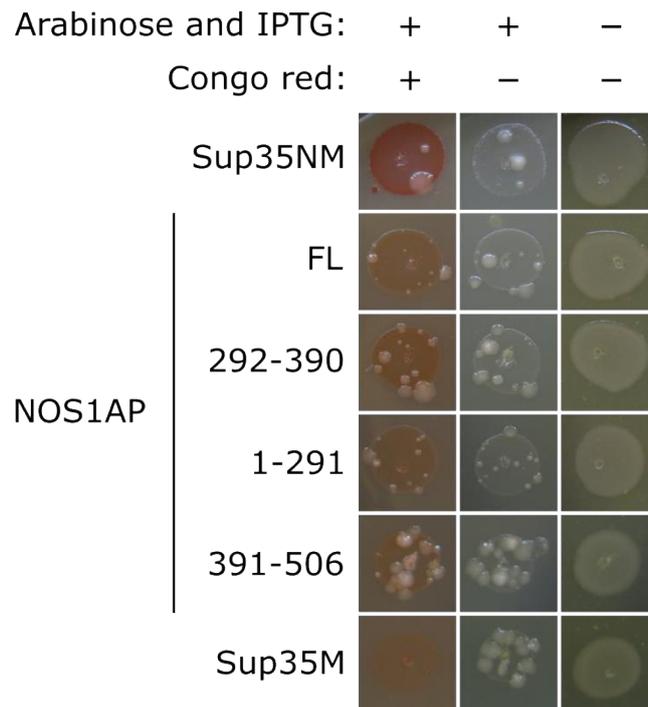


Figure 11. NOS1AP and its fragments do not bind Congo red in the bacterial C-DAG system. Photographs of the bacteria on different media on the third day of growth at 37 °C are presented. FL is a full-length NOS1AP protein, the numbers indicate the boundaries of the NOS1AP fragments taken in the assay. Sup35NM and Sup35M were used as positive and negative controls, respectively [36]. Smaller white colonies – colonies and altered plasmids – are visible against the larger colonies as the system used lacks the repair system defects characteristic of laboratory strains used to maintain plasmids.

One of the key properties of amyloid aggregates is their interaction with the amyloid-specific dye Congo red followed by apple-green birefringence in polarized light [29]. When bacterial colonies grown on medium with this dye were examined, bacterial cells producing NOS1AP or its fragments did not show similar properties

(Figure 12). Due to the negative results obtained, further tests in this bacterial system were considered inappropriate. The experiment was carried out in three replicates.

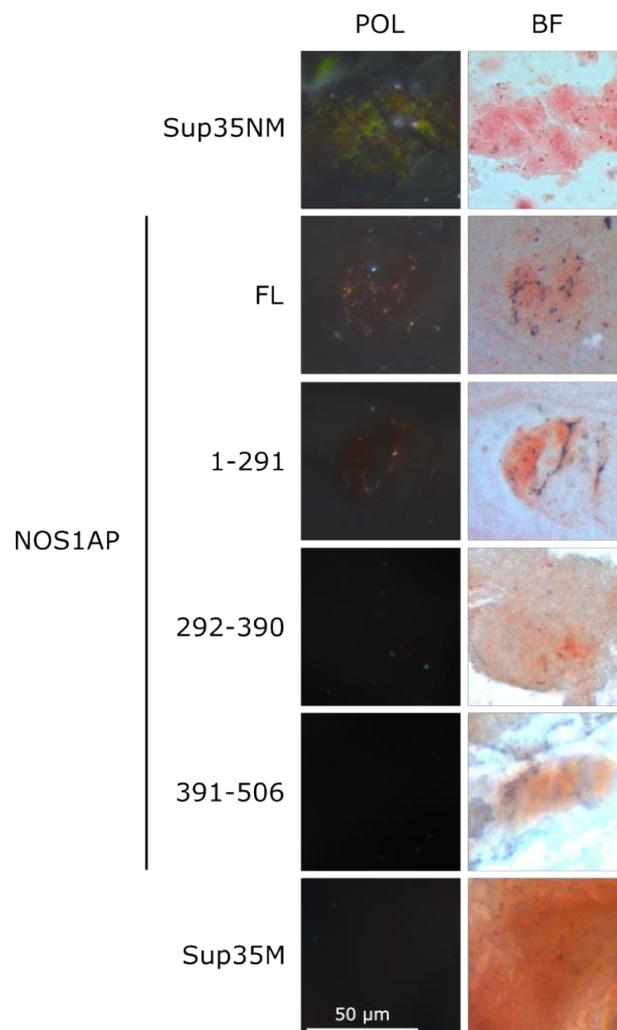


Figure 12. NOS1AP and its fragments do not show apple-green birefringence in polarized light. BF, transmitted light; POL, polarized light; FL, full-length NOS1AP protein; numbers indicate boundaries of NOS1AP fragments taken in analysis.

3.2.2 Analysis of the aggregation of NOS1AP protein and its fragments in *S. cerevisiae* yeast cells

The yeast *S. cerevisiae* is one of the most popular eukaryotic models for protein aggregation studies [9,345–347]. This is why we used this model system in our work. To investigate NOS1AP aggregation in yeast cells, we obtained a pAG416-EGFP-ccdB-based vector set in which the production of chimeric proteins (NOS1AP, or its

fragments fused to EGFP) is under the control of the constitutive yeast *GAPDH* gene promoter (Table 1). We analysed the localisation of the proteins in the cells using fluorescence microscopy.

According to the results obtained, NOS1AP and NOS1AP(1-291) form aggregates in yeast strain 2-74-D694 (Figure 13). At the same time, the NOS1AP(292-390) fragment, which is amyloidogenic according to ArchCandy (Figure 1), does not form aggregates in these cells (Figure 13). We made the observation that overproduction of the NOS1AP(391-506) fragment, which forms amorphous clusters in cells, leads to an increase in cell size. It can be assumed that the C-terminal PDZ-binding domain present in this fragment interacts with proteins with a PDZ domain. Proteins with this domain are found in various organisms, including the yeast *S. cerevisiae* [348]. This part of the protein is known to contain motifs required for the interaction of NOS1AP with nNOS in human cells. It is likely that these sequences can interact with some yeast proteins, which underlies the observed phenotype. The experiment was performed in three replicates and at least 40 fields of view were analysed.

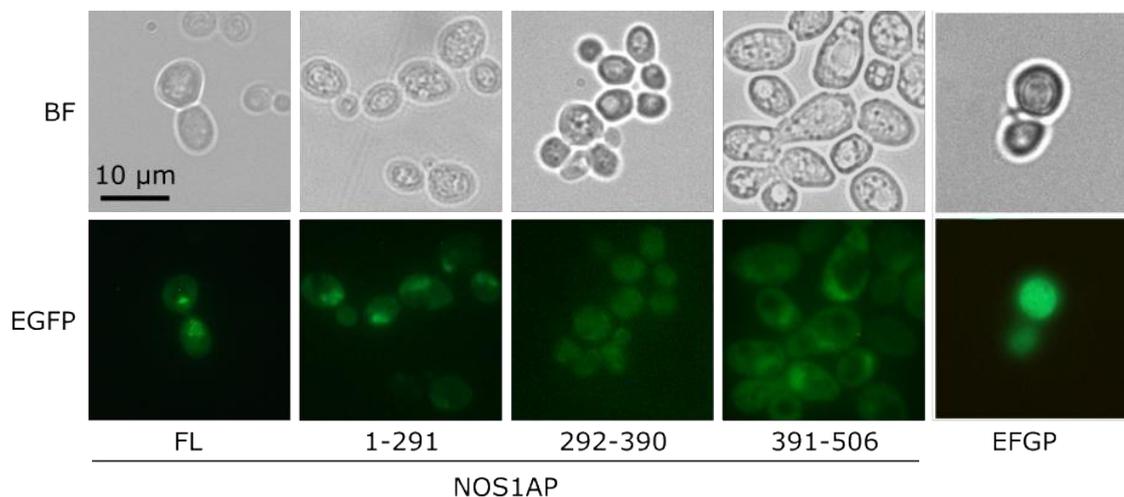


Figure 13. NOS1AP protein and NOS1AP fragment(1-291) form aggregates in yeast strain 2-74-D694. Microphotographs of yeast cells of strain [*pin*⁻] 2-74-D694 overproducing full-length NOS1AP protein (FL) or its fragments are presented (NOS1AP fragment boundaries are indicated by numbers). BF, light transmitted; EGFP, EGFP fluorescent signal.

We transformed strains 74-D694 with constructs encoding NOS1AP(1-291) and NOS1AP(391-506) (Figure 14). One of its features is the presence of prion [PIN^+] (Rnq1 protein aggregates). It has been shown previously that the presence of [PIN^+] factor can promote aggregation of some proteins in yeast cells [349]. We also used isogenic strain 2-74-D694, which lacks [PIN^+] factor (Figure 14).

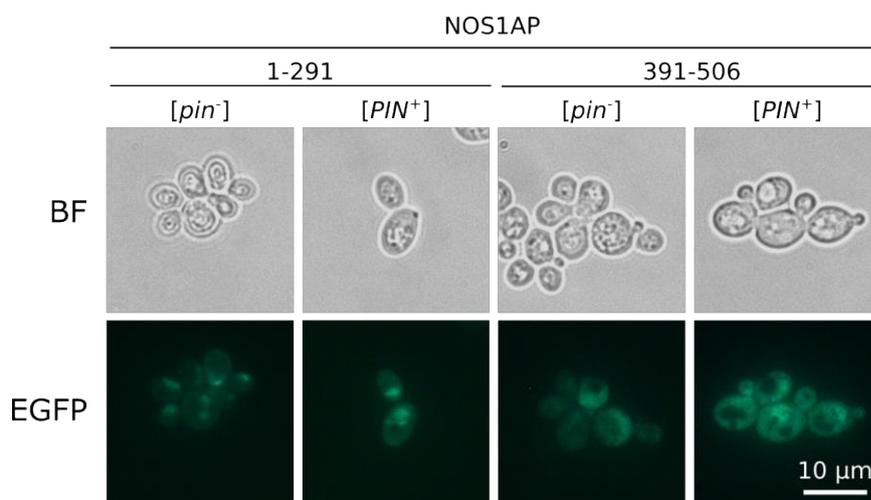


Figure 14. The [PIN^+] prion does not affect the aggregation of fragments 1-291 and 391-506 of the NOS1AP protein in yeast cells. Photographs of cells of strains 2-74-D694 ($[pin^-]$) and 74-D694 ($[PIN^+]$) transformed with pAG416-EGFP series plasmids in transmitted light (BF) and EGFP fluorescence (EGFP) are presented. Numbers indicate the boundaries of NOS1AP fragments taken in the analysis.

The presence of Rnq1 aggregates in yeast cells according to our data does not affect NOS1AP aggregation. In the Figure 14 shows the localization of NOS1AP(1-291) and NOS1AP(391-506) fragments in cells with and without prion [PIN^+] for comparison. The experiment was performed in three replicates and at least 40 fields of view were analysed for each construct.

3.2.3 Analysis of the aggregation of NOS1AP and its fragments in mammalian cell culture

Bacterial and yeast systems are convenient for investigating the amyloid properties of proteins. But when working with human proteins, it does not allow for the evaluation of processes occurring in the human body. Human cell cultures are a

convenient subject for work in this case. The HEK293T line is relatively easy to cultivate and transfect, so it was used in the first place.

Mammalian HEK293T cells were transfected with plasmids based on the pgLAP1 vector. This vector produces a construct encoding a protein of interest fused to the fluorescent protein EGFP, and the construct itself is under the control of a strong constitutive CMV promoter. The EGFP fluorescence was detected on a microscope 24 hours after transfection (Figure 15). Overproduction of NOS1AP as well as NOS1AP(1-291) and NOS1AP(292-390) fragments leads to their aggregation in cells. At the same time, the localization of NOS1AP(391-506) fragment in the cell is indistinguishable from EGFP and, judging by microscopy, it does not aggregate. It is worth noting that when NOS1AP, NOS1AP(1-291) and NOS1AP(292-390) proteins were overproduced, cells became more rounded, which may indicate a toxic effect. This observation is described and analysed in more detail in section 3.2.5. The experiment was carried out in three replicates and at least 50 fields of view were analysed.

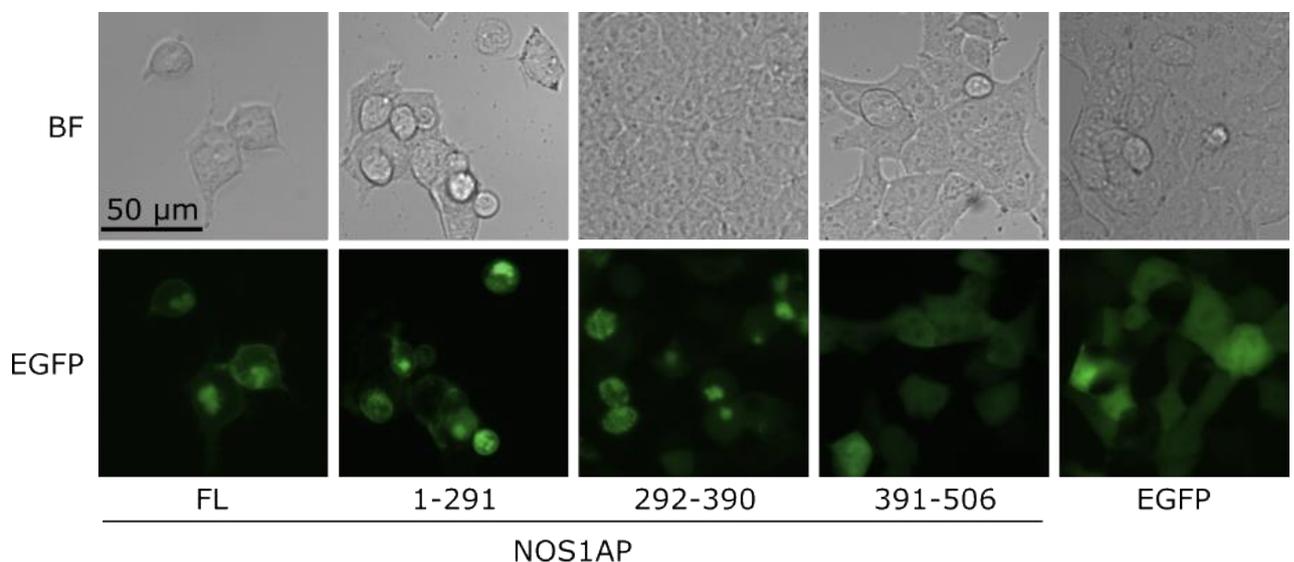


Figure 15. NOS1AP protein as well as NOS1AP(1-291) and NOS1AP(292-390) fragments aggregate in HEK293T cell culture. Pictures in transmitted light (BF) and EGFP fluorescence (EGFP) are presented. FL is a full-length NOS1AP protein, the numbers indicate the boundaries of the NOS1AP fragments taken in the assay. The EGFP construct was used as a negative control.

On closer inspection, one can note the different luminescence patterns of the clusters of proteins tested (Figure 16), which could indicate the different morphology of the aggregates.

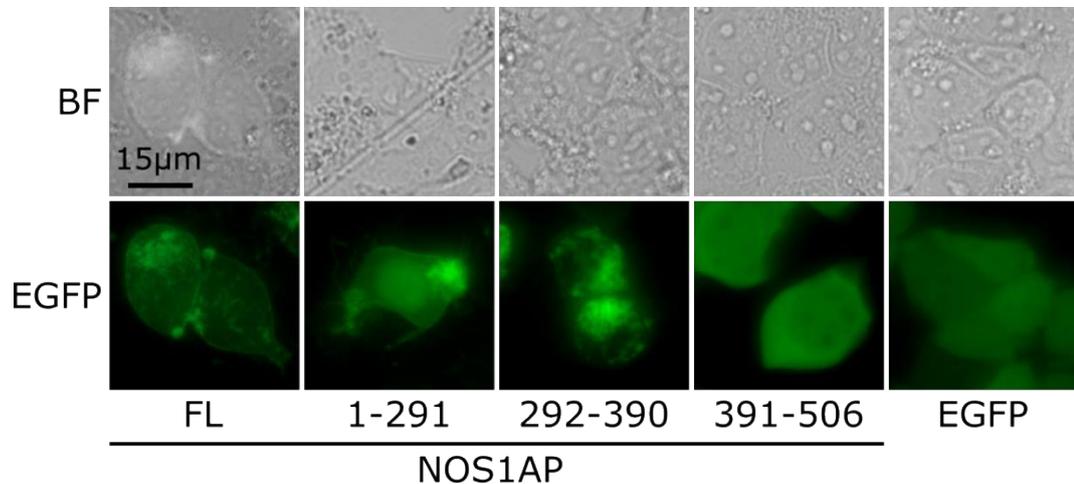


Figure 16. Distinct fluorescence patterns of the aggregates of the proteins analysed. Photographs in transmitted light (BF) and EGFP fluorescence (EGFP) are presented. FL is full-length NOS1AP protein, the numbers indicate the boundaries of NOS1AP fragments taken in the analysis. The EGFP construct was used as a negative control.

Similar results were obtained for the full-length NOS1AP protein and its fragment NOS1AP(292-390) in IMR-32 cells (Figure 17), but due to the low transfection efficiency of this line, no further experiments were performed with it.

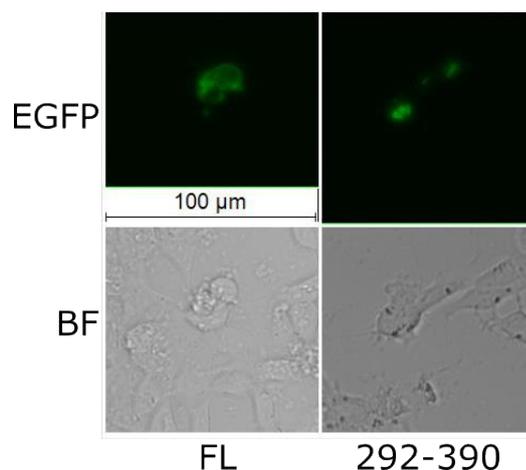


Figure 17. NOS1AP protein and its fragment NOS1AP(292-390) aggregate in IMR-32 cell culture. Pictures are presented in transmitted light (BF) and EGFP fluorescence (EGFP). FL is full-length NOS1AP protein, the numbers indicate the boundaries of the NOS1AP(292-390) fragment.

3.2.4 Analyses of the detergent-resistance of NOS1AP aggregates

The presence of protein aggregates observed by fluorescence microscopy does not unequivocally indicate that the protein in question is forming aggregates. The SDD-AGE method [334], can be used to solve this problem by detecting aggregates as well as investigating their resistance to detergents. β -Mercaptoethanol (BME) restores disulphide bonds, which can lead to destruction of the tertiary and quaternary structure of proteins. Therefore, BME can be used to convert a protein from an oligomeric to a monomeric state. However, BME cannot serve as a universal agent, and its effect is limited to the presence of disulfide bonds in a protein. Comparison of the size of protein aggregates in samples with and without BME treatment suggests that disulfide bonds are involved in the stabilization of these complexes.

Using the SDD-AGE method we found high molecular weight aggregates of NOS1AP and its fragments 1-291 and 292-390 in HEK293T cells that are resistant to SDS. These complexes appear to be stabilised by disulfide bonds as the addition of BME resulted in the dissolution of these complexes (Figure 18).

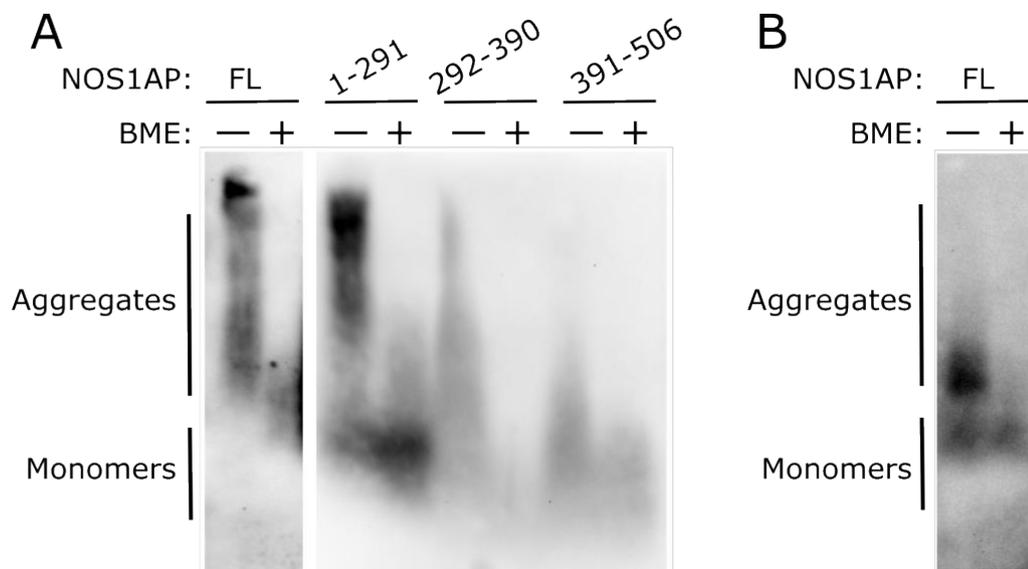


Figure 18. NOS1AP aggregates in yeast and in the HEK293T cell line. A – SDD-AGE of protein lysates of HEK293T cells overproducing NOS1AP or its fragments. Antibodies against NOS1AP (full-length protein) or (CGY)FP (fragments) were used for detection. B – SDD-AGE with protein lysates of yeast cells with NOS1AP overproduction. Antibodies to (CGY)FP were used for detection. "+" and "-" indicate buffers with or without β -mercaptoethanol (BME), respectively.

We also detected small aggregates of NOS1AP(391-506) that were not identified by fluorescence microscopy. NOS1AP in yeast cells is present as dimers and small oligomers resistant to SDS treatment (Figure 18). Thus, we can conclude that all aggregates of NOS1AP fragments show the same sensitivity to BME. This coincides with the distribution of cysteines in the protein; all fragments analysed contain such residues (Figure 10). Taken together, our results show that NOS1AP can form SDS-resistant aggregates upon overproduction in different model systems.

Given our data in the C-DAG system (Figures 11, 12), NOS1AP is probably not an amyloid, but is capable of forming stable, detergent-resistant, high-molecular-weight aggregates in eukaryotic cells (Figure 18).

3.2.5 HEK293T cell viability with NOS1AP overproduction

When analysing the morphology of NOS1AP aggregates in HEK293T cells using fluorescence microscopy, it was observed that the cells change their morphology and become more rounded (Figure 15). The cells remained alive as judged by trypan blue staining (data not shown). Using the MTT test, we found that NOS1AP overproduction decreased the survival rate of EGFP-producing cells relative to the control, EGFP-transfected vector (pgLAP1) cells. The decrease in survival during NOS1AP overproduction in HEK293T cells was comparable with that in cells overproducing α -synuclein with an A30P substitution (α Syn(A30P)) (Figure 19). It is noted in the literature that the formation of α -synuclein oligomers and fibrils with amino acid substitutions is toxic to cells [350], so we used the construct with this protein as a positive control.

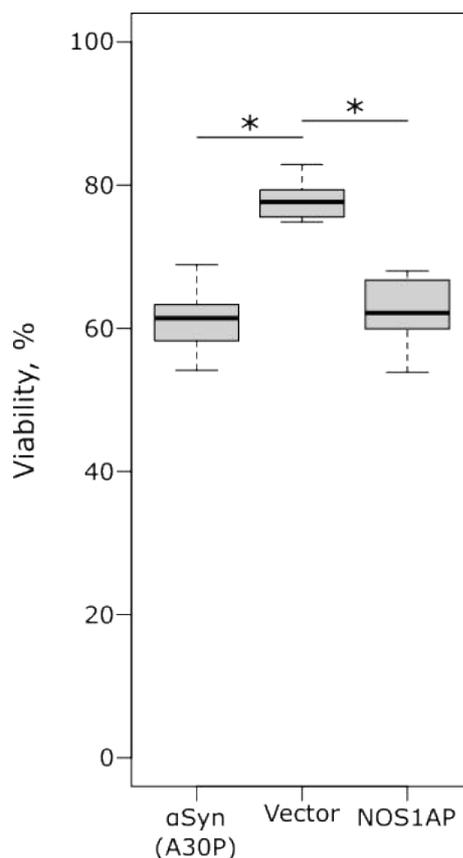


Figure 19. The survival rate of HEK293T cells with overproduction of NOS1AP is reduced. Comparison of survival of HEK293T cells by MTT-test when transfected with vector (pgLAP1), a construct encoding α -synuclein with A30P substitution (α Syn(A30P)) and a construct encoding NOS1AP. * - p-value <0.05, according to the Wilcoxon test.

3.3 Interaction of NOS1AP and its fragments with α -synuclein

3.3.1 Physical interaction of NOS1AP and its fragments with α -synuclein in HEK293T cells

Since NOS1AP came to our attention specifically as a protein capable of co-aggregating with α -synuclein, it was necessary to investigate their physical interaction. It is worth noting that data on the interaction of these two proteins have only been obtained by high-throughput proteomic screening [26], but no work has been performed to confirm this.

Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) [351] was used to investigate the physical interaction of two proteins in HEK293T cell culture. In this case, the

polypeptide chain of a fluorescent protein is split into two parts, each of which is unable to fluoresce on its own. Upon reassociation, these fragments form a functional fluorescent protein. This method is widely used to study protein-protein interactions. The approach is based on the use of chimeric proteins in which each of the pair of target proteins under study is attached to one of the two parts of the fluorescent protein. When the target proteins interact with each other, a fluorescent signal is generated in the cell. If there is no interaction between the two proteins of interest, the fluorescent protein does not reassociate and gives no fluorescence.

Mammalian HEK293T cells were transfected simultaneously with two plasmids based on pDEST-V1-ORF and pDEST-V2-ORF vectors, each encoding one of two proteins of interest fused to half of the Venus fluorescent protein (V1 and V2) [352]. The constructs themselves are under the control of a strong constitutive CMV promoter. Venus fluorescence was detected on the microscope 24 hours after transfection (Figure 20).

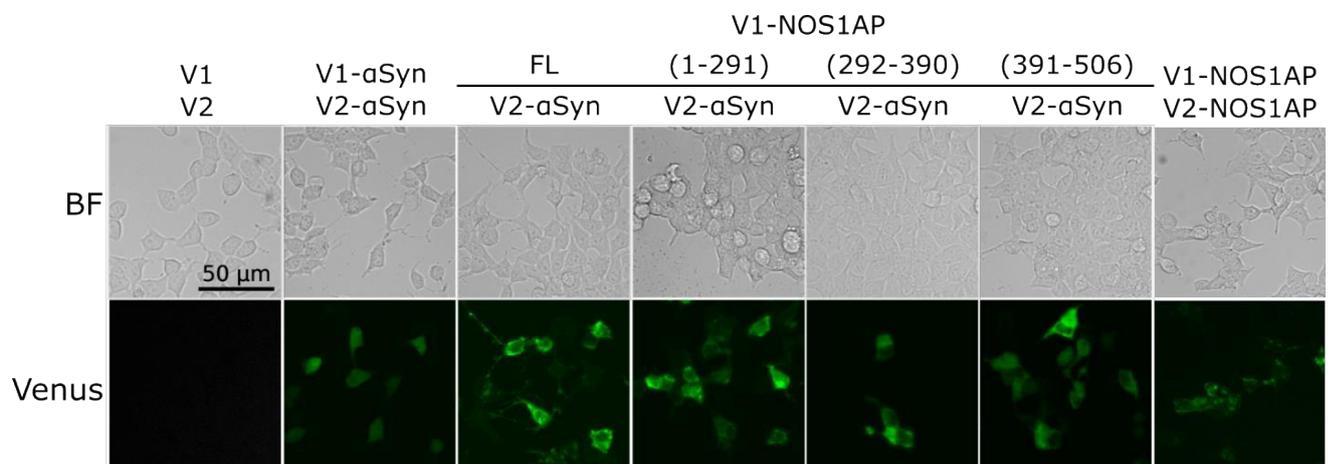


Figure 20. NOS1AP protein and its fragments physically interact with α -synuclein in HEK293T cells. Transmitted light (BF) images and fluorescence of the Venus protein are presented. Cells are transfected with two constructs with parts of the Venus fluorescent protein at once (V1 and V2).

Individual constructs as well as vectors with part of the fluorescent protein without the target protein did not result in luminescence. The full-length NOS1AP protein forms bright fluorescent clusters when interacting with α -synuclein (α Syn) in

HEK293T cells, suggesting a physical interaction between the two target proteins and also suggesting their coaggregation. In addition, it is worth noting that we used reciprocal combinations of protein and fluorescent tag (V1 and V2) and obtained similar results (data not shown). At least ten fields of view for each sample were analysed in the experiment.

Physical interaction of the corresponding proteins with α -synuclein was also observed with the constructs encoding NOS1AP fragments. Remarkably, α -synuclein interacted not only with the full-length protein but also with each of the three fragments studied (Figure 20). This is inconsistent with the assumption that there is a specific site in the amino acid sequence of the NOS1AP protein responsible for interaction with α -synuclein. In order to test whether the appearance of the fluorescence signal in the cell is not the result of a non-specific protein interaction, several experiments can be proposed. For example, paired with α -synuclein in the experiment take protein with which it should not interact. At least there should be no data on their interaction. Secondly, three constructs could be used simultaneously. Two of them, as in the standard BiFC experiment, would encode two target proteins, each fused to half of a fluorescent protein (for example, V1-NOS1AP and V2- α Syn). A third construct would encode one of the target proteins, but without the fluorescent tag (just NOS1AP). If NOS1AP and α -synuclein do physically contact, then V1-NOS1AP and unlabelled NOS1AP would compete with each other when interacting with V2- α Syn, which would be reflected in a reduced fluorescent signal compared to a sample with only two tagged proteins, V1-NOS1AP and V2- α Syn.

3.3.2 Colocalisation of NOS1AP and its fragments with α -synuclein in *S. cerevisiae* yeast cells

To investigate the interaction of NOS1AP proteins, as well as its fragments, and α -synuclein, *S. cerevisiae* yeast cells were simultaneously transfected with two plasmids based on pAG416GPD-EYFP and pAG415GPD-Cerulean vectors. In this system, two target proteins are synthesised in the cell, one fused to the EYFP fluorescent protein and the other to the Cerulean protein. The fluorescent protein pair EYFP and Cerulean is

suitable not only for assessing protein colocalisation by microscopy but also for evaluating the physical interaction of proteins of interest using the Förster resonance energy transfer (FRET) method.

In yeast cells, the NOS1AP protein colocalizes with α -synuclein. Colocalization of bright clusters was also observed for NOS1AP(1-291) and NOS1AP(292-390) fragments (Figure 21). In the case of the NOS1AP(391-506) fragment, there was no colocalisation, which is not consistent with the results obtained in HEK293T cells (Figure 20). It is worth noting that we observed the effect of this fragment fused to EGFP on yeast cell morphology (Figure 13). It can be assumed that this fragment enters a specific cellular environment and interacts with some yeast proteins that prevent its coaggregation with α -synuclein, noted in HEK293T cells. However, the fluorescent proteins EYFP and Cerulean themselves, which are not fused to the target proteins, do not form fluorescence foci and glow diffusely. At least 100 fields of view were analysed for each sample.

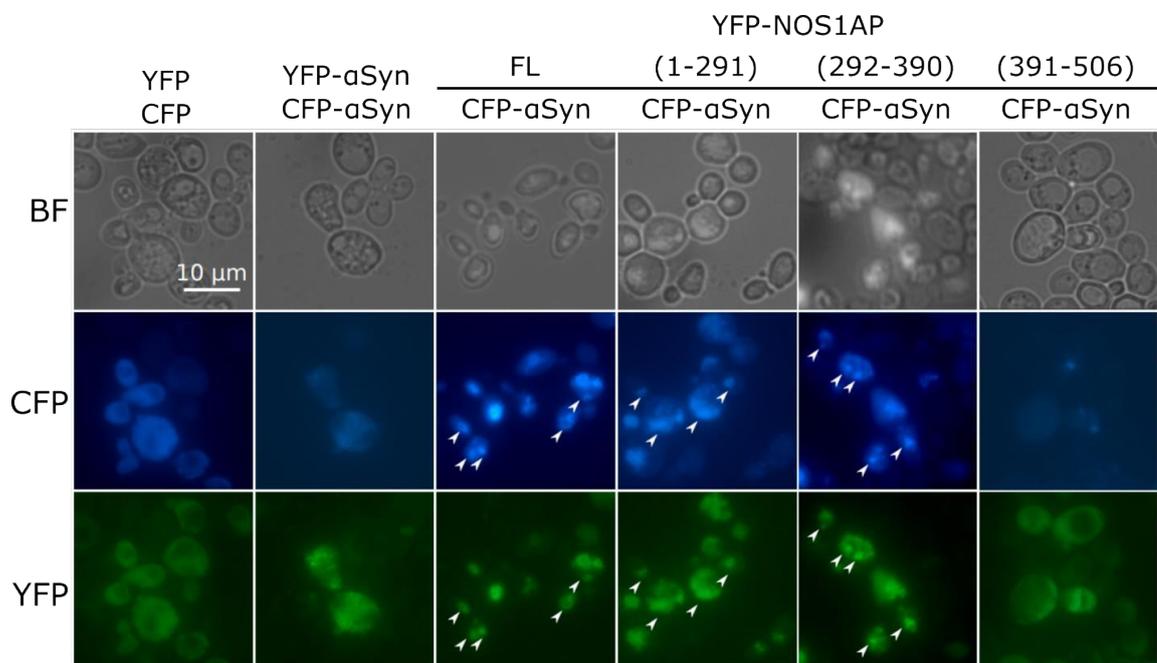


Figure 21. NOS1AP protein as well as its fragments NOS1AP(1-291) and NOS1AP(292-390) colocalize with α -synuclein in yeast cell culture. Microphotographs of yeast cells of strain [*pin*⁻] 2-74-D694 are presented. BF, transmitted light; CFP, Cerulean fluorescence; YFP, EYFP fluorescence; FL, full-length protein; α Syn, α -synuclein.

The work also examined α -synuclein variants with substitutions (A53T, A53E, A30P, E46K) for interaction with the NOS1AP protein. These substitutions result from point mutations in the *SNCA* gene and are associated with hereditary forms of parkinsonism [353]. Corresponding mutations were introduced into the pDONR221-*SNCA* plasmid by site-directed mutagenesis. The mutant *SNCA* alleles were then cloned into the pAG415GPD-Cerulean vector. An experiment to analyse protein interactions in the yeast system was carried out similar to the previous one. According to the data obtained, the proteins behave differently: as in the case of wild-type α -synuclein, the protein with A30P and A53E substitutions colocalizes with NOS1AP, but for the other variants we observed no interaction between proteins (Figure 22). We also observed that in some cases α -synuclein and NOS1AP did not colocalise. In particular, this was observed in the case of α -synuclein with an E46K substitution.

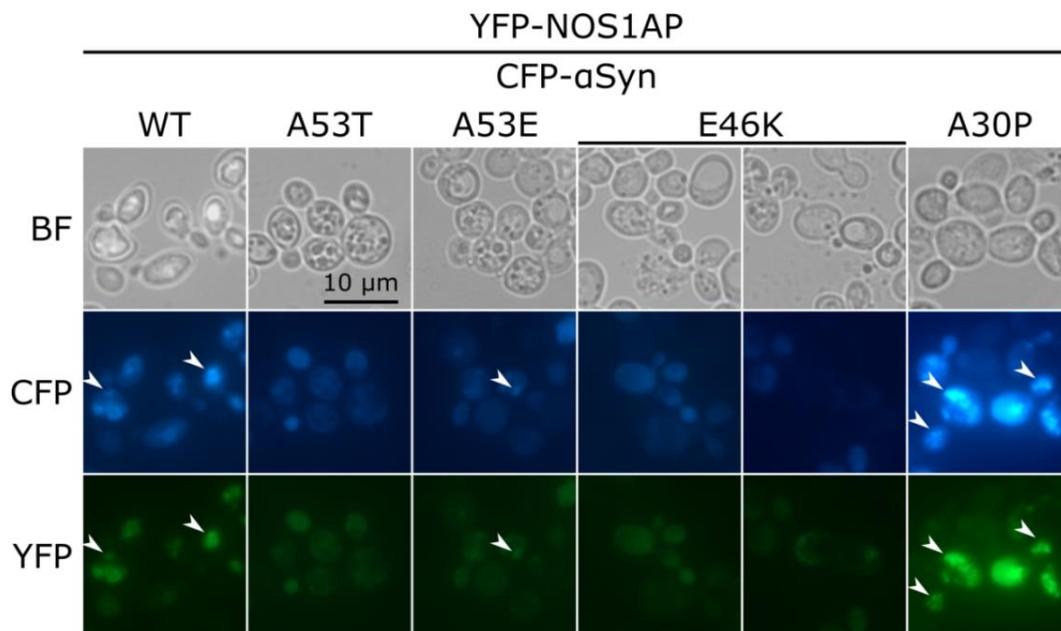


Figure 22. NOS1AP protein colocalizes with wild-type α -synuclein and α -synuclein mutants in yeast cell culture. Microphotographs of yeast cells of strain [*pin*⁻] 2-74-D694 are presented. BF, transmitted light; CFP, Cerulean fluorescence; YFP, EYFP fluorescence; α Syn, α -synuclein; WT, wild type.

3.4 Coaggregation of NOS1AP protein fragments with α -synuclein *in vitro*

To investigate the ability of the NOS1AP protein and its fragments to coaggregate with α -synuclein *in vitro*, it was necessary to obtain large amounts of purified proteins. The results of these preparatory steps are presented in sections 3.4.1 – 3.4.5.

3.4.1 Extraction and purification of native α -synuclein

When recombinant protein was obtained in bacterial cells, it was observed that when native α -synuclein was overproduced, large amounts of it were found in the periplasmic space [336]. To isolate it, the authors used osmotic shock with high sucrose buffer. Native α -synuclein was successfully generated, isolated and purified using the method described above (Figure 23). Anion exchange chromatography was used in the first purification step. Additional purification of the collected protein fractions was carried out using gel filtration.

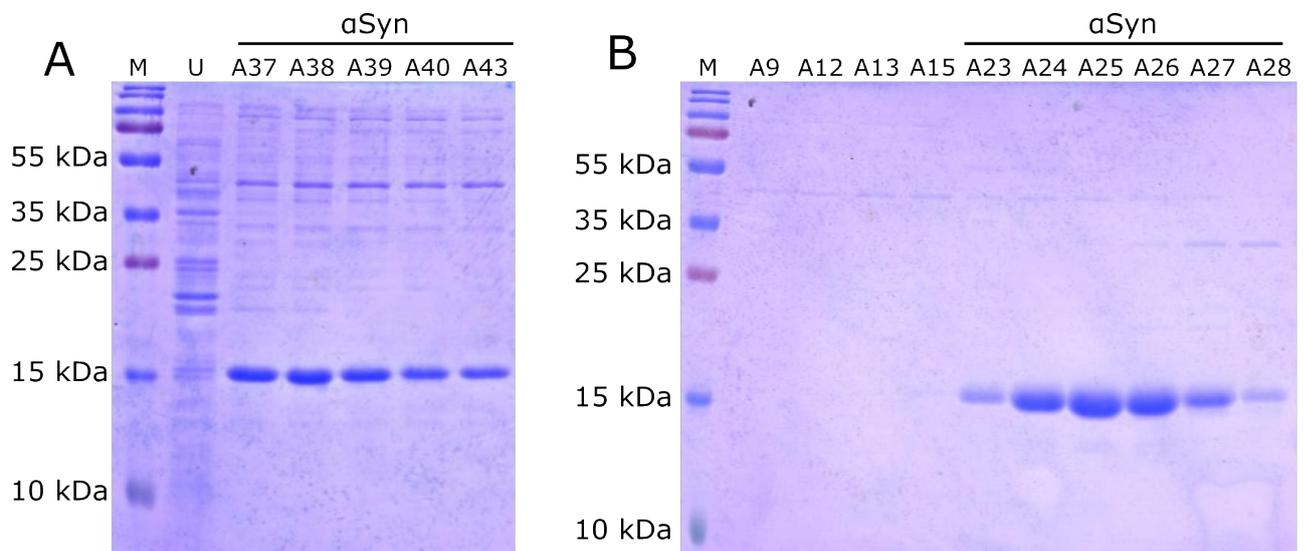


Figure 23. Purification of native α -synuclein. Typical SDS-PAGE results for fractions after purification of α -synuclein by anion exchange chromatography (A) and subsequent gel filtration (B) are presented. M, protein marker of molecular weight; U, protein fractions not bound to the sorbent; AN, elution fractions, where N is the sequence number of the fraction. The line marks the fractions that were combined and used in the work. Proteins were visualized using Coomassie blue staining.

3.4.2 Aggregation of α -synuclein *in vitro*

Purified α -synuclein was used to produce aggregates under *in vitro* conditions. It was incubated for 14 days at 37 °C (see section 2.7.1 for more details on the methodology for obtaining aggregates). Using SDS-PAGE, it was shown how some of the monomers were converted to an aggregated form, which was observed as a difference in the amount of monomeric protein in the samples with and without boiling (Figure 24, A). The resulting aggregates were fibrillar (Figure 24, B). These aggregates were capable of binding ThT (Figure 24, C). In this way, we obtained samples of amyloid α -synuclein aggregates.

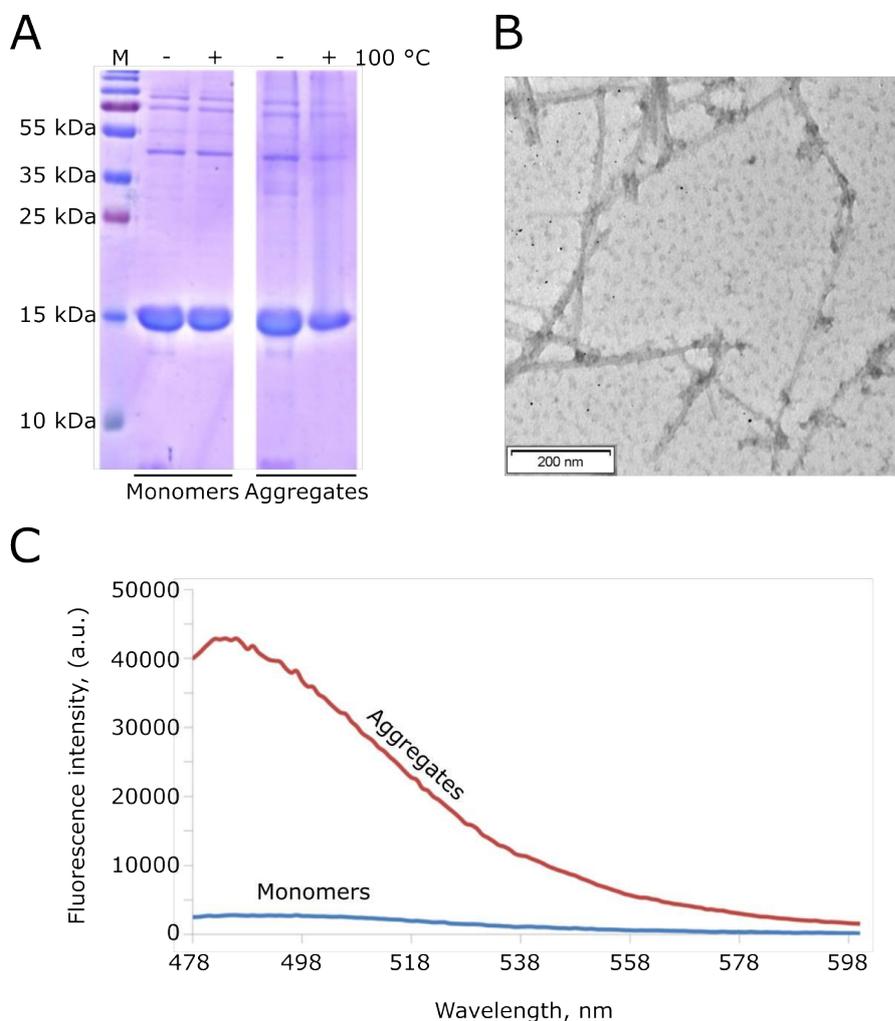


Figure 24. Preparation of α -synuclein fibrils. A – SDS-PAGE results of monomeric protein and aggregates electron micrographs of α -synuclein fibrils. B – electron micrograph of α -synuclein fibrils. C – Fluorescence spectrum of ThT in samples with monomeric and aggregated α -synuclein. ThT fluorescence was excited by radiation at 450 ± 16 nm and recorded in the wavelength range from 478 ± 10 to 600 ± 10 nm.

3.4.3 Isolation and purification of NOS1AP(292-390) and NOS1AP(391-506) fragments

Before obtaining preparative amounts of proteins, we compared their level of overproduction in different bacterial strains. Strains BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, T7 and Origami were transformed with constructs based on the pDest527 vector to produce NOS1AP protein and its fragments (Figure 10). In these constructs, the sequence of the protein of interest is fused to the 6xHis sequence. Unfortunately, the conditions for efficient induction and isolation of the full-length NOS1AP protein and its fragment NOS1AP(1-291) could not be selected. Comparative analysis of target protein production levels was performed for strains encoding NOS1AP(292-390) and NOS1AP(391-506) fragments. Trial induction of target protein synthesis resulted in the selection of strain T7 for both fragments due to its high rate of biomass accumulation and high level of protein of interest production (Figure 25).

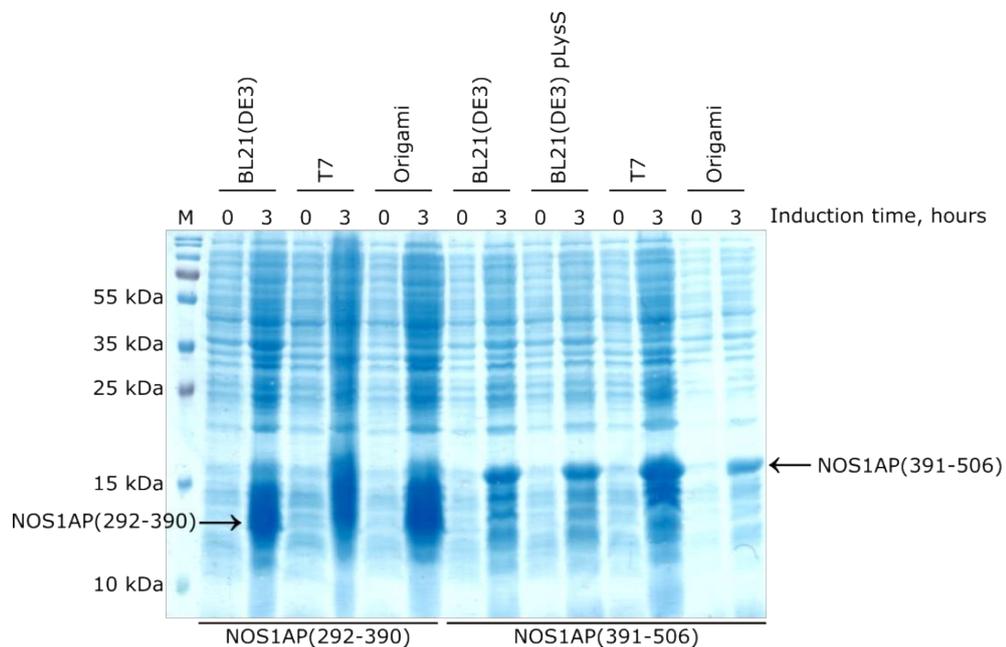


Figure 25. Induction of NOS1AP(292-390) and NOS1AP(391-506) fragment synthesis in BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, T7 and Origami strains cells. SDS-PAGE results of bacterial protein lysates are presented. Proteins were visualised using Coomassie staining. Arrows indicate the expected size of target proteins: 13.9 kDa for NOS1AP(292-390) and 15.5 kDa for NOS1AP(391-506). M is a protein marker of molecular weight.

For a T7 strain transformed with a plasmid to produce NOS1AP(292-390) or NOS1AP(391-506) fragments, culture conditions and induction of target protein synthesis were selected. Cultures were grown at 37 °C until OD(600 nm) = 0.5. Then IPTG was added to a concentration of 1 mM and the cultures continued to grow at 18 °C, 26 °C, 30 °C or 37 °C for 5 hours. Comparisons of the amount of protein after induction resulted in a temperature of 26 °C being chosen. Both proteins were subsequently purified by affinity chromatography (In the Figure 26 shows typical results).

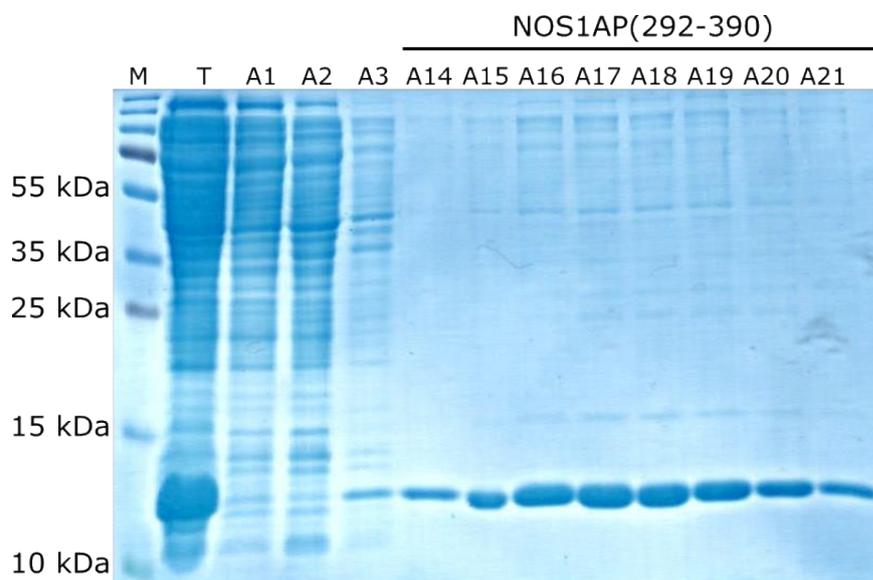


Figure 26. Purification of NOS1AP(292-390) fragment. Results of SDS-PAGE fractions after purification of NOS1AP(292-390) by affinity chromatography are presented. The gel was stained with Coomassie blue to visualise the proteins. M – protein molecular weight marker; T – lysate applied to the column; AN – elution fractions. The line marks the fractions that were pooled and used further in the work.

To investigate the ability of the amyloidogenic fragment NOS1AP(292-390) to form aggregates *in vitro*, the purified protein was incubated at 37 °C on a rotator with stirring "over the head". After 7 days, thioflavin T was added to the protein sample and its fluorescence intensity was measured. According to our results, the NOS1AP(292-390) fragment does not form aggregates capable of binding thioflavin T (Figure 27).

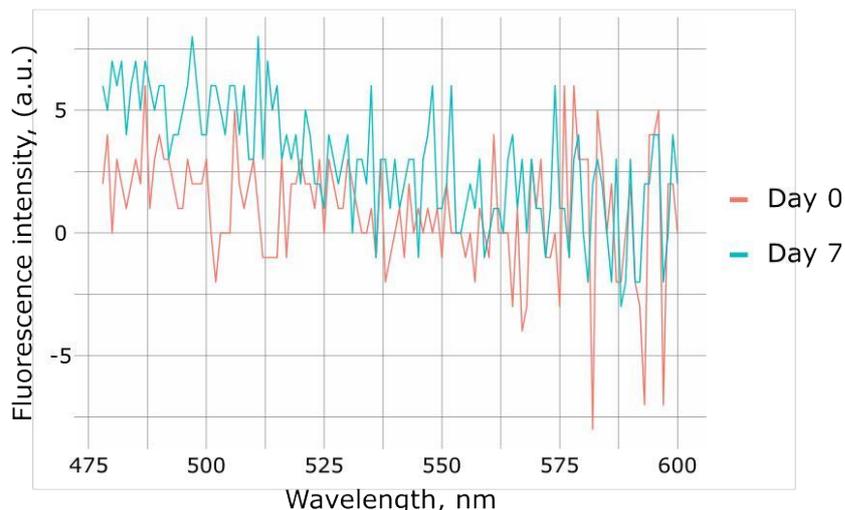


Figure 27. NOS1AP(292-390) does not form thioflavin T-binding aggregates. Fluorescence spectra of ThT in NOS1AP(292-390) fragment samples with a concentration of 1 mg/ml before incubation and 7 days afterwards are presented.

3.4.4 Replication of the methodology for the analysis of α -synuclein aggregation kinetics *in vitro*

Aggregation of wild-type α -synuclein is a long process and can take several weeks. When trying to reproduce this technique in plates, we encountered the problem of sample evaporation, which led to an abnormal increase in thioflavin T fluorescence. Subsequently, we were able to solve this problem by filling the peripheral wells as well as the space between them with water. While refining the methodology for monitoring the aggregation kinetics of α -synuclein, we tested various factors that could influence aggregation: the method of mixing and the need to fragment pre-existing aggregates.

We collected thioflavin T fluorescence data every 15 min on a Clariostar (BMG) plate reader. Then we calculated the parameters of α -synuclein aggregation kinetics model described in section 2.7.4. These parameters were: x_0 – half reaction time, dx – inverse of aggregation rate. Given the selected parameters, we also calculated the lag-phase reaction time: $\text{lag} = x_0 - 2dx$. This allowed us to analyse the aggregation process in more detail.

It has been described in the literature that the addition of glass beads accelerates α -synuclein aggregation and increases the reproducibility of results [354]. We tested the

possibility of using glass beads in our experiments. According to our data, this modification of the technique significantly accelerates aggregation (Figure 28). Based on these results, we retained this step of the protocol.

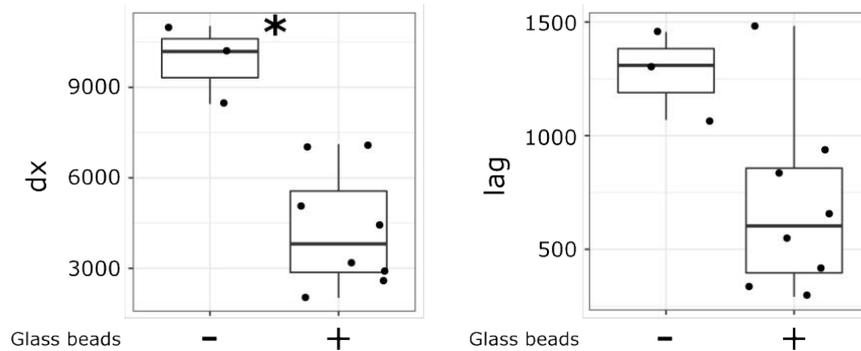


Figure 28. The addition of glass beads increases the aggregation rate. The graphs plot the values of the model parameters describing the aggregation process in different samples: dx (parameter inverse of aggregation rate) and lag phase in minutes. * – p-value <0.05, according to Wilcoxon test.

To assess the sensitivity of the technique we performed a series of α -synuclein aggregation experiments with the addition of pre-derived protein aggregates. Increasing the concentration of aggregated protein reduces the lag phase, and when 10% of the amount of monomeric protein is added, the lag phase is completely absent, fluorescence starts to increase steadily from the first cycles of measurements (Figure 29).

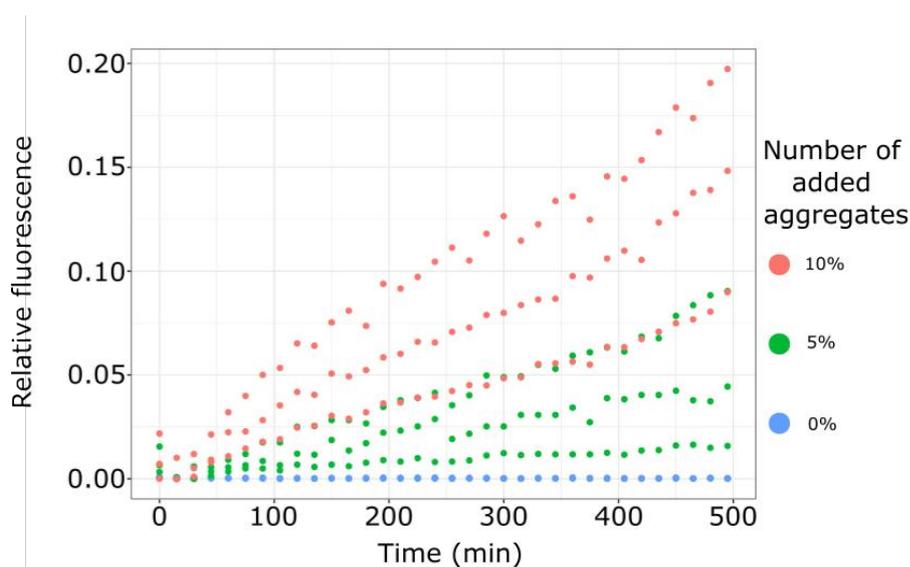


Figure 29. The addition of pre-existing aggregates accelerates the aggregation of α -synuclein. A plot of the change in ThT fluorescence during α -synuclein aggregation is presented. The graph represents the values of three repetitions of the experiment.

We also tested the effect of fragmentation of pre-existing aggregates on the aggregation rate of α -synuclein. According to the results obtained, ultrasound treatment has no effect on the aggregation process (Figure 30).

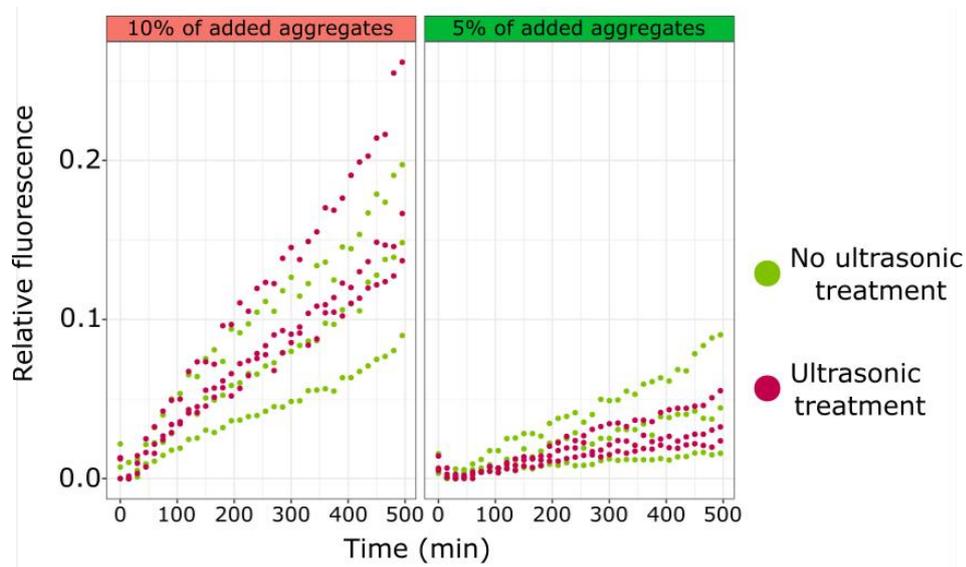


Figure 30. Fragmentation of α -synuclein fibrils by ultrasound has no effect on the rate of protein aggregation. A graph of the fluorescence variation of ThT during α -synuclein aggregation is presented.

We chose the following protocol as optimal. Composition of the reaction mixture in PBS buffer: monomeric α -synuclein 1.5 mg/ml, sodium azide 0.05% (w/v), thioflavin T 40 μ M. Monomeric α -synuclein after dissolution in PBS was centrifuged for 30 min at 4 $^{\circ}$ C and an acceleration of 21130 g. The sample volume per well was 150 μ l. A glass bead was added to each sample for better mixing

3.4.5 Coaggregation of NOS1AP(292-390) and NOS1AP(391-506) fragments with α -synuclein

To evaluate the effect of NOS1AP(292-390) and NOS1AP(391-506) fragments on the aggregation rate of α -synuclein, we calculated parameters of the α -synuclein aggregation kinetics model described in section 2.7.4. The value of dx (the inverse of aggregation rate) in α -synuclein aggregation is slightly different from that in a reaction in which NOS1AP(292-390) monomers are present besides α -synuclein monomer. The

lag-phase time increases slightly (Figure 31). In the case of co-aggregation of NOS1AP(391-506) and α -synuclein, the value of dx did not differ at all from the assay with α -synuclein alone (Figure 31). The lag-phase time also slightly increased in this case (Figure 31).

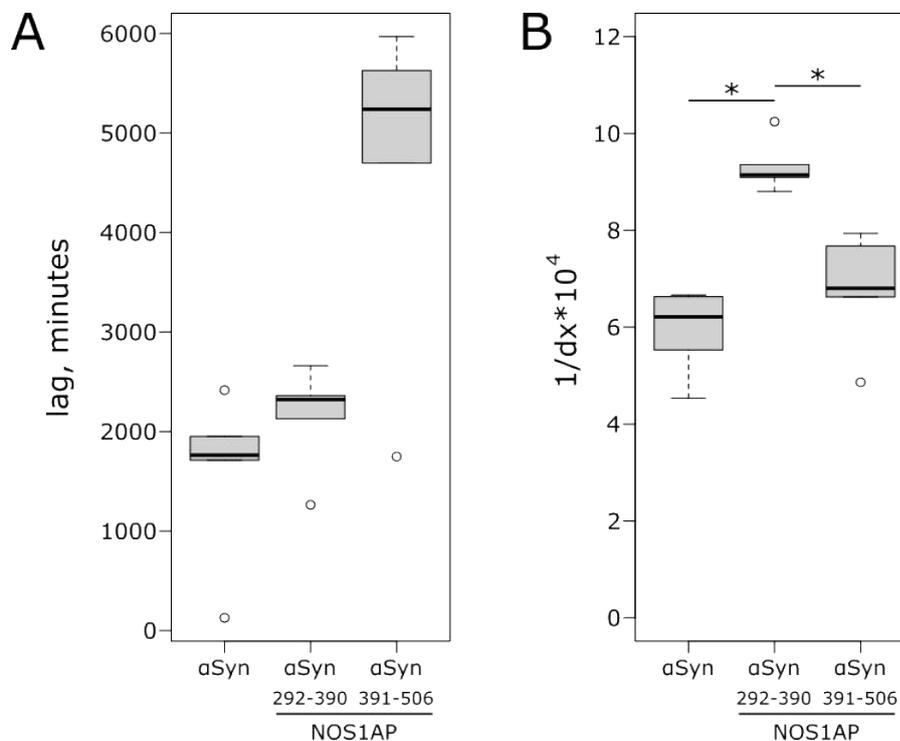


Figure 31. NOS1AP(292-390) fragment monomers accelerate α -synuclein aggregation but do not affect the lag-phase of this process. A – comparison of the lag-phase parameter (given in minutes) of α -synuclein aggregation (α Syn), α -synuclein with NOS1AP fragment(292-390) and α -synuclein with NOS1AP fragment(391-506). B – Comparison of the dx parameter (value inverse of the aggregation rate) of α -synuclein aggregation (α Syn), α -synuclein with NOS1AP(292-390) fragment and α -synuclein with NOS1AP(391-506) fragment. * – p-value < 0.05 , according to Wilcoxon test.

To estimate whether the addition of NOS1AP fragments affects the morphology of α -synuclein fibrils, we counted the length of fibrils formed by independent aggregation of α -synuclein as well as by coaggregation of α -synuclein with NOS1AP(292-390) and NOS1AP(391-506) fragments. It was observed that co-incubation with NOS1AP(292-390) and NOS1AP(391-506) fragments increased the length of α -synuclein fibrils (Figure 32). Thus, we can assume that the studied NOS1AP

fragments do interact with α -synuclein and also appear to stabilize its aggregates, leading to the formation of longer fibrils

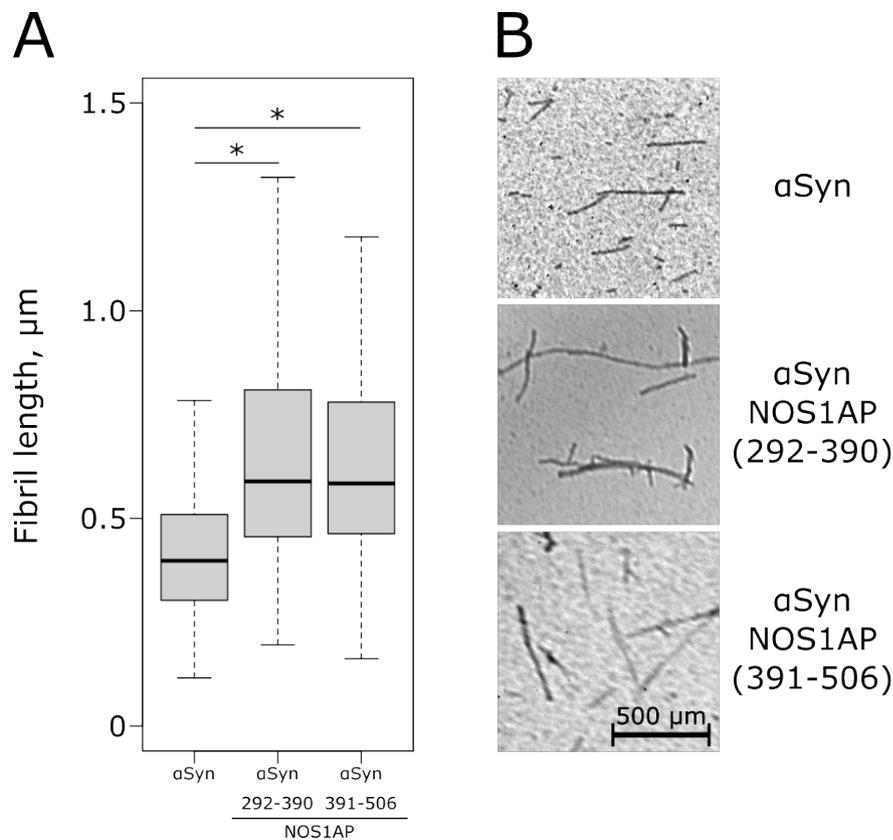


Figure 32. Comparison of α -synuclein fibrils characteristics during incubation together with NOS1AP fragments. A – Comparison of α -synuclein fibril lengths upon single aggregation as well as upon incubation together with NOS1AP(292-390) and NOS1AP(391-506) fragments. B – Electron micrograph of α -synuclein fibrils during single aggregation as well as during incubation together with NOS1AP(292-390) and NOS1AP(391-506) fragments. * – p-value < 0.05, according to the Wilcoxon test.

4. DISCUSSION

4.1 NOS1AP aggregation

The search for proteins prone to aggregation is an important task, not only in biology but also in medicine. Various serious diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, type 2 diabetes and many others are associated with amyloids. Most of these diseases are incurable and even fatal to humans. Studying new amyloidogenic proteins as well as the possibility of coaggregating already known amyloids is not only an important fundamental task in biology, but also opens up new targets for targeted treatment of the related diseases. The lack of detailed understanding of the molecular mechanisms of amyloid aggregate toxicity is an important reason for the lack of effective therapy for these diseases. There are hypotheses that link pathological effects to interactions between amyloids and other proteins. Of relevance here is the concept of 'amyloid networks' or 'amyloid cascade' found in relation to Alzheimer's disease, in which amyloid aggregation of at least two proteins is observed: amyloid- β and tau [355,356].

Searching for potential human amyloids *in vivo* is often difficult due to the difficulty of sampling material. This problem is particularly acute for brain samples. Most discoveries of neurodegenerative diseases have been based on histopathological studies of postmortem brain samples. Amyloid-specific dyes have been widely used to identify new amyloids. Congo red is considered the 'gold standard' for amyloid identification, but there are also examples of staining for non-amyloid proteins [29,357]. To solve the problem of human tissue material selection, it is possible to apply bioinformatic approaches to predict proteins prone to aggregation. A large number of algorithms exist for such tasks [358]. According to our bioinformatic calculations, the NOS1AP protein is amyloidogenic (Figure 10). In addition, NOS1AP can interact with α -synuclein according to proteome screening. Therefore, it seems logical to study samples from people with synucleinopathies in order to identify NOS1AP in aggregates together with α -synuclein. On the other hand, the process of their interaction may be temporary. And even if the NOS1AP protein is indeed amyloidogenic and does interact with

α -synuclein, it may not be present in sufficient amounts in patient samples if the interaction between the two proteins was short-lived. Moreover, assuming a functional role for NOS1AP aggregates, showing this directly in humans would be quite a challenge. All this allows us to conclude that the study of proteins whose properties are modelled by bioinformatics methods should begin with simpler models.

For the NOS1AP protein, neither its ability to oligomerise or aggregate, much less its ability to form amyloid fibrils, has been described in the literature. There are many methods for studying the amyloid properties of proteins, both *in vitro* and *in vivo*. In this work, we used a variety of them. Thus, a relatively simple bacterial C-DAG system was used. In it, the proteins we studied, both full-length NOS1AP and its fragments, showed no amyloid properties (Figures 11, 12). However, these data cannot be immediately extrapolated to humans due to both the completely different organism and the limitations of the method.

A yeast eukaryotic model is often used to investigate putative amyloid proteins [9,345–347]. In such a system, it is convenient to investigate the luminescence pattern of fluorescent tags coupled to the proteins of interest using fluorescence microscopy. It should be noted that microscopy alone is not sufficient to assess whether the protein in question is in monomeric, oligomeric or amyloid fibrils. To answer this question, additional studies are required. But there is also the problem of correct extrapolation of the results obtained in the case of human proteins. In our case, we observed by fluorescence microscopy that the full-length protein NOS1AP as well as its fragment NOS1AP(1-291) are able to form clusters in yeast cells. However, the exact amyloid nature of such clumps cannot be judged; therefore, additional studies are required. For this purpose, we used the SDD-AGE method and found that full-length NOS1AP in yeast cells is in the form of detergent-resistant oligomers, which, however, are sensitive to BME (Figure 18). The latter may indicate that such aggregates are stabilized by disulfide bonds.

In yeast cells, we observed that overproduction of the NOS1AP(391-506) fragment leads to morphological changes in cells (Figure 13). This fragment contains a C-terminal PDZ-binding domain that is able to interact with PDZ domain proteins to

which NOS1 belongs (Figure 33). Such proteins are also present in *S. cerevisiae* yeast cells [348]. It can be assumed that this interaction leads to changes in cell morphology. On the other hand, no such effect was observed for the full-length NOS1AP protein, although its sequence also contains a PDZ-binding domain. This may indicate that it is not always known how the studied protein will behave in a heterologous system where the protein is absent *in vivo*.

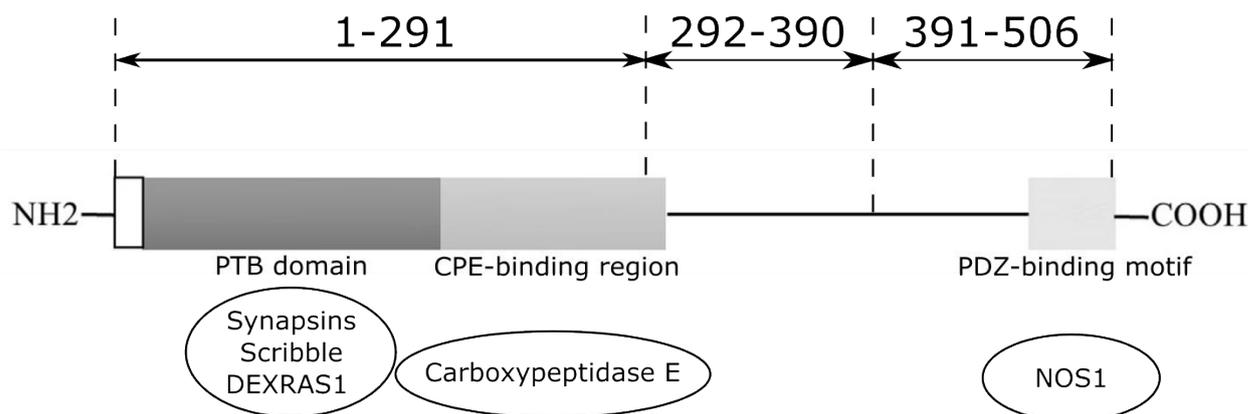


Figure 33. Domain organisation and proteins interacting with NOS1AP. Scheme of NOS1AP domains. The proteins that interact with them are signed below the individual sites: DEXRAS1, Scribble and synapsins (synapsin I, II and III) bind to the PTB domain; nNOS binds to the PDZ-binding motif; carboxypeptidase E (CPE) binds to the CPE-binding domain (modified from [278]). Borders indicate the fragments used in this work.

Mammalian cell cultures are one of the most adequate models for the analysis of human proteins with potentially amyloidogenic properties. However, cell lines are more often considered as *in vitro* systems. There are a large number of human cell lines with different origins, cell types and other features. We chose the HEK293T line because it is a very common and relatively easy model to work with. We also had in our arsenal the IMR-32 line, the experiments with which had to be abandoned due to low transfection efficiency. The line HEK293 (the precursor of HEK293T), derived from human embryonic kidney cells, was long thought to represent fibroblasts, endothelial or epithelial cells which are present in the kidneys. But it was later shown that this cell culture has many of the properties of undifferentiated neurons [359]. However, in the literature, HEK293 cells are more often referred to as non-neuronal cells. We observed

in our work that in both IMR-32 and HEK293T, the full-length NOS1AP protein as well as its fragment NOS1AP(292-390) form aggregates. The NOS1AP(1-291) fragment has the same effect in HEK293T cells (Figures 15, 16 and 17).

Overproduction of full-length NOS1AP protein as well as its fragments NOS1AP(1-291) and NOS1AP(292-390) affects mammalian cell morphology (Figure 15). It appears that aggregation of full-length NOS1AP is cytotoxic (Figure 19). In contrast, only the NOS1AP(391-506) fragment alters the appearance of yeast cells (Figure 13). We cannot yet offer a precise explanation for these differences. Perhaps overproduction of proteins with functional domains to which NOS1AP belongs results in disruption of cellular physiology. It is interesting to note that the NOS1AP(391-506) fragment occupies the whole space of the cell as indicated by diffuse luminescence of the EGFP tag and does not lead to morphological changes. But it is this fragment that affects the morphology of yeast cells in which its production is also elevated.

Thus, we can conclude that full-length NOS1AP and its fragment NOS1AP(1-291) form detergent-resistant aggregates in eukaryotic cells when overproduced (Figure 18). This conclusion is based on the following key results. In *S. cerevisiae* yeast cells, the investigated NOS1AP protein as well as its 1-291 fragment form aggregates (Figure 13). In turn, in HEK293T cell culture, the aggregates form full-length NOS1AP and its fragments NOS1AP(1-291) and NOS1AP(292-390) (Figure 15). Notably, the putative structured regions in the NOS1AP model fall within these regions, whereas the NOS1AP(391-506) fragment falls within the unstructured region (Figure 34).

It should also be added that not all known proteins with amyloid properties aggregate in human cell culture. For example, in the human cell line HEK293, aggregation of α -synuclein has a number of features. For example, small inclusions can form in cells, but it is quite rare for them to be transformed into aggregates. Sometimes overproduction of other proteins is required to enhance aggregation [360]. In the case of NOS1AP in our experiments, it aggregated without additional influences (Figure 16).

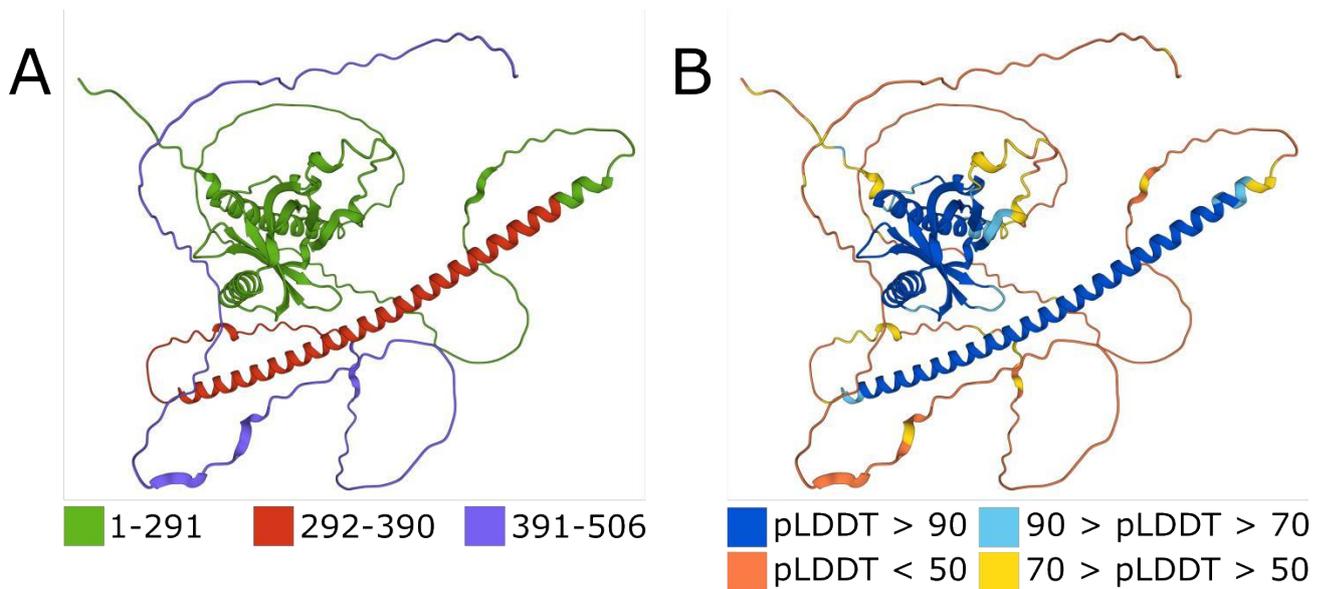


Figure 34. Three-dimensional structure of NOS1AP. Spatial structure of NOS1AP predicted using AlphaFold [361,362]. A – Spatial structure of NOS1AP with the regions taken into analysis in this work. B – Three-dimensional structure of the NOS1AP protein with the validity for each residue (pLDDT) expressed as a value from 0 to 100. Some regions with a pLDDT below 50 may be unstructured.

We showed that NOS1AP and its fragments 1-291 and 292-390 can form stable aggregates in yeast and/or mammalian cells. It should be added that in our work, protein overproduction constructs were used in eukaryotic cells, which also does not allow us to judge the behavior of this protein at normal levels of synthesis. However, it is worth noting that elevated amounts of *NOS1AP* gene mRNA as well as the corresponding protein have been reported in schizophrenia [22]. On the other hand, inactivation of various proteins in aggregates of their functional partners has been shown in many examples [13]. This suggests that NOS1AP aggregates are able to titrate nNOS, with a possible reduction in the number of nNOS complexes with NMDA receptors, which reduces NMDA-mediated calcium influx and deactivates the catalytic activity of nNOS. Reduced activity of these receptors has been suggested to be associated with the development of schizophrenia [311]. Thus, our data allow us to propose a new molecular mechanism within the glutamate hypothesis of schizophrenia development based on NOS1AP aggregation (Figure 35).

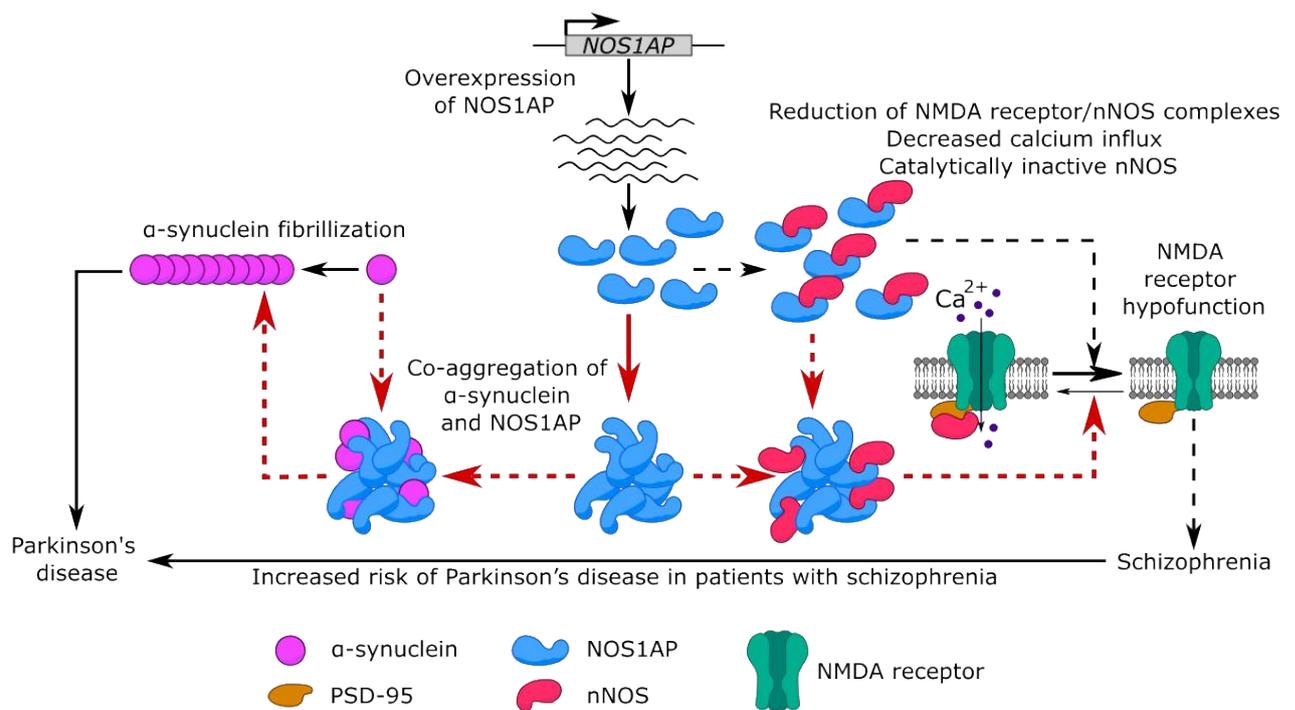


Figure 35. Possible role of NOS1AP aggregation in the pathogenesis of Parkinson's disease and schizophrenia. The black solid lines correspond to experimental results and the dashed lines to hypothetical assumptions. The red arrows indicate the processes and hypotheses that we suggest based on our results.

4.2 Interaction of NOS1AP with α -synuclein

The interaction of the NOS1AP protein with α -synuclein is only mentioned once in the literature and is the result of a proteomic screening based on co-immunoprecipitation followed by mass spectrometry [26]. However, no directed validation of this interaction has been performed. That said, NOS1AP does not appear in studies on protein-protein interactions of α -synuclein with partner proteins in synucleinopathies or schizophrenia [363,364]. Thus, we had the opportunity for the first time to study in detail the physical interaction of NOS1AP with α -synuclein.

The bimolecular fluorescence complementation method is a fairly common way to study protein-protein interactions in living cells. It is suitable for studying the interaction of two target proteins. In a more sophisticated variant, the method can even be extended to the study of three proteins. In this case, the FRET method based on BiFC takes place [365]. But even when only two proteins are studied, it is possible to use a

large number of controls, as there are theoretically eight combinations of constructs that differ from each other, for example the N- or C-terminal location of the fluorescent protein fragment [366]. Thus, care must be taken when obtaining fluorescent-tagged proteins and interpreting the results. In our work, the NOS1AP protein and its fragments NOS1AP(1-291), NOS1AP(292-390) and NOS1AP(391-506) were shown to interact with α -synuclein in HEK293T cells (Figure 20), which we can judge by the detection of fluorescent protein upon reassociation of its parts. This calls into question whether the NOS1AP protein sequence contains a specific site responsible for interaction with α -synuclein. It is possible that certain amino acid motifs with which α -synuclein interacts are present in the sequence of all fragments. It is also conceivable that the NOS1AP and α -synuclein proteins interact via some kind of mediator protein. However, this would be possible in human cells. In yeast cells, we showed colocalisation of full-length NOS1AP and its fragments NOS1AP(1-291) and NOS1AP(292-390) with α -synuclein (Figure 21). This confirms the previous results, although it does not allow us to speak with certainty about the physical interaction between the proteins in yeast cells. Interestingly, different results are observed for NOS1AP and α -synuclein colocalisation with amino acid substitutions (Figure 22). We can speculate that the A53T and E46K substitutions of α -synuclein interfere with its interaction with NOS1AP. Data on such interactions may be useful in light of the fact that α -synuclein variants with substitutions themselves have different properties, such as aggregation rate and cytotoxicity [353,367]. For a more detailed analysis, yeast lysates could be further examined using FRET, which would speak directly to their interaction. Notably, in the case of the NOS1AP(391-506) fragment, there is also a discrepancy in the experimental results in yeast and human cell cultures (Figures 20, 21). It is possible that when this fragment interacts with yeast proteins via the PDZ-binding motif, the probability of contact with α -synuclein is reduced. Taking into account our data on human HEK293T cell culture and *S. cerevisiae* yeast we can conclude that full-length NOS1AP as well as its fragments NOS1AP(1-291) and NOS1AP(292-390) interact with α -synuclein in eukaryotic cells during overproduction.

The coaggregation of two proteins during protein fibril formation is of great interest from a fundamental point of view. Therefore, the study of the ability of NOS1AP and α -synuclein proteins to coaggregate was an integral part of our study. In *in vitro* experiments, we demonstrated that the addition of the NOS1AP(292-390) fragment monomer accelerates the aggregation of monomeric α -synuclein (Figure 31). We also observed the following trend. The addition of NOS1AP(391-506) fragments increases the lag-phase time in α -synuclein fibrillation. When NOS1AP(391-506) and α -synuclein are incubated together, no increase in rate is observed. It can be assumed that the interaction of the two proteins occurs in such a way that the NOS1AP(391-506) fragment does not prevent the elongation of α -synuclein fibrils by being attached to an already formed oligomer or protofilament (Figure 36). This is probably a case of coaggregation where two proteins interact in monomeric form, then one of the proteins forms aggregates and the other remains specifically bound to it [13]. When NOS1AP(292-390) monomer is added, however, the rate of α -synuclein aggregation increases. It is possible that by binding to one α -synuclein molecule, the NOS1AP(292-390) fragment is able to bind another (Figure 36, B). In this case, the NOS1AP(292-390) protein bound to the α -synuclein fibril attracts other α -synuclein monomers, thereby stimulating secondary nucleation.

It is also worth noting that the addition of NOS1AP(292-390) and NOS1AP(391-506) resulted in longer α -synuclein fibrils than in the case of independent α -synuclein aggregation, which may further indicate an interaction between the proteins studied (Figure 32). A slight contradiction is observed: when both NOS1AP fragments are added, an increase in α -synuclein fibril length is observed, but acceleration of aggregation is observed only in the case of NOS1AP(292-390) fragment. It can be assumed that coaggregation with NOS1AP(292-390) does not overlap the NAC region of α -synuclein responsible for its amyloidization. Thus, it is possible that the NOS1AP(292-390) fragments additionally 'attract' monomers and oligomers of α -synuclein to each other, which on the one hand accelerates its aggregation and on the other hand promotes the stabilization and formation of longer fibrils (Figure 36, B).

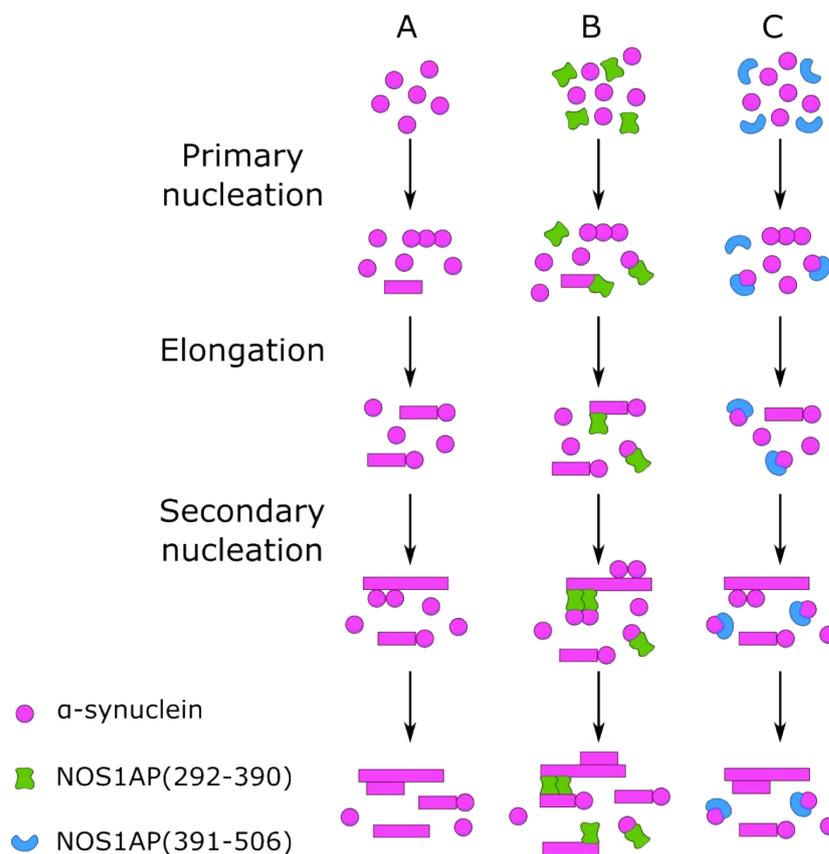


Figure 36. A suggested pattern of coaggregation of α -synuclein and NOS1AP fragments. Scheme of possible interaction of NOS1AP(292-390) and NOS1AP(391-506) fragments with α -synuclein during its amyloidization. A – process of formation of α -synuclein fibrils during its self-aggregation, which includes such stages as primary nucleation, elongation and secondary nucleation. B – process of formation of α -synuclein fibrils upon addition of NOS1AP(292-390) fragment monomers. In this case, NOS1AP fragments are able to bind to the formed fibrils, attracting other α -synuclein monomers to them, thereby accelerating secondary nucleation. C – process of formation of α -synuclein fibrils upon addition of monomers of NOS1AP(391-506) fragment. According to this scheme, NOS1AP fragment monomers bind α -synuclein monomers in such a way that the formation of α -synuclein oligomers is hindered, which can lead to delayed primary nucleation formation.

In the case of the NOS1AP(391-506) fragment, we can assume that its monomers just touch the NAC region of α -synuclein, which probably leads to some increase in the lag phase of the reaction, but further α -synuclein fibrillisation proceeds without significant rate changes. It can be suggested that the NOS1AP(391-506) fragment also enables α -synuclein fibrils to 'strengthen' due to their longer length than in the case of independent α -synuclein aggregation. It should be added that we also tried adding

bovine serum albumin as a second protein as a control (data not shown), but this had no effect on α -synuclein aggregation parameters.

Our findings have important biomedical significance because α -synuclein is a known human pathological amyloid, and data on its physical contacts with another protein may point to novel mechanisms of molecular processes leading to the development of synucleinopathies. On the other hand, NOS1AP protein has been associated with psychiatric disorders, mainly schizophrenia [23,24]. Thus, it is possible to suggest that some human pathological conditions are interrelated if the participants in their molecular mechanisms interact. In medical practice, cases of coexisting idiopathic parkinsonism and schizophrenia have been described [12]. There is also evidence that patients with schizophrenic spectrum disorders have an increased risk of developing Parkinson's disease [368].

Our data on the interaction and co-aggregation of NOS1AP and α -synuclein suggest a molecular mechanism underlying the co-existence of two socially relevant pathologies: Parkinson's disease and schizophrenia. An increase in the local concentration of α -synuclein in NOS1AP aggregates may contribute to its aggregation and the development of synucleinopathies (Figure 35).

Parkinson's disease and schizophrenia are two neuropsychiatric disorders that represent two extremes of the dopaminergic spectrum, where in Parkinson's disease there is dopamine deficiency and in schizophrenia there is excessive dopamine activity in the midbrain [364]. Simultaneous therapy of these disorders is complicated by the fact that the drug treatment of each disorder has the opposite effect on dopamine levels [369]. These cases suggest that the nigrostriatic and mesolimbic dopaminergic pathways function independently, with the result that patients with schizophrenia are not necessarily less likely than others to develop idiopathic parkinsonism as they age. Thus, it is conceivable that aggregation of the NOS1AP protein and/or its coaggregation with α -synuclein (and possibly other pathological amyloids) leads to destabilization of neuronal NO synthase function, and consequently impaired NO formation, which can result in the development of a broad spectrum of neurological and neurodegenerative diseases.

From another perspective, a mechanism based on α -synuclein modification may also explain the relationship between Parkinson's disease and schizophrenia. It can be assumed that increased production of NOS1AP leads to excessive nitration of cellular proteins. Nitration is one of the possible oxidative mechanisms leading to the formation of α -synuclein oligomers through dityrosine 'cross-linking' [370]. Nitrated α -synuclein is found in Levy corpuscles in brain samples of patients with Parkinson's disease [227,371,372]. For example, soluble α -synuclein nitrated to Tyr39 binds inefficiently to proteases, leading to a reduced rate of its degradation, accumulation and formation of protein fibrils [373]. Thus, it can be suggested that overproduction of NOS1AP may also lead to α -synuclein nitration and affect its aggregation (Figure 35). In this case, it is worth mentioning a study in which, in mice, *NOS1AP* overexpression led to significantly higher levels of phosphorylated, oligomerised and insoluble tau as well as increased tyrosine nitration at position 29 (Tyr29) [25].

Thus, our work has shown that the NOS1AP protein and its fragments form aggregates in mammalian cells. We were also able to show for the first time the interaction of NOS1AP protein and its fragments with α -synuclein. Moreover, we demonstrated that NOS1AP(292-390) monomers can accelerate α -synuclein aggregation.

5. CONCLUSIONS

The following conclusions can be drawn from the results obtained:

1. NOS1AP protein and its fragments form detergent-resistant non-amyloid aggregates in yeast and human cells during overproduction.
2. NOS1AP protein physically interacts and coaggregates with α -synuclein in yeast and human cells during overproduction.
3. NOS1AP fragments affect the aggregation kinetics of α -synuclein.

6. REFERENCES

1. Матиив А.Б., Трубицина Н.П., Матвеевко А.Г., Барбитов Ю.А., Журавлева Г.А., Бондарев С.А. Амилоидные и амилоидоподобные агрегаты: многообразие и кризис термина // Биохимия. 2020. Vol. 85, № 9. P. 1213–1239.
2. Sergeeva A. V., Galkin A.P. Functional amyloids of eukaryotes: criteria, classification, and biological significance // Curr. Genet. 2020. Vol. 66, № 5. P. 849–866.
3. Rubel M.S., Fedotov S.A., Grizel A. V., Sopova J. V., Malikova O.A., Chernoff Y.O., et al. Functional mammalian amyloids and amyloid-like proteins // Life. 2020. Vol. 10, № 9. P. 156.
4. Sipe J.D., Benson M.D., Buxbaum J.N., Ikeda S., Merlini G., Saraiva M.J.M., et al. Amyloid fibril protein nomenclature: 2012 recommendations from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis // Amyloid. 2012. Vol. 19, № 4. P. 167–170.
5. Ono K., Takahashi R., Ikeda T., Yamada M. Cross-seeding effects of amyloid β -protein and α -synuclein // J. Neurochem. 2012. Vol. 122, № 5. P. 883–890.
6. Hu R., Zhang M., Chen H., Jiang B., Zheng J. Cross-seeding interaction between β -amyloid and human islet amyloid polypeptide // ACS Chem. Neurosci. 2015. Vol. 6, № 10. P. 1759–1768.
7. Chen S.G., Stribinskis V., Rane M.J., Demuth D.R., Gozal E., Roberts A.M., et al. Exposure to the functional bacterial amyloid protein curli enhances alpha-synuclein aggregation in aged Fischer 344 Rats and *Caenorhabditis elegans* // Sci. Rep. 2016. Vol. 6. P. 34477.
8. Laurén J., Gimbel D.A., Nygaard H.B., Gilbert J.W., Strittmatter S.M. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers // Nature. 2009. Vol. 457, № 7233. P. 1128–1132.
9. Rubel A.A., Ryzhova T.A., Antonets K.S., Chernoff Y.O., Galkin A. Identification of PrP sequences essential for the interaction between the PrP

- polymers and A β peptide in a yeast-based assay // *Prion*. 2013. Vol. 7, № 6. P. 469–476.
10. Ahmed A.B., Znassi N., Château M.-T., Kajava A. V. A structure-based approach to predict predisposition to amyloidosis // *Alzheimers. Dement.* 2015. Vol. 11, № 6. P. 681–690.
 11. Carrel D., Hernandez K., Kwon M., Mau C., Trivedi M.P., Brzustowicz L.M., et al. Nitric oxide synthase 1 adaptor protein, a protein implicated in schizophrenia, controls radial migration of cortical neurons // *Biol. Psychiatry*. 2015. Vol. 77, № 11. P. 969–978.
 12. Winter C., Juckel G., Plotkin M., Niehaus L., Kupsch A. Paranoid schizophrenia and idiopathic Parkinson's disease do coexist: a challenge for clinicians. // *Psychiatry Clin. Neurosci.* 2006. Vol. 60, № 5. P. 639.
 13. Bondarev S.A., Antonets K.S., Kajava A. V, Nizhnikov A.A., Zhouravleva G.A. Protein co-aggregation related to amyloids: methods of investigation, diversity, and classification // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19, № 8. P. 2292.
 14. Bhasne K., Mukhopadhyay S. Formation of heterotypic amyloids: α -synuclein in co-aggregation // *Proteomics*. 2018. Vol. 18, № 21–22. P. e1800059.
 15. Horvath I., Wittung-Stafshede P. Cross-talk between amyloidogenic proteins in type-2 diabetes and Parkinson's disease. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016. Vol. 113, № 44. P. 12473–12477.
 16. Aulić S., Masperone L., Narkiewicz J., Isopi E., Bistaffa E., Ambrosetti E., et al. α -Synuclein amyloids hijack prion protein to gain cell entry, facilitate cell-to-cell spreading and block prion replication // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 10050.
 17. Tsigelny I.F., Crews L., Desplats P., Shaked G.M., Sharikov Y., Mizuno H., et al. Mechanisms of hybrid oligomer formation in the pathogenesis of combined Alzheimer's and Parkinson's diseases. // *PLoS One*. 2008. Vol. 3, № 9. P. e3135.
 18. Giasson B.I., Forman M.S., Higuchi M., Golbe L.I., Graves C.L., Kotzbauer P.T., et al. Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein // *Science*. 2003. Vol. 300, № 5619. P. 636–640.
 19. Yan X., Uronen R.-L., Huttunen H.J. The interaction of α -synuclein and Tau: A

- molecular conspiracy in neurodegeneration? // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2020. Vol. 99. P. 55–64.
20. Tiwari A.K., Zai C.C., Müller D.J., Kennedy J.L. Genetics in schizophrenia: where are we and what next? // *Dialogues Clin. Neurosci.* 2010. Vol. 12, № 3. P. 289–303.
 21. Farrell M.S., Werge T., Sklar P., Owen M.J., Ophoff R.A., O'Donovan M.C., et al. Evaluating historical candidate genes for schizophrenia // *Mol. Psychiatry.* 2015. Vol. 20, № 5. P. 555–562.
 22. Xu B., Wratten N., Charych E.I., Buyske S., Firestein B.L., Brzustowicz L.M. Increased expression in dorsolateral prefrontal cortex of CAPON in schizophrenia and bipolar disorder // *PLoS Med.* 2005. Vol. 2, № 10. P. e263.
 23. Brzustowicz L.M. *NOS1AP* in schizophrenia // *Curr. Psychiatry Rep.* 2008. Vol. 10, № 2. P. 158–163.
 24. Saygılı A., Erbaş O. Association of *NOS1AP* variants in schizophrenia // *J. Exp. Basic Med. Sci.* 2022. Vol. 3, № 1. P. 84–89.
 25. Hashimoto S., Matsuba Y., Kamano N., Mihira N., Sahara N., Takano J., et al. Tau binding protein CAPON induces tau aggregation and neurodegeneration. // *Nat. Commun.* 2019. Vol. 10, № 1. P. 2394.
 26. Hein M.Y., Hubner N.C., Poser I., Cox J., Nagaraj N., Toyoda Y., et al. A human interactome in three quantitative dimensions organized by stoichiometries and abundances // *Cell.* 2015. Vol. 163, № 3. P. 712–723.
 27. Kyle R.A. Amyloidosis: A convoluted story // *Br. J. Haematol.* 2001. Vol. 114, № 3. P. 529–538.
 28. Tanskanen M. “Amyloid” — Historical Aspects // *Amyloidosis. InTech*, 2013. Vol. 1838. P. 3–24.
 29. Yakupova E.I., Bobyleva L.G., Vikhlyantsev I.M., Bobylev A.G. Congo Red and amyloids: history and relationship // *Biosci. Rep.* 2019. Vol. 39, № 1. P. BSR20181415.
 30. Матиив А.Б., Трубицина Н.П., Матвеевко А.Г., Барбитов Ю.А., Журавлева Г.А., Бондарев С.А. Структура и полиморфизм амилоидных и

- амилоидоподобных агрегатов // Биохимия. 2022. Vol. 87, № 5. P. 587–602.
31. Iadanza M.G., Jackson M.P., Hewitt E.W., Ranson N.A., Radford S.E. A new era for understanding amyloid structures and disease // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018. Vol. 19, № 12. P. 755–773.
 32. Kushnirov V. V, Dergalev A.A., Alexandrov A.I. Proteinase K resistant cores of prions and amyloids. // *Prion.* 2020. Vol. 14, № 1. P. 11–19.
 33. Kushnirov V. V., Alexandrov I.M., Mitkevich O. V., Shkundina I.S., Ter-Avanesyan M.D. Purification and analysis of prion and amyloid aggregates // *Methods.* 2006. Vol. 39, № 1. P. 50–55.
 34. Dear A.J., Michaels T.C.T., Meisl G., Klenerman D., Wu S., Perrett S., et al. Kinetic diversity of amyloid oligomers // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2020. Vol. 117, № 22. P. 12087–12094.
 35. Prusiner S.B. Prions and neurodegenerative diseases. // *N. Engl. J. Med.* 1987. Vol. 317, № 25. P. 1571–1581.
 36. Sivanathan V., Hochschild A. A bacterial export system for generating extracellular amyloid aggregates. // *Nat. Protoc.* 2013. Vol. 8, № 7. P. 1381–1390.
 37. Benson M.D., Buxbaum J.N., Eisenberg D.S., Merlini G., Saraiva M.J.M., Sekijima Y., et al. Amyloid nomenclature 2018: recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee // *Amyloid.* 2018. Vol. 25, № 4. P. 215–219.
 38. Brundin P., Melki R., Kopito R. Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010. Vol. 11, № 4. P. 301–307.
 39. Chiti F., Dobson C.M. Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: a summary of progress over the last decade // *Annu. Rev. Biochem.* 2017. Vol. 86, № 1. P. 27–68.
 40. Knowles T.P.J., Vendruscolo M., Dobson C.M. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014. Vol. 15, № 6. P. 384–396.
 41. Pepys M.B. Amyloidosis // *Annu. Rev. Med.* 2006. Vol. 57, № 1. P. 223–241.

42. Chiti F., Dobson C.M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. // *Annu. Rev. Biochem.* 2006. Vol. 75. P. 333–366.
43. Sugi M.D., Kawashima A., Salomao M.A., Bhalla S., Venkatesh S.K., Pickhardt P.J. Amyloidosis: multisystem spectrum of disease with pathologic correlation // *Radiographics.* 2021. Vol. 41, № 5. P. 1454–1474.
44. Milani P., Merlini G., Palladini G. Light chain amyloidosis // *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 2018. Vol. 10, № 1. P. e2018022.
45. Merlini G., Dispenzieri A., Santhorawala V., Schönland S.O., Palladini G., Hawkins P.N., et al. Systemic immunoglobulin light chain amyloidosis // *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2018. Vol. 4, № 1. P. 38.
46. Nasr S.H., Said S.M., Valeri A.M., Sethi S., Fidler M.E., Cornell L.D., et al. The diagnosis and characteristics of renal heavy-chain and heavy/light-chain amyloidosis and their comparison with renal light-chain amyloidosis // *Kidney Int.* 2013. Vol. 83, № 3. P. 463–470.
47. Ando Y., Coelho T., Berk J.L., Cruz M.W., Ericzon B.-G., Ikeda S., et al. Guideline of transthyretin-related hereditary amyloidosis for clinicians // *Orphanet J. Rare Dis.* 2013. Vol. 8, № 1. P. 31.
48. Lu J., Yu Y., Zhu I., Cheng Y., Sun P.D. Structural mechanism of serum amyloid A-mediated inflammatory amyloidosis // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2014. Vol. 111, № 14. P. 5189–5194.
49. Morris A.D., Smith R.N., Stone J.R. The pathology and changing epidemiology of dialysis-related cardiac beta-2 microglobulin amyloidosis // *Cardiovasc. Pathol.* 2019. Vol. 42. P. 30–35.
50. Eriksson M., Schönland S., Yumlu S., Hegenbart U., von Hutten H., Gioeva Z., et al. Hereditary apolipoprotein AI-associated amyloidosis in surgical pathology specimens // *J. Mol. Diagnostics.* 2009. Vol. 11, № 3. P. 257–262.
51. Swidan K.H., Sweed M.S., Abbas A.M., Jewi M.K. Serum amyloid A in preeclampsia // *QJM An Int. J. Med.* 2020. Vol. 113, № Supplement_1.
52. Gerasimova E.M., Fedotov S.A., Kachkin D. V., Vashukova E.S., Glotov A.S., Chernoff Y.O., et al. Protein misfolding during pregnancy: new approaches to

- preeclampsia diagnostics // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, № 24. P. 6183.
53. Srinivasan R., Jones E.M., Liu K., Ghiso J., Marchant R.E., Zagorski M.G. pH-dependent amyloid and protofibril formation by the ABri peptide of familial British dementia // *J. Mol. Biol.* 2003. Vol. 333, № 5. P. 1003–1023.
 54. Ghiso J.A., Holton J., Miravalle L., Calero M., Lashley T., Vidal R., et al. Systemic amyloid deposits in familial British dementia // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 47. P. 43909–43914.
 55. Coomaraswamy J., Kilger E., Wölfing H., Schäfer C., Kaeser S.A., Wegenast-Braun B.M., et al. Modeling familial Danish dementia in mice supports the concept of the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010. Vol. 107, № 17. P. 7969–7974.
 56. Vidal R., Revesz T., Rostagno A., Kim E., Holton J.L., Bek T., et al. A decamer duplication in the 3' region of the *BRI* gene originates an amyloid peptide that is associated with dementia in a Danish kindred // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000. Vol. 97, № 9. P. 4920–4925.
 57. Davies H.A., Wilkinson M.C., Gibson R.P., Middleton D.A. Expression and purification of the aortic amyloid polypeptide medin // *Protein Expr. Purif.* 2014. Vol. 98. P. 32–37.
 58. Khurana R., Agarwal A., Bajpai V.K., Verma N., Sharma A.K., Gupta R.P., et al. Unraveling the amyloid associated with human medullary thyroid carcinoma // *Endocrinology.* 2004. Vol. 145, № 12. P. 5465–5470.
 59. Pedrote M.M., Motta M.F., Ferretti G.D.S., Norberto D.R., Spohr T.C.L.S., Lima F.R.S., et al. Oncogenic gain of function in glioblastoma is linked to mutant p53 amyloid oligomers // *iScience.* 2020. Vol. 23, № 2. P. 100820.
 60. Levine S.N., Ishaq S., Nanda A., Wilson J.D., Gonzalez-Toledo E. Occurrence of extensive spherical amyloid deposits in a prolactin-secreting pituitary macroadenoma: a radiologic-pathologic correlation // *Ann. Diagn. Pathol.* 2013. Vol. 17, № 4. P. 361–366.
 61. Chuang E., Hori A.M., Hesketh C.D., Shorter J. Amyloid assembly and disassembly // *J. Cell Sci.* 2018. Vol. 131, № 8. P. jcs189928.

62. Millucci L., Ghezzi L., Bernardini G., Braconi D., Tanganelli P., Santucci A. Prevalence of isolated atrial amyloidosis in young patients affected by congestive heart failure // *Sci. World J.* 2012. Vol. 2012. P. 1–8.
63. Linke R.P., Joswig R., Murphy C.L., Wang S., Zhou H., Gross U., et al. Senile seminal vesicle amyloid is derived from semenogelin I // *J. Lab. Clin. Med.* 2005. Vol. 145, № 4. P. 187–193.
64. Yanamandra K., Alexeyev O., Zamotin V., Srivastava V., Shchukarev A., Brorsson A.-C., et al. Amyloid formation by the pro-inflammatory S100A8/A9 proteins in the ageing prostate // *PLoS One* / ed. Gazit E. 2009. Vol. 4, № 5. P. e5562.
65. Caubet C., Bousset L., Clemmensen O., Sourigues Y., Bygum A., Chavanas S., et al. A new amyloidosis caused by fibrillar aggregates of mutated corneodesmosin // *FASEB J.* 2010. Vol. 24, № 9. P. 3416–3426.
66. Miura Y., Harumiya S., Ono K., Fujimoto E., Akiyama M., Fujii N., et al. Galectin-7 and actin are components of amyloid deposit of localized cutaneous amyloidosis // *Exp. Dermatol.* 2013. Vol. 22, № 1. P. 36–40.
67. Inoue K., Takahashf M., Hamamoto Y., Muto M., Ishihara T. An immunohistochemical study of cytokeratins in skin-limited amyloidosis // *Amyloid.* 2000. Vol. 7, № 4. P. 259–265.
68. Ozawa D., Kaji Y., Yagi H., Sakurai K., Kawakami T., Naiki H., et al. Destruction of amyloid fibrils of keratoepithelin peptides by laser irradiation coupled with amyloid-specific thioflavin T // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286, № 12. P. 10856–10863.
69. Ando Y., Nakamura M., Kai H., Katsuragi S., Terazaki H., Nozawa T., et al. A novel localized amyloidosis associated with lactoferrin in the cornea // *Lab. Investig.* 2002. Vol. 82, № 6. P. 757–766.
70. Gupta Y., Singla G., Singla R. Insulin-derived amyloidosis // *Indian J. Endocrinol. Metab.* 2015. Vol. 19, № 1. P. 174.
71. D'Souza A., Theis J.D., Vrana J.A., Dogan A. Pharmaceutical amyloidosis associated with subcutaneous insulin and enfuvirtide administration // *Amyloid.*

2014. Vol. 21, № 2. P. 71–75.
72. Chen G., Xu T., Yan Y., Zhou Y., Jiang Y., Melcher K., et al. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development // *Acta Pharmacol. Sin.* 2017. Vol. 38, № 9. P. 1205–1235.
73. Murphy M.P., LeVine H. Alzheimer's disease and the amyloid- β peptide // *J. Alzheimer's Dis.* / ed. Lovell M.A. 2010. Vol. 19, № 1. P. 311–323.
74. Qiang W., Yau W.-M., Lu J.-X., Collinge J., Tycko R. Structural variation in amyloid- β fibrils from Alzheimer's disease clinical subtypes // *Nature*. 2017. Vol. 541, № 7636. P. 217–221.
75. Giasson B.I., Lee V.M.-Y., Trojanowski J.Q. Interactions of Amyloidogenic Proteins // *NeuroMolecular Med.* 2003. Vol. 4, № 1–2. P. 49–58.
76. Lim S., Haque M.M., Kim D., Kim D.J., Kim Y.K. Cell-based models to investigate tau aggregation // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2014. Vol. 12, № 20–21. P. 7–13.
77. Kim W.S., Kågedal K., Halliday G.M. Alpha-synuclein biology in Lewy body diseases. // *Alzheimers. Res. Ther.* 2014. Vol. 6, № 5. P. 73.
78. Goedert M., Jakes R., Spillantini M.G. The Synucleinopathies: Twenty Years On. // *J. Parkinsons. Dis.* 2017. Vol. 7, № s1. P. S51–S69.
79. La Spada A.R., Weydt P., Pineda V. V. Huntington's disease pathogenesis: mechanisms and pathways // *Neurobiology of Huntington's Disease: Applications to Drug Discovery*. CRC Press/Taylor & Francis, 2011.
80. Wetzel R. Exploding the repeat length paradigm while exploring amyloid toxicity in Huntington's disease // *Acc. Chem. Res.* 2020. Vol. 53, № 10. P. 2347–2357.
81. van der Burg J.M.M., Björkqvist M., Brundin P. Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease // *Lancet. Neurol.* 2009. Vol. 8, № 8. P. 765–774.
82. Rubinsztein D.C., Carmichael J. Huntington's disease: molecular basis of neurodegeneration. // *Expert Rev. Mol. Med.* 2003. Vol. 5, № 20. P. 1–21.
83. DeArmond S.J., Prusiner S.B. Prion protein transgenes and the neuropathology in prion diseases // *Brain Pathol.* 1995. Vol. 5, № 1. P. 77–89.

84. Mead S., Reilly M.M. A new prion disease: relationship with central and peripheral amyloidoses // *Nat. Rev. Neurol.* 2015. Vol. 11, № 2. P. 90–97.
85. Pansarasa O., Bordoni M., Diamanti L., Sproviero D., Gagliardi S., Cereda C. SOD1 in amyotrophic lateral sclerosis: “ambivalent” behavior connected to the disease // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19, № 5. P. 1345.
86. Kalebina T.S., Plotnikova T.A., Gorkovskii A.A., Selyakh I.O., Galzitskaya O. V, Bezsonov E.E., et al. Amyloid-like properties of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall glucantransferase Bgl2p: prediction and experimental evidences // *Prion.* 2008. Vol. 2, № 2. P. 91–96.
87. Dragoš A., Kovács Á.T., Claessen D. The role of functional amyloids in multicellular growth and development of gram-positive bacteria. // *Biomolecules.* 2017. Vol. 7, № 3. P. 60.
88. Shewmaker F., McGlinchey R.P., Wickner R.B. Structural insights into functional and pathological amyloid // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286, № 19. P. 16533–16540.
89. Valsecchi I., Dupres V., Stephen-Victor E., Guijarro J.I., Gibbons J., Beau R., et al. Role of Hydrophobins in *Aspergillus fumigatus* // *J. fungi (Basel, Switzerland).* 2017. Vol. 4, № 1. P. 2.
90. Pham C.L.L., Rey A., Lo V., Soulès M., Ren Q., Meisl G., et al. Self-assembly of MPG1, a hydrophobin protein from the rice blast fungus that forms functional amyloid coatings, occurs by a surface-driven mechanism. // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6. P. 25288.
91. Lo V.C., Ren Q., Pham C.L.L., Morris V.K., Kwan A.H., Sunde M. Fungal hydrophobin proteins produce self-assembling protein films with diverse structure and chemical stability // *Nanomater. (Basel, Switzerland).* 2014. Vol. 4, № 3. P. 827–843.
92. Morris V.K., Ren Q., Macindoe I., Kwan A.H., Byrne N., Sunde M. Recruitment of class I hydrophobins to the air:water interface initiates a multi-step process of functional amyloid formation // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286, № 18. P. 15955–15963.

93. Rauceo J.M., Gaur N.K., Lee K.-G., Edwards J.E., Klotz S.A., Lipke P.N. Global cell surface conformational shift mediated by a *Candida albicans* adhesin // *Infect. Immun.* 2004. Vol. 72, № 9. P. 4948–4955.
94. Otoo H.N., Lee K.G., Qiu W., Lipke P.N. *Candida albicans* Als adhesins have conserved amyloid-forming sequences // *Eukaryot. Cell.* 2008. Vol. 7, № 5. P. 776–782.
95. Dueholm M.S., Albertsen M., Otzen D., Nielsen P.H. Curli functional amyloid systems are phylogenetically widespread and display large diversity in operon and protein structure // *PLoS One.* 2012. Vol. 7, № 12. P. e51274.
96. Blanco L.P., Evans M.L., Smith D.R., Badtke M.P., Chapman M.R. Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids // *Trends Microbiol.* 2012. Vol. 20, № 2. P. 66–73.
97. Taglialegna A., Navarro S., Ventura S., Garnett J.A., Matthews S., Penades J.R., et al. Staphylococcal Bap proteins build amyloid scaffold biofilm matrices in response to environmental signals // *PLoS Pathog.* 2016. Vol. 12, № 6. P. e1005711.
98. Alteri C.J., Xicohténcatl-Cortes J., Hess S., Caballero-Olín G., Girón J.A., Friedman R.L. *Mycobacterium tuberculosis* produces pili during human infection // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007. Vol. 104, № 12. P. 5145–5150.
99. Besingi R.N., Wenderska I.B., Senadheera D.B., Cvitkovitch D.G., Long J.R., Wen Z.T., et al. Functional amyloids in *Streptococcus mutans*, their use as targets of biofilm inhibition and initial characterization of SMU_63c // *Microbiology.* 2017. Vol. 163, № 4. P. 488–501.
100. Collinson S.K., Emödy L., Müller K.H., Trust T.J., Kay W.W. Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella enteritidis* // *J. Bacteriol.* 1991. Vol. 173, № 15. P. 4773–4781.
101. Doran J.L., Collinson S.K., Burian J., Sarlós G., Todd E.C., Munro C.K., et al. DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* species targeting *agfA*, the structural gene for thin, aggregative fimbriae // *J. Clin. Microbiol.* 1993. Vol. 31, № 9. P. 2263–2273.

102. Wang Y., Jiang J., Gao Y., Sun Y., Dai J., Wu Y., et al. *Staphylococcus epidermidis* small basic protein (Sbp) forms amyloid fibrils, consistent with its function as a scaffolding protein in biofilms // *J. Biol. Chem.* 2018. Vol. 293, № 37. P. 14296–14311.
103. Ling S., Li C., Adamcik J., Shao Z., Chen X., Mezzenga R. Modulating materials by orthogonally oriented β -strands: composites of amyloid and silk fibroin fibrils // *Adv. Mater.* 2014. Vol. 26, № 26. P. 4569–4574.
104. Humenik M., Smith A.M., Arndt S., Scheibel T. Ion and seed dependent fibril assembly of a spidroin core domain // *J. Struct. Biol.* 2015. Vol. 191, № 2. P. 130–138.
105. Berthelot K., Lecomte S., Estevez Y., Couлары-Salin B., Peruch F. Homologous *Hevea brasiliensis* REF (Hevb1) and SRPP (Hevb3) present different auto-assembling // *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 2014. Vol. 1844, № 2. P. 473–485.
106. Berthelot K., Lecomte S., Estevez Y., Couлары-Salin B., Bentaleb A., Cullin C., et al. Rubber elongation factor (REF), a major allergen component in *Hevea brasiliensis* latex has amyloid properties // *PLoS One.* 2012. Vol. 7, № 10. P. e48065.
107. Li J., McQuade T., Siemer A.B., Napetschnig J., Moriwaki K., Hsiao Y.-S., et al. The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis // *Cell.* 2012. Vol. 150, № 2. P. 339–350.
108. Wu X.-N., Yang Z.-H., Wang X.-K., Zhang Y., Wan H., Song Y., et al. Distinct roles of RIP1-RIP3 hetero- and RIP3-RIP3 homo-interaction in mediating necroptosis // *Cell Death Differ.* 2014. Vol. 21, № 11. P. 1709–1720.
109. Kajava A. V, Klopffleisch K., Chen S., Hofmann K. Evolutionary link between metazoan RHIM motif and prion-forming domain of fungal heterokaryon incompatibility factor HET-s/HET-s // *Sci. Rep.* 2014. Vol. 4. P. 7436.
110. Saupe S.J. Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous ascomycetes. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000. Vol. 64, № 3. P. 489–502.
111. Seuring C., Greenwald J., Wasmer C., Wepf R., Saupe S.J., Meier B.H., et al. The

- mechanism of toxicity in HET-S/HET-s prion incompatibility. // PLoS Biol. 2012. Vol. 10, № 12. P. e1001451.
112. Loquet A., Saupe S.J. Diversity of amyloid motifs in NLR signaling in fungi // Biomolecules. 2017. Vol. 7, № 2. P. 38.
113. Daskalov A., Habenstein B., Sabaté R., Berbon M., Martinez D., Chaignepain S., et al. Identification of a novel cell death-inducing domain reveals that fungal amyloid-controlled programmed cell death is related to necroptosis // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2016. Vol. 113, № 10. P. 2720–2725.
114. Kleino A., Ramia N.F., Bozkurt G., Shen Y., Nailwal H., Huang J., et al. Peptidoglycan-sensing receptors trigger the formation of functional amyloids of the adaptor protein Imd to initiate *Drosophila* NF- κ B signaling // Immunity. 2017. Vol. 47, № 4. P. 635-647.e6.
115. Gonçalves A.P., Heller J., Daskalov A., Videira A., Glass N.L. Regulated forms of cell death in fungi // Front. Microbiol. 2017. Vol. 8. P. 1837.
116. Hafner-Bratkovič I. Prions, prionoid complexes and amyloids: the bad, the good and something in between. // Swiss Med. Wkly. 2017. Vol. 147, № 1516. P. w14424.
117. Mojsoska B., Jenssen H. Peptides and peptidomimetics for antimicrobial drug design // Pharmaceuticals (Basel). 2015. Vol. 8, № 3. P. 366–415.
118. Sood R., Domanov Y., Pietiäinen M., Kontinen V.P., Kinnunen P.K.J. Binding of LL-37 to model biomembranes: insight into target vs host cell recognition // Biochim. Biophys. Acta. 2008. Vol. 1778, № 4. P. 983–996.
119. Engelberg Y., Landau M. The Human LL-37(17-29) antimicrobial peptide reveals a functional supramolecular structure // Nat. Commun. 2020. Vol. 11, № 1. P. 3894.
120. Auvynet C., El Amri C., Lacombe C., Bruston F., Bourdais J., Nicolas P., et al. Structural requirements for antimicrobial versus chemoattractant activities for dermaseptin S9 // FEBS J. 2008. Vol. 275, № 16. P. 4134–4151.
121. Caillon L., Killian J.A., Lequin O., Khemtémourian L. Biophysical investigation of the membrane-disrupting mechanism of the antimicrobial and amyloid-like

- peptide dermaseptin S9 // PLoS One. 2013. Vol. 8, № 10. P. e75528.
122. Gössler-Schöfberger R., Hesser G., Muik M., Wechselberger C., Jilek A. An orphan dermaseptin from frog skin reversibly assembles to amyloid-like aggregates in a pH-dependent fashion // FEBS J. 2009. Vol. 276, № 20. P. 5849–5859.
 123. Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1987. Vol. 84, № 15. P. 5449–5453.
 124. Zasloff M., Martin B., Chen H.C. Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1988. Vol. 85, № 3. P. 910–913.
 125. Cruciani R.A., Barker J.L., Zasloff M., Chen H.C., Colamonici O. Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1991. Vol. 88, № 9. P. 3792–3796.
 126. Baker M.A., Maloy W.L., Zasloff M., Jacob L.S. Anticancer efficacy of Magainin2 and analogue peptides // Cancer Res. 1993. Vol. 53, № 13. P. 3052–3057.
 127. Ludtke S., He K., Huang H. Membrane thinning caused by magainin 2 // Biochemistry. 1995. Vol. 34, № 51. P. 16764–16769.
 128. Jang H., Arce F.T., Mustata M., Ramachandran S., Capone R., Nussinov R., et al. Antimicrobial protegrin-1 forms amyloid-like fibrils with rapid kinetics suggesting a functional link // Biophys. J. 2011. Vol. 100, № 7. P. 1775–1783.
 129. Gour S., Kumar V., Singh A., Gadhawe K., Goyal P., Pandey J., et al. Mammalian antimicrobial peptide protegrin-4 self assembles and forms amyloid-like aggregates: Assessment of its functional relevance. // J. Pept. Sci. 2019. Vol. 25, № 3. P. e3151.
 130. Bieler S., Estrada L., Lagos R., Baeza M., Castilla J., Soto C. Amyloid formation modulates the biological activity of a bacterial protein // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280, № 29. P. 26880–26885.
 131. Tayeb-Fligelman E., Tabachnikov O., Moshe A., Goldshmidt-Tran O., Sawaya

- M.R., Coquelle N., et al. The cytotoxic *Staphylococcus aureus* PSM α 3 reveals a cross- α amyloid-like fibril // *Science*. 2017. Vol. 355, № 6327. P. 831–833.
132. Chu H., Pazgier M., Jung G., Nuccio S.-P., Castillo P.A., de Jong M.F., et al. Human α -defensin 6 promotes mucosal innate immunity through self-assembled peptide nanonets // *Science*. 2012. Vol. 337, № 6093. P. 477–481.
133. Gour S., Kaushik V., Kumar V., Bhat P., Yadav S.C., Yadav J.K. Antimicrobial peptide (Cn-AMP2) from liquid endosperm of *Cocos nucifera* forms amyloid-like fibrillar structure // *J. Pept. Sci.* 2016. Vol. 22, № 4. P. 201–207.
134. Wang G. Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283, № 47. P. 32637–32643.
135. Fahrner R.L., Dieckmann T., Harwig S.S., Lehrer R.I., Eisenberg D., Feigon J. Solution structure of protegrin-1, a broad-spectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes // *Chem. Biol.* 1996. Vol. 3, № 7. P. 543–550.
136. De Felice F.G., Vieira M.N.N., Meirelles M.N.L., Morozova-Roche L.A., Dobson C.M., Ferreira S.T. Formation of amyloid aggregates from human lysozyme and its disease-associated variants using hydrostatic pressure // *FASEB J.* 2004. Vol. 18, № 10. P. 1099–1101.
137. Majumdar A., Cesario W.C., White-Grindley E., Jiang H., Ren F., Khan M.R., et al. Critical role of amyloid-like oligomers of *Drosophila* Orb2 in the persistence of memory // *Cell*. 2012. Vol. 148, № 3. P. 515–529.
138. Si K., Choi Y.-B., White-Grindley E., Majumdar A., Kandel E.R. *Aplysia* CPEB can form prion-like multimers in sensory neurons that contribute to long-term facilitation // *Cell*. 2010. Vol. 140, № 3. P. 421–435.
139. Stephan J.S., Fioriti L., Lamba N., Colnaghi L., Karl K., Derkatch I.L., et al. The CPEB3 protein is a functional prion that interacts with the actin cytoskeleton // *Cell Rep.* 2015. Vol. 11, № 11. P. 1772–1785.
140. Heinrich S.U., Lindquist S. Protein-only mechanism induces self-perpetuating changes in the activity of neuronal *Aplysia* cytoplasmic polyadenylation element binding protein (CPEB). // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011. Vol. 108, № 7. P.

- 2999–3004.
141. Hervas R., Rau M.J., Park Y., Zhang W., Murzin A.G., Fitzpatrick J.A.J., et al. Cryo-EM structure of a neuronal functional amyloid implicated in memory persistence in *Drosophila* // *Science* (80-.). 2020. Vol. 367, № 6483. P. 1230–1234.
 142. Sopova J. V, Koshel E.I., Belashova T.A., Zadorsky S.P., Sergeeva A. V, Siniukova V.A., et al. RNA-binding protein FXR1 is presented in rat brain in amyloid form // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9, № 1. P. 18983.
 143. Caudron F., Barral Y. A super-assembly of Whi3 encodes memory of deceptive encounters by single cells during yeast courtship // *Cell.* 2013. Vol. 155, № 6. P. 1244–1257.
 144. Whelley S., Johnson S., Powell J., Borchardt C., Hastert M.C., Cornwall G.A. Nonpathological extracellular amyloid is present during normal epididymal sperm maturation. // *PLoS One.* 2012. Vol. 7, № 5. P. e36394.
 145. Do H.Q., Hewetson A., Myers C., Khan N.H., Hastert M.C., M Harsini F., et al. The functional mammalian CRES (Cystatin-Related Epididymal Spermatogenic) amyloid is antiparallel β -sheet rich and forms a metastable oligomer during assembly // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9, № 1. P. 9210.
 146. Whelley S., Muthusubramanian A., Powell J., Johnson S., Hastert M.C., Cornwall G.A. Cystatin-related epididymal spermatogenic subgroup members are part of an amyloid matrix and associated with extracellular vesicles in the mouse epididymal lumen. // *Mol. Hum. Reprod.* 2016. Vol. 22, № 11. P. 729–744.
 147. Wahlbom M., Wang X., Lindström V., Carlemalm E., Jaskolski M., Grubb A. Fibrillogenic oligomers of human cystatin C are formed by propagated domain swapping // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282, № 25. P. 18318–18326.
 148. Münch J., Rücker E., Ständker L., Adermann K., Goffinet C., Schindler M., et al. Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection // *Cell.* 2007. Vol. 131, № 6. P. 1059–1071.
 149. Roan N.R., Müller J.A., Liu H., Chu S., Arnold F., Stürzel C.M., et al. Peptides released by physiological cleavage of semen coagulum proteins form amyloids

- that enhance HIV infection // *Cell Host Microbe*. 2011. Vol. 10, № 6. P. 541–550.
150. Sharma N., Vishwanath S., K. Patel B. Recombinant human semenogelin-1 (Sg1) and sg1 (1-159) form detergent stable amyloid like aggregates *in vitro* // *Protein Pept. Lett.* 2015. Vol. 23, № 1. P. 87–96.
151. Boke E., Ruer M., Wühr M., Coughlin M., Lemaitre R., Gygi S.P., et al. Amyloid-like self-assembly of a cellular compartment // *Cell*. 2016. Vol. 166, № 3. P. 637–650.
152. Iconomidou V.A., Vriend G., Hamodrakas S.J. Amyloids protect the silkworm oocyte and embryo // *FEBS Lett.* 2000. Vol. 479, № 3. P. 141–145.
153. Iconomidou V.A., Chryssikos G.D., Gionis V., Vriend G., Hoenger A., Hamodrakas S.J. Amyloid-like fibrils from an 18-residue peptide analogue of a part of the central domain of the B-family of silkworm chorion proteins // *FEBS Lett.* 2001. Vol. 499, № 3. P. 268–273.
154. Iconomidou V.A., Chryssikos G.D., Gionis V., Galanis A.S., Cordopatis P., Hoenger A., et al. Amyloid fibril formation propensity is inherent into the hexapeptide tandemly repeating sequence of the central domain of silkworm chorion proteins of the A-family // *J. Struct. Biol.* 2006. Vol. 156, № 3. P. 480–488.
155. Louros N.N., Petronikolou N., Karamanos T., Cordopatis P., Iconomidou V.A., Hamodrakas S.J. Structural studies of “aggregation-prone” peptide-analogues of teleostean egg chorion ZPB proteins. // *Biopolymers*. 2014. Vol. 102, № 6. P. 427–436.
156. Egge N., Muthusubramanian A., Cornwall G.A. Amyloid properties of the mouse egg zona pellucida // *PLoS One*. 2015. Vol. 10, № 6. P. e0129907.
157. Louros N.N., Chrysina E.D., Baltatzis G.E., Patsouris E.S., Hamodrakas S.J., Iconomidou V.A. A common “aggregation-prone” interface possibly participates in the self-assembly of human zona pellucida proteins // *FEBS Lett.* 2016. Vol. 590, № 5. P. 619–630.
158. Siniukova V.A., Sopova J. V, Galkina S.A., Galkin A.P. Search for functional amyloid structures in chicken and fruit fly female reproductive cells. // *Prion*.

2020. Vol. 14, № 1. P. 278–282.
159. Carpenter K., Bell R.B., Yunus J., Amon A., Berchowitz L.E. Phosphorylation-mediated clearance of amyloid-like assemblies in meiosis. // *Dev. Cell*. 2018. Vol. 45, № 3. P. 392-405.e6.
 160. Fowler D.M., Koulov A. V, Alory-Jost C., Marks M.S., Balch W.E., Kelly J.W. Functional amyloid aormation within mammalian tissue // *PLoS Biol.* / ed. Weissman J. 2006. Vol. 4, № 1. P. e6.
 161. Hoashi T., Muller J., Vieira W.D., Rouzaud F., Kikuchi K., Tamaki K., et al. The repeat domain of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 is required for the formation of organellar fibers // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, № 30. P. 21198–21208.
 162. Watt B., van Niel G., Fowler D.M., Hurbain I., Luk K.C., Stayrook S.E., et al. N-terminal domains elicit formation of functional Pmel17 amyloid fibrils // *J. Biol. Chem.* 2009. Vol. 284, № 51. P. 35543–35555.
 163. McGlinchey R.P., Shewmaker F., McPhie P., Monterroso B., Thurber K., Wickner R.B. The repeat domain of the melanosome fibril protein Pmel17 forms the amyloid core promoting melanin synthesis // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009. Vol. 106, № 33. P. 13731–13736.
 164. Leonhardt R.M., Vigneron N., Hee J.S., Graham M., Cresswell P. Critical residues in the PMEL/Pmel17 N-terminus direct the hierarchical assembly of melanosomal fibrils // *Mol. Biol. Cell* / ed. Chernoff J. 2013. Vol. 24, № 7. P. 964–981.
 165. Maji S.K., Perrin M.H., Sawaya M.R., Jessberger S., Vadodaria K., Rissman R.A., et al. Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules // *Science*. 2009. Vol. 325, № 5938. P. 328–332.
 166. Onoue S., Ohshima K., Debari K., Koh K., Shioda S., Iwasa S., et al. Mishandling of the therapeutic peptide glucagon generates cytotoxic amyloidogenic fibrils // *Pharm. Res.* 2004. Vol. 21, № 7. P. 1274–1283.
 167. Gul S., Bahadir B., Dusak A., Kalayci M., Edebalı N., Acikgoz B. Spherical amyloid deposition in a prolactin-producing pituitary adenoma // *Neuropathology*. 2009. Vol. 29, № 1. P. 81–84.

168. Wickner R.B., Edskes H.K., Kryndushkin D., McGlinchey R., Bateman D., Kelly A. Prion diseases of yeast: amyloid structure and biology // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2011. Vol. 22, № 5. P. 469–475.
169. Newby G.A., Lindquist S. Blessings in disguise: biological benefits of prion-like mechanisms // *Trends Cell Biol.* 2013. Vol. 23, № 6. P. 251–259.
170. Gomes E., Shorter J. The molecular language of membraneless organelles. // *J. Biol. Chem.* 2019. Vol. 294, № 18. P. 7115–7127.
171. Mitrea D.M., Kriwacki R.W. Phase separation in biology; functional organization of a higher order. // *Cell Commun. Signal.* 2016. Vol. 14. P. 1.
172. Audas T.E., Audas D.E., Jacob M.D., Ho J.J.D., Khacho M., Wang M., et al. Adaptation to stressors by systemic protein amyloidogenesis // *Dev. Cell.* 2016. Vol. 39, № 2. P. 155–168.
173. Uversky V.N., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Zaslavsky B. Intrinsically disordered proteins as crucial constituents of cellular aqueous two phase systems and coacervates. // *FEBS Lett.* 2015. Vol. 589, № 1. P. 15–22.
174. Uversky V.N. Protein intrinsic disorder-based liquid-liquid phase transitions in biological systems: Complex coacervates and membrane-less organelles. // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2017. Vol. 239. P. 97–114.
175. Uversky V.N. Supramolecular fuzziness of intracellular liquid droplets: liquid-liquid phase transitions, membrane-less organelles, and intrinsic disorder // *Molecules.* 2019. Vol. 24, № 18. P. 3265.
176. Turoverov K.K., Kuznetsova I.M., Fonin A. V, Darling A.L., Zaslavsky B.Y., Uversky V.N. Stochasticity of biological soft matter: emerging concepts in intrinsically disordered proteins and biological phase separation // *Trends Biochem. Sci.* 2019. Vol. 44, № 8. P. 716–728.
177. Darling A.L., Liu Y., Oldfield C.J., Uversky V.N. Intrinsically disordered proteome of human membrane-less organelles // *Proteomics.* 2018. Vol. 18, № 5–6. P. e1700193.
178. Uversky V.N. Intrinsically disordered proteins in overcrowded milieu: Membrane-less organelles, phase separation, and intrinsic disorder. // *Curr. Opin. Struct. Biol.*

2017. Vol. 44. P. 18–30.
179. Babinchak W.M., Surewicz W.K. Liquid-liquid phase separation and its mechanistic role in pathological protein aggregation // *J. Mol. Biol.* 2020. Vol. 432, № 7. P. 1910–1925.
 180. Darling A.L., Zaslavsky B.Y., Uversky V.N. Intrinsic disorder-based emergence in cellular biology: physiological and pathological liquid-liquid phase transitions in cells // *Polymers (Basel)*. 2019. Vol. 11, № 6. P. 990.
 181. de Oliveira G.A.P., Cordeiro Y., Silva J.L., Vieira T.C.R.G. Liquid-liquid phase transitions and amyloid aggregation in proteins related to cancer and neurodegenerative diseases // *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 2019. Vol. 118. P. 289–331.
 182. Kato M., Han T.W., Xie S., Shi K., Du X., Wu L.C., et al. Cell-free formation of RNA granules: low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels // *Cell*. 2012. Vol. 149, № 4. P. 753–767.
 183. Gui X., Luo F., Li Y., Zhou H., Qin Z., Liu Z., et al. Structural basis for reversible amyloids of hnRNPA1 elucidates their role in stress granule assembly // *Nat. Commun.* 2019. Vol. 10, № 1. P. 2006.
 184. Chen C., Ding X., Akram N., Xue S., Luo S.-Z. Fused in sarcoma: properties, self-assembly and correlation with neurodegenerative diseases // *Molecules*. 2019. Vol. 24, № 8.
 185. Murray D.T., Kato M., Lin Y., Thurber K.R., Hung I., McKnight S.L., et al. Structure of FUS protein fibrils and its relevance to self-assembly and phase separation of low-complexity domains // *Cell*. 2017. Vol. 171, № 3. P. 615–627.e16.
 186. Luo F., Gui X., Zhou H., Gu J., Li Y., Liu X., et al. Atomic structures of FUS LC domain segments reveal bases for reversible amyloid fibril formation // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2018. Vol. 25, № 4. P. 341–346.
 187. Chaudhury A., Chander P., Howe P.H. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: Focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles // *RNA*. 2010. Vol. 16, № 8. P. 1449–1462.

188. Kim H.J., Kim N.C., Wang Y.-D., Scarborough E.A., Moore J., Diaz Z., et al. Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS // *Nature*. 2013. Vol. 495, № 7442. P. 467–473.
189. Prasad A., Bharathi V., Sivalingam V., Girdhar A., Patel B.K. Molecular mechanisms of TDP-43 misfolding and pathology in amyotrophic lateral sclerosis // *Front. Mol. Neurosci.* 2019. Vol. 12. P. 25.
190. Kosolapova A.O., Belousov M. V, Sulatskaya A.I., Belousova M.E., Sulatsky M.I., Antonets K.S., et al. Two novel amyloid proteins, RopA and RopB, from the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* // *Biomolecules*. 2019. Vol. 9, № 11. P. 694.
191. Danoff E.J., Fleming K.G. Aqueous, unfolded OmpA forms amyloid-like fibrils upon self-association. // *PLoS One*. 2015. Vol. 10, № 7. P. e0132301.
192. Sahaya Rajan J.J., Chinnappan Santiago T., Singaravel R., Ignacimuthu S. Outer membrane protein C (OmpC) of *Escherichia coli* induces neurodegeneration in mice by acting as an amyloid // *Biotechnol. Lett.* 2016. Vol. 38, № 4. P. 689–700.
193. Антонец К.С., Волков К.В., Мальцева А.Л., Аршакян Л.М., Галкин А.П., Нижников А.А. Протеомный анализ белковых фракций бактерии *Escherichia coli*, устойчивых к солюбилизации ионными детергентами // *Биохимия*. 2016. Vol. 81, № 1. P. 92–105.
194. Villain E., Nikekhin A.A., Kajava A. V. Porins and amyloids are coded by similar sequence motifs // *Proteomics*. 2019. Vol. 19, № 6. P. e1800075.
195. Belousov M. V, Bondarev S.A., Kosolapova A.O., Antonets K.S., Sulatskaya A.I., Sulatsky M.I., et al. M60-like metalloprotease domain of the *Escherichia coli* YghJ protein forms amyloid fibrils // *PLoS One*. 2018. Vol. 13, № 1. P. e0191317.
196. Villar-Piqué A., Sabaté R., Lopera O., Gibert J., Torne J.M., Santos M., et al. Amyloid-like protein inclusions in tobacco transgenic plants. // *PLoS One*. 2010. Vol. 5, № 10. P. e13625.
197. Kaur G., Kaundal S., Kapoor S., Grimes J.M., Huiskonen J.T., Thakur K.G. *Mycobacterium tuberculosis* CarD, an essential global transcriptional regulator

- forms amyloid-like fibrils // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8, № 1. P. 10124.
198. Higurashi T., Yagi H., Mizobata T., Kawata Y. Amyloid-like fibril formation of co-chaperonin GroES: nucleation and extension prefer different degrees of molecular compactness // *J. Mol. Biol.* 2005. Vol. 351, № 5. P. 1057–1069.
199. Giraldo R. Defined DNA sequences promote the assembly of a bacterial protein into distinct amyloid nanostructures // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007. Vol. 104, № 44. P. 17388–17393.
200. Gasset-Rosa F., Coquel A.-S., Moreno-Del Álamo M., Chen P., Song X., Serrano A.M., et al. Direct assessment in bacteria of prionoid propagation and phenotype selection by Hsp70 chaperone // *Mol. Microbiol.* 2014. Vol. 91, № 6. P. 1070–1087.
201. Fernández-Tresguerres M.E., de la Espina S.M.-D., Gasset-Rosa F., Giraldo R. A DNA-promoted amyloid proteinopathy in *Escherichia coli* // *Mol. Microbiol.* 2010. Vol. 77, № 6. P. 1456–1469.
202. Torreira E., Moreno-Del Álamo M., Fuentes-Perez M.E., Fernández C., Martín-Benito J., Moreno-Herrero F., et al. Amyloidogenesis of bacterial prionoid RepA-WH1 recapitulates dimer to monomer transitions of RepA in DNA replication initiation. // *Structure.* 2015. Vol. 23, № 1. P. 183–189.
203. George J.M. The synucleins. // *Genome Biol.* 2002. Vol. 3, № 1. P. REVIEWS3002.
204. Lavedan C. The synuclein family. // *Genome Res.* 1998. Vol. 8, № 9. P. 871–880.
205. Stefanis L. α -Synuclein in Parkinson's disease. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012. Vol. 2, № 2. P. a009399.
206. Chandra S., Chen X., Rizo J., Jahn R., Südhof T.C. A broken alpha-helix in folded alpha-synuclein // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 17. P. 15313–15318.
207. Tarutani A., Hasegawa M. Prion-like propagation of α -synuclein in neurodegenerative diseases. // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2019. Vol. 168. P. 323–348.
208. Jan A., Gonçalves N.P., Vaegter C.B., Jensen P.H., Ferreira N. The prion-like spreading of alpha-synuclein in parkinson's disease: update on models and

- hypotheses // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, № 15. P. 8338.
209. Yoshimoto M., Iwai A., Kang D., Otero D.A., Xia Y., Saitoh T. NACP, the precursor protein of the non-amyloid beta/A4 protein (A beta) component of Alzheimer disease amyloid, binds A beta and stimulates A beta aggregation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995. Vol. 92, № 20. P. 9141–9145.
210. Jin H., Kanthasamy A., Ghosh A., Yang Y., Anantharam V., Kanthasamy A.G. α -Synuclein negatively regulates protein kinase C δ expression to suppress apoptosis in dopaminergic neurons by reducing p300 histone acetyltransferase activity // *J. Neurosci.* 2011. Vol. 31, № 6. P. 2035–2051.
211. Hashimoto M., Hsu L.J., Rockenstein E., Takenouchi T., Mallory M., Masliah E. alpha-Synuclein protects against oxidative stress via inactivation of the c-Jun N-terminal kinase stress-signaling pathway in neuronal cells // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 13. P. 11465–11472.
212. Oaks A.W., Sidhu A. Parallel mechanisms for direct and indirect membrane protein trafficking by synucleins. // *Commun. Integr. Biol.* 2013. Vol. 6, № 6. P. e26794.
213. Rizo J., Südhof T.C. The membrane fusion enigma: SNAREs, Sec1/Munc18 proteins, and their accomplices--guilty as charged? // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2012. Vol. 28. P. 279–308.
214. Vargas K.J., Makani S., Davis T., Westphal C.H., Castillo P.E., Chandra S.S. Synucleins regulate the kinetics of synaptic vesicle endocytosis // *J. Neurosci.* 2014. Vol. 34, № 28. P. 9364–9376.
215. Burré J., Vivona S., Diao J., Sharma M., Brunger A.T., Südhof T.C. Properties of native brain α -synuclein // *Nature.* 2013. Vol. 498, № 7453. P. E4-6; discussion E6-7.
216. Wu K.-P., Weinstock D.S., Narayanan C., Levy R.M., Baum J. Structural reorganization of alpha-synuclein at low pH observed by NMR and REMD simulations // *J. Mol. Biol.* 2009. Vol. 391, № 4. P. 784–796.
217. Uversky V.N., Li J., Fink A.L. Evidence for a partially folded intermediate in alpha-synuclein fibril formation // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 14. P. 10737–

- 10744.
218. Shtilerman M.D., Ding T.T., Lansbury P.T. Molecular crowding accelerates fibrillization of alpha-synuclein: could an increase in the cytoplasmic protein concentration induce Parkinson's disease? // *Biochemistry*. 2002. Vol. 41, № 12. P. 3855–3860.
 219. Uversky V.N., Li J., Fink A.L. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 47. P. 44284–44296.
 220. Munishkina L.A., Phelan C., Uversky V.N., Fink A.L. Conformational behavior and aggregation of alpha-synuclein in organic solvents: modeling the effects of membranes // *Biochemistry*. 2003. Vol. 42, № 9. P. 2720–2730.
 221. Uversky V.N., Li J., Fink A.L. Pesticides directly accelerate the rate of alpha-synuclein fibril formation: a possible factor in Parkinson's disease // *FEBS Lett.* 2001. Vol. 500, № 3. P. 105–108.
 222. Engelender S., Kaminsky Z., Guo X., Sharp A.H., Amaravi R.K., Kleiderlein J.J., et al. Synphilin-1 associates with alpha-synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions // *Nat. Genet.* 1999. Vol. 22, № 1. P. 110–114.
 223. Ferreira N., Gram H., Sorrentino Z.A., Gregersen E., Schmidt S.I., Reimer L., et al. Multiple system atrophy-associated oligodendroglial protein p25 α stimulates formation of novel α -synuclein strain with enhanced neurodegenerative potential // *Acta Neuropathol.* 2021. Vol. 142, № 1. P. 87–115.
 224. Anderson J.P., Walker D.E., Goldstein J.M., de Laat R., Banducci K., Caccavello R.J., et al. Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, № 40. P. 29739–29752.
 225. Paleologou K.E., Oueslati A., Shakked G., Rospigliosi C.C., Kim H.-Y., Lamberto G.R., et al. Phosphorylation at S87 is enhanced in synucleinopathies, inhibits alpha-synuclein oligomerization, and influences synuclein-membrane interactions // *J. Neurosci.* 2010. Vol. 30, № 9. P. 3184–3198.

226. Tofaris G.K., Razaq A., Ghetti B., Lilley K.S., Spillantini M.G. Ubiquitination of alpha-synuclein in Lewy bodies is a pathological event not associated with impairment of proteasome function // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 45. P. 44405–44411.
227. Giasson B.I., Duda J.E., Murray I. V, Chen Q., Souza J.M., Hurtig H.I., et al. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions // *Science*. 2000. Vol. 290, № 5493. P. 985–989.
228. Krumova P., Meulmeester E., Garrido M., Tirard M., Hsiao H.-H., Bossis G., et al. Sumoylation inhibits alpha-synuclein aggregation and toxicity. // *J. Cell Biol.* 2011. Vol. 194, № 1. P. 49–60.
229. Choi D.-H., Kim Y.-J., Kim Y.-G., Joh T.H., Beal M.F., Kim Y.-S. Role of matrix metalloproteinase 3-mediated alpha-synuclein cleavage in dopaminergic cell death // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286, № 16. P. 14168–14177.
230. Kang L., Janowska M.K., Moriarty G.M., Baum J. Mechanistic insight into the relationship between N-terminal acetylation of α -synuclein and fibril formation rates by NMR and fluorescence. // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, № 9. P. e75018.
231. Fujiwara H., Hasegawa M., Dohmae N., Kawashima A., Masliah E., Goldberg M.S., et al. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions // *Nat. Cell Biol.* 2002. Vol. 4, № 2. P. 160–164.
232. Oueslati A. Implication of alpha-synuclein phosphorylation at S129 in synucleinopathies: what have we learned in the last decade? // *J. Parkinsons. Dis.* 2016. Vol. 6, № 1. P. 39–51.
233. Vinueza-Gavilanes R., Íñigo-Marco I., Larrea L., Lasa M., Carte B., Santamaría E., et al. N-terminal acetylation mutants affect alpha-synuclein stability, protein levels and neuronal toxicity. // *Neurobiol. Dis.* 2020. Vol. 137. P. 104781.
234. Sidhu A., Segers-Nolten I., Subramaniam V. Conformational compatibility is essential for heterologous aggregation of α -synuclein // *ACS Chem. Neurosci.* 2016. Vol. 7, № 6. P. 719–727.
235. Fan T.-S., Liu S.C.-H., Wu R.-M. Alpha-synuclein and cognitive decline in

- Parkinson disease // *Life* (Basel, Switzerland). 2021. Vol. 11, № 11. P. 1239.
236. Alam P., Bousset L., Melki R., Otzen D.E. α -synuclein oligomers and fibrils: a spectrum of species, a spectrum of toxicities // *J. Neurochem.* 2019. Vol. 150, № 5. P. 522–534.
237. Winner B., Jappelli R., Maji S.K., Desplats P.A., Boyer L., Aigner S., et al. *In vivo* demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011. Vol. 108, № 10. P. 4194–4199.
238. Mahul-Mellier A.-L., Burtscher J., Maharjan N., Weerens L., Croisier M., Kuttler F., et al. The process of Lewy body formation, rather than simply α -synuclein fibrillization, is one of the major drivers of neurodegeneration. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2020. Vol. 117, № 9. P. 4971–4982.
239. Olanow C.W., Perl D.P., DeMartino G.N., McNaught K.S.P. Lewy-body formation is an aggresome-related process: a hypothesis. // *Lancet. Neurol.* 2004. Vol. 3, № 8. P. 496–503.
240. Groveman B.R., Orrù C.D., Hughson A.G., Raymond L.D., Zanusso G., Ghetti B., et al. Rapid and ultra-sensitive quantitation of disease-associated α -synuclein seeds in brain and cerebrospinal fluid by α Syn RT-QuIC. // *Acta Neuropathol. Commun.* 2018. Vol. 6, № 1. P. 7.
241. Bose A., Beal M.F. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease // *J. Neurochem.* 2016. Vol. 139 Suppl. P. 216–231.
242. Wong Y.C., Krainc D. α -synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies. // *Nat. Med.* 2017. Vol. 23, № 2. P. 1–13.
243. Garcia-Reitböck P., Anichtchik O., Bellucci A., Iovino M., Ballini C., Fineberg E., et al. SNARE protein redistribution and synaptic failure in a transgenic mouse model of Parkinson's disease // *Brain.* 2010. Vol. 133, № Pt 7. P. 2032–2044.
244. Ghiglieri V., Calabrese V., Calabresi P. Alpha-synuclein: from early synaptic dysfunction to neurodegeneration // *Front. Neurol.* 2018. Vol. 9. P. 295.
245. Matiiv A.B., Moskalenko S.E., Sergeeva O.S., Zhouravleva G.A., Bondarev S.A. NOS1AP interacts with α -synuclein and aggregates in yeast and mammalian cells // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23, № 16. P. 9102.

246. Pan K.M., Baldwin M., Nguyen J., Gasset M., Serban A., Groth D., et al. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993. Vol. 90, № 23. P. 10962–10966.
247. Luk K.C., Kehm V., Carroll J., Zhang B., O'Brien P., Trojanowski J.Q., et al. Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice // *Science*. 2012. Vol. 338, № 6109. P. 949–953.
248. Luk K.C., Kehm V.M., Zhang B., O'Brien P., Trojanowski J.Q., Lee V.M.Y. Intracerebral inoculation of pathological α -synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative α -synucleinopathy in mice // *J. Exp. Med.* 2012. Vol. 209, № 5. P. 975–986.
249. Ruiz-Riquelme A., Lau H.H.C., Stuart E., Goczi A.N., Wang Z., Schmitt-Ulms G., et al. Prion-like propagation of β -amyloid aggregates in the absence of APP overexpression. // *Acta Neuropathol. Commun.* 2018. Vol. 6, № 1. P. 26.
250. Clavaguera F., Bolmont T., Crowther R.A., Abramowski D., Frank S., Probst A., et al. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain // *Nat. Cell Biol.* 2009. Vol. 11, № 7. P. 909–913.
251. Pearce M.M.P., Kopito R.R. Prion-like characteristics of polyglutamine-containing proteins // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2018. Vol. 8, № 2. P. a024257.
252. Braak H., Del Tredici K., Rüb U., de Vos R.A.I., Jansen Steur E.N.H., Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease // *Neurobiol. Aging*. 2003. Vol. 24, № 2. P. 197–211.
253. Kordower J.H., Chu Y., Hauser R.A., Freeman T.B., Olanow C.W. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease // *Nat. Med.* 2008. Vol. 14, № 5. P. 504–506.
254. Li J.-Y., Englund E., Holton J.L., Soulet D., Hagell P., Lees A.J., et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation // *Nat. Med.* 2008. Vol. 14, № 5. P. 501–503.
255. Luk K.C., Song C., O'Brien P., Stieber A., Branch J.R., Brunden K.R., et al.

- Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2009. Vol. 106, № 47. P. 20051–20056.
256. Vargas J.Y., Grudina C., Zurzolo C. The prion-like spreading of α -synuclein: From *in vitro* to *in vivo* models of Parkinson's disease // Ageing Res. Rev. 2019. Vol. 50. P. 89–101.
257. Masuda-Suzukake M., Nonaka T., Hosokawa M., Oikawa T., Arai T., Akiyama H., et al. Prion-like spreading of pathological α -synuclein in brain // Brain. 2013. Vol. 136, № Pt 4. P. 1128–1138.
258. Chistiakov D.A., Chistiakov A.A. α -Synuclein-carrying extracellular vesicles in Parkinson's disease: deadly transmitters // Acta Neurol. Belg. 2017. Vol. 117, № 1. P. 43–51.
259. Ivanova M.I., Sawaya M.R., Gingery M., Attinger A., Eisenberg D. An amyloid-forming segment of beta2-microglobulin suggests a molecular model for the fibril // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2004. Vol. 101, № 29. P. 10584–10589.
260. Ventura S., Zurdo J., Narayanan S., Parreño M., Mangués R., Reif B., et al. Short amino acid stretches can mediate amyloid formation in globular proteins: the Src homology 3 (SH3) case // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2004. Vol. 101, № 19. P. 7258–7263.
261. Nerelius C., Fitzen M., Johansson J. Amino acid sequence determinants and molecular chaperones in amyloid fibril formation. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010. Vol. 396, № 1. P. 2–6.
262. Zambrano R., Jamroz M., Szczasiuk A., Pujols J., Kmiecik S., Ventura S. AGGRESCAN3D (A3D): server for prediction of aggregation properties of protein structures // Nucleic Acids Res. 2015. Vol. 43, № W1. P. W306–W313.
263. Sankar K., Krystek S.R., Carl S.M., Day T., Maier J.K.X. AggScore: Prediction of aggregation-prone regions in proteins based on the distribution of surface patches. // Proteins. 2018. Vol. 86, № 11. P. 1147–1156.
264. Conchillo-Solé O., de Groot N.S., Avilés F.X., Vendrell J., Daura X., Ventura S. AGGRESCAN: a server for the prediction and evaluation of “hot spots” of

- aggregation in polypeptides // BMC Bioinformatics. 2007. Vol. 8. P. 65.
265. Sánchez de Groot N., Pallarés I., Avilés F.X., Vendrell J., Ventura S. Prediction of “hot spots” of aggregation in disease-linked polypeptides. // BMC Struct. Biol. 2005. Vol. 5. P. 18.
266. Garbuzynskiy S.O., Lobanov M.Y., Galzitskaya O. V. FoldAmyloid: a method of prediction of amyloidogenic regions from protein sequence // Bioinformatics. 2010. Vol. 26, № 3. P. 326–332.
267. Oliveberg M. Waltz, an exciting new move in amyloid prediction // Nat. Methods. 2010. Vol. 7, № 3. P. 187–188.
268. Maurer-Stroh S., Debulpaep M., Kueemmerer N., Lopez de la Paz M., Martins I.C., Reumers J., et al. Exploring the sequence determinants of amyloid structure using position-specific scoring matrices // Nat. Methods. 2010. Vol. 7, № 3. P. 237–242.
269. Família C., Dennison S.R., Quintas A., Phoenix D.A. Prediction of peptide and protein propensity for amyloid formation // PLoS One. 2015. Vol. 10, № 8. P. e0134679.
270. Bondarev S.A., Bondareva O. V, Zhouravleva G.A., Kajava A. V. BetaSerpentine: a bioinformatics tool for reconstruction of amyloid structures // Bioinformatics. 2018. Vol. 34, № 4. P. 599–608.
271. Dawson T.M., Snyder S.H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain // J. Neurosci. 1994. Vol. 14, № 9. P. 5147–5159.
272. Böhme G.A., Bon C., Stutzmann J.M., Doble A., Blanchard J.C. Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation // Eur. J. Pharmacol. 1991. Vol. 199, № 3. P. 379–381.
273. Trabace L., Cassano T., Tucci P., Steardo L., Kendrick K.M., Cuomo V. The effects of nitric oxide on striatal serotonergic transmission involve multiple targets: an *in vivo* microdialysis study in the awake rat // Brain Res. 2004. Vol. 1008, № 2. P. 293–298.
274. Sessa W.C. The nitric oxide synthase family of proteins // J. Vasc. Res. 1994. Vol. 31, № 3. P. 131–143.
275. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Nitric oxide synthases: structure,

- function and inhibition // *Biochem. J.* 2001. Vol. 357, № Pt 3. P. 593–615.
276. Jaffrey S.R., Snowman A.M., Eliasson M.J., Cohen N.A., Snyder S.H. CAPON: a protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95 // *Neuron.* 1998. Vol. 20, № 1. P. 115–124.
277. Freudenberg F., Althoff A., Reif A. Neuronal nitric oxide synthase (NOS1) and its adaptor, NOS1AP, as a genetic risk factors for psychiatric disorders // *Genes. Brain. Behav.* 2015. Vol. 14, № 1. P. 46–63.
278. Wang J., Jin L., Zhu Y., Zhou X., Yu R., Gao S. Research progress in NOS1AP in neurological and psychiatric diseases. // *Brain Res. Bull.* 2016. Vol. 125. P. 99–105.
279. Villanueva C., Giulivi C. Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease // *Free Radic. Biol. Med.* 2010. Vol. 49, № 3. P. 307–316.
280. Nasyrova R.F., Ivashchenko D. V, Ivanov M. V, Neznanov N.G. Role of nitric oxide and related molecules in schizophrenia pathogenesis: biochemical, genetic and clinical aspects. // *Front. Physiol.* 2015. Vol. 6. P. 139.
281. Tarpey M.M., Fridovich I. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite // *Circ. Res.* 2001. Vol. 89, № 3. P. 224–236.
282. Loeb E., El Asmar K., Trabado S., Gressier F., Colle R., Rigal A., et al. Nitric Oxide Synthase activity in major depressive episodes before and after antidepressant treatment: Results of a large case-control treatment study. // *Psychol. Med.* 2020. P. 1–10.
283. Kittel-Schneider S., Reuß M., Meyer A., Weber H., Gessner A., Leistner C., et al. Multi-level biomarker analysis of nitric oxide synthase isoforms in bipolar disorder and adult ADHD // *J. Psychopharmacol.* 2015. Vol. 29, № 1. P. 31–38.
284. Ustundag M.F., Ozcan H., Gencer A.G., Yilmaz E.D., Uğur K., Oral E., et al. Nitric oxide, asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine and L-arginine levels in psychotic exacerbation of schizophrenia and bipolar disorder manic episode. // *Saudi Med. J.* 2020. Vol. 41, № 1. P. 38–45.

285. Maia-de-Oliveira J.P., Trzesniak C., Oliveira I.R., Kempton M.J., Rezende T.M.N. de, Iego S., et al. Nitric oxide plasma/serum levels in patients with schizophrenia: a systematic review and meta-analysis // *Rev. Bras. Psiquiatr.* 2012. Vol. 34 Suppl 2. P. S149–S155.
286. Majmundar A.J., Buerger F., Forbes T.A., Klämbt V., Schneider R., Deutsch K., et al. Recessive *NOS1AP* variants impair actin remodeling and cause glomerulopathy in humans and mice // *Sci. Adv.* 2021. Vol. 7, № 1. P. eabe1386.
287. Hernandez K., Swiatkowski P., Patel M. V, Liang C., Dudzinski N.R., Brzustowicz L.M., et al. Overexpression of isoforms of nitric oxide synthase 1 adaptor protein, encoded by a risk gene for schizophrenia, alters actin dynamics and synaptic function // *Front. Cell. Neurosci.* 2016. Vol. 10. P. 6.
288. Clattenburg L., Wigerius M., Qi J., Rainey J.K., Rourke J.L., Muruganandan S., et al. NOS1AP functionally associates with YAP to regulate Hippo signaling // *Mol. Cell. Biol.* 2015. Vol. 35, № 13. P. 2265–2277.
289. Fang M., Jaffrey S.R., Sawa A., Ye K., Luo X., Snyder S.H. Dexas1: a G protein specifically coupled to neuronal nitric oxide synthase via CAPON // *Neuron.* 2000. Vol. 28, № 1. P. 183–193.
290. Jaffrey S.R., Benfenati F., Snowman A.M., Czernik A.J., Snyder S.H. Neuronal nitric-oxide synthase localization mediated by a ternary complex with synapsin and CAPON // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. Vol. 99, № 5. P. 3199–3204.
291. Richier L., Williton K., Clattenburg L., Colwill K., O'Brien M., Tsang C., et al. NOS1AP associates with Scribble and regulates dendritic spine development // *J. Neurosci.* 2010. Vol. 30, № 13. P. 4796–4805.
292. Anastas J.N., Biechele T.L., Robitaille M., Muster J., Allison K.H., Angers S., et al. A protein complex of SCRIB, NOS1AP and VANGL1 regulates cell polarity and migration, and is associated with breast cancer progression // *Oncogene.* 2012. Vol. 31, № 32. P. 3696–3708.
293. Chang K.-C., Barth A.S., Sasano T., Kizana E., Kashiwakura Y., Zhang Y., et al. CAPON modulates cardiac repolarization via neuronal nitric oxide synthase signaling in the heart // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. Vol. 105, № 11. P.

- 4477–4482.
294. McNeill R. V, Kehrwald C., Brum M., Knopf K., Brunkhorst-Kanaan N., Etyemez S., et al. Uncovering associations between mental illness diagnosis, nitric oxide synthase gene variation, and peripheral nitric oxide concentration. // *Brain. Behav. Immun.* 2022. Vol. 101. P. 275–283.
 295. Courtney M.J., Li L.-L., Lai Y.Y. Mechanisms of NOS1AP action on NMDA receptor-nNOS signaling // *Front. Cell. Neurosci.* 2014. Vol. 8. P. 252.
 296. Li L.-L., Ginet V., Liu X., Vergun O., Tuittila M., Mathieu M., et al. The nNOS-p38MAPK pathway is mediated by NOS1AP during neuronal death // *J. Neurosci.* 2013. Vol. 33, № 19. P. 8185–8201.
 297. Sugiyama K., Sasano T., Kurokawa J., Takahashi K., Okamura T., Kato N., et al. Oxidative stress induced ventricular arrhythmia and impairment of cardiac function in *Nos1ap* deleted mice // *Int. Heart J.* 2016. Vol. 57, № 3. P. 341–349.
 298. Gheibi S., Ghasemi A. Insulin secretion: The nitric oxide controversy. // *EXCLI J.* 2020. Vol. 19. P. 1227–1245.
 299. Shankar R.R., Wu Y., Shen H.Q., Zhu J.S., Baron A.D. Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance // *Diabetes.* 2000. Vol. 49, № 5. P. 684–687.
 300. Hao M., Head W.S., Gunawardana S.C., Hasty A.H., Piston D.W. Direct effect of cholesterol on insulin secretion: a novel mechanism for pancreatic beta-cell dysfunction // *Diabetes.* 2007. Vol. 56, № 9. P. 2328–2338.
 301. Becker M.L., Aarnoudse A.-J.L.H.J., Newton-Cheh C., Hofman A., Witteman J.C.M., Uitterlinden A.G., et al. Common variation in the *NOS1AP* gene is associated with reduced glucose-lowering effect and with increased mortality in users of sulfonylurea // *Pharmacogenet. Genomics.* 2008. Vol. 18, № 7. P. 591–597.
 302. Becker M.L., Visser L.E., Newton-Cheh C., Witteman J.C.M., Hofman A., Uitterlinden A.G., et al. Genetic variation in the *NOS1AP* gene is associated with the incidence of diabetes mellitus in users of calcium channel blockers // *Diabetologia.* 2008. Vol. 51, № 11. P. 2138–2140.

303. Hu C., Wang C., Zhang R., Ng M.C., Bao Y., Wang C., et al. Association of genetic variants of *NOS1AP* with type 2 diabetes in a Chinese population // *Diabetologia*. 2010. Vol. 53, № 2. P. 290–298.
304. Wang T., Song J.-F., Zhou X.-Y., Li C.-L., Yin X.-X., Lu Q. *PPARD* rs2016520 (T/C) and *NOS1AP* rs12742393 (A/C) polymorphisms affect therapeutic efficacy of nateglinide in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus // *BMC Med. Genomics*. 2021. Vol. 14, № 1. P. 267.
305. Mu K., Sun Y., Zhao Y., Zhao T., Li Q., Zhang M., et al. Hepatic nitric oxide synthase 1 adaptor protein regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in obese mice depending on its PDZ binding domain. // *EBioMedicine*. 2019. Vol. 47. P. 352–364.
306. Zhao T., Li Q., Mao Q., Mu K., Wang C. Hepatic nNOS impaired hepatic insulin sensitivity through the activation of p38 MAPK. // *J. Endocrinol*. 2021. Vol. 248, № 3. P. 265–275.
307. Newton-Cheh C., Eijgelsheim M., Rice K.M., de Bakker P.I.W., Yin X., Estrada K., et al. Common variants at ten loci influence QT interval duration in the QTGEN Study. // *Nat. Genet*. 2009. Vol. 41, № 4. P. 399–406.
308. Pfeufer A., Sanna S., Arking D.E., Müller M., Gateva V., Fuchsberger C., et al. Common variants at ten loci modulate the QT interval duration in the QTSCD Study // *Nat. Genet*. 2009. Vol. 41, № 4. P. 407–414.
309. Hu G., Yang C., Zhao L., Fan Y., Lv Q., Zhao J., et al. The interaction of *NOS1AP*, *DISC1*, *DAOA*, and *GSK3B* confers susceptibility of early-onset schizophrenia in Chinese Han population // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2018. Vol. 81. P. 187–193.
310. Eastwood S.L. Does the *CAPON* gene confer susceptibility to schizophrenia? // *PLoS Med*. 2005. Vol. 2, № 10. P. e348.
311. Moghaddam B., Javitt D. From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. // *Neuropsychopharmacology*. 2012. Vol. 37, № 1. P. 4–15.
312. Gao S., Zhang T., Jin L., Liang D., Fan G., Song Y., et al. *CAPON* is a critical

- protein in synaptic molecular networks in the prefrontal cortex of mood disorder patients and contributes to depression-like behavior in a mouse model // *Cereb. Cortex*. 2019. Vol. 29, № 9. P. 3752–3765.
313. Greenwood T.A., Lazzeroni L.C., Calkins M.E., Freedman R., Green M.F., Gur R.E., et al. Genetic assessment of additional endophenotypes from the Consortium on the Genetics of Schizophrenia Family Study. // *Schizophr. Res.* 2016. Vol. 170, № 1. P. 30–40.
314. Greenwood T.A., Lazzeroni L.C., Murray S.S., Cadenhead K.S., Calkins M.E., Dobie D.J., et al. Analysis of 94 candidate genes and 12 endophenotypes for schizophrenia from the Consortium on the Genetics of Schizophrenia // *Am. J. Psychiatry*. 2011. Vol. 168, № 9. P. 930–946.
315. Greenwood T.A., Lazzeroni L.C., Maihofer A.X., Swerdlow N.R., Calkins M.E., Freedman R., et al. Genome-wide association of endophenotypes for schizophrenia from the Consortium on the Genetics of Schizophrenia (COGS) Study. // *JAMA psychiatry*. 2019. Vol. 76, № 12. P. 1274–1284.
316. Cheah S.-Y., Lawford B.R., Young R.M., Morris C.P., Voisey J. Association of *NOS1AP* variants and depression phenotypes in schizophrenia // *J. Affect. Disord.* 2015. Vol. 188. P. 263–269.
317. Bruenig D., Morris C.P., Mehta D., Harvey W., Lawford B., Young R.M., et al. Nitric oxide pathway genes (*NOS1AP* and *NOS1*) are involved in PTSD severity, depression, anxiety, stress and resilience // *Gene*. 2017. Vol. 625. P. 42–48.
318. Lawford B.R., Morris C.P., Swagell C.D., Hughes I.P., Young R.M., Voisey J. *NOS1AP* is associated with increased severity of PTSD and depression in untreated combat veterans // *J. Affect. Disord.* 2013. Vol. 147, № 1–3. P. 87–93.
319. Delorme R., Betancur C., Scheid I., Anckarsäter H., Chaste P., Jamain S., et al. Mutation screening of *NOS1AP* gene in a large sample of psychiatric patients and controls // *BMC Med. Genet.* 2010. Vol. 11. P. 108.
320. Hashimoto M., Bogdanovic N., Nakagawa H., Volkmann I., Aoki M., Winblad B., et al. Analysis of microdissected neurons by 18O mass spectrometry reveals altered protein expression in Alzheimer's disease. // *J. Cell. Mol. Med.* 2012. Vol.

- 16, № 8. P. 1686–1700.
321. Buxbaum J.N., Dispenzieri A., Eisenberg D.S., Fändrich M., Merlini G., Saraiva M.J.M., et al. Amyloid nomenclature 2022: update, novel proteins, and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) Nomenclature Committee // *Amyloid*. 2022. Vol. 29, № 4. P. 213–219.
322. Gómez-Benito M., Granado N., García-Sanz P., Michel A., Dumoulin M., Moratalla R. Modeling Parkinson's disease with the alpha-synuclein protein // *Front. Pharmacol.* 2020. Vol. 11. P. 356.
323. Danilov L.G., Moskalenko S.E., Matveenko A.G., Sukhanova X. V., Belousov M. V., Zhouravleva G.A., et al. The human NUP58 nucleoporin can form amyloids *in vitro* and *in vivo* // *Biomedicines*. 2021. Vol. 9, № 10. P. 1451.
324. Chernoff Y.O., Lindquist S.L., Ono B., Inge-Vechtomov S.G., Liebman S.W. Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [*psi*⁺] // *Science*. 1995. Vol. 268, № 5212. P. 880–884.
325. DuBridgе R.B., Tang P., Hsia H.C., Leong P.M., Miller J.H., Calos M.P. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system // *Mol. Cell. Biol.* 1987. Vol. 7, № 1. P. 379–387.
326. Tumilowicz J.J., Nichols W.W., Cholon J.J., Greene A.E. Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma // *Cancer Res.* 1970. Vol. 30, № 8. P. 2110–2118.
327. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning - Laboratory manual*. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
328. Kaiser C.A., Michaelis S., Mitchell A.P. *Methods in yeast genetics: a cold spring harbor laboratory course manual*. NY: Cold Spring Harbour laboratory press, 1994.
329. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids // *Gene*. 1990. Vol. 96, № 1. P. 23–28.
330. Gietz D., St Jean A., Woods R.A., Schiestl R.H. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. // *Nucleic Acids Res.* 1992. Vol. 20, № 6. P. 1425.

331. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // *Bioinformatics*. 2012. Vol. 28, № 8. P. 1166–1167.
332. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. Vol. 227, № 5259. P. 680–685.
333. Kyhse-Andersen J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose // *J. Biochem. Biophys. Methods*. 1984. Vol. 10, № 3–4. P. 203–209.
334. Kryndushkin D.S., Alexandrov I.M., Ter-Avanesyan M.D., Kushnirov V. V. Yeast [*PSI+*] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104 // *J. Biol. Chem*. 2003. Vol. 278, № 49. P. 49636–49643.
335. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1979. Vol. 76, № 9. P. 4350–4354.
336. Huang C., Ren G., Zhou H., Wang C. A new method for purification of recombinant human alpha-synuclein in *Escherichia coli* // *Protein Expr. Purif*. 2005. Vol. 42, № 1. P. 173–177.
337. Vaneyck J., Segers-Nolten I., Broersen K., Claessens M.M.A.E. Cross-seeding of alpha-synuclein aggregation by amyloid fibrils of food proteins. // *J. Biol. Chem*. 2021. Vol. 296. P. 100358.
338. Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Cham: Springer International Publishing, 2016. 260 p.
339. Wilcoxon F. Individual comparisons by ranking methods // *Biometrics Bull*. 1945. Vol. 1, № 6. P. 80.
340. Brum J.R., Steward G.F. Morphological characterization of viruses in the stratified water column of alkaline, hypersaline Mono Lake // *Microb. Ecol*. 2010. Vol. 60, № 3. P. 636–643.
341. Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis // *Nat. Methods*. 2012. Vol. 9, № 7. P. 671–675.
342. Bondarev S.A., Zhouravleva G.A., Belousov M. V, Kajava A. V. Structure-based

- view on [PSI⁺] prion properties // *Prion*. 2015. Vol. 9, № 3. P. 190–199.
343. Roche D.B., Villain E., Kajava A. V. Usage of a dataset of NMR resolved protein structures to test aggregation versus solubility prediction algorithms. // *Protein Sci*. 2017. Vol. 26, № 9. P. 1864–1869.
344. Bhatwa A., Wang W., Hassan Y.I., Abraham N., Li X.-Z., Zhou T. Challenges associated with the formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli* and strategies to address them for industrial applications. // *Front. Bioeng. Biotechnol*. 2021. Vol. 9. P. 630551.
345. Chandramowliswaran P., Sun M., Casey K.L., Romanyuk A. V, Grizel A. V, Sopova J. V, et al. Mammalian amyloidogenic proteins promote prion nucleation in yeast // *J. Biol. Chem*. 2018. Vol. 293, № 9. P. 3436–3450.
346. Wickner R.B., Kryndushkin D., Shewmaker F., McGlinchey R., Edskes H.K. Study of amyloids using yeast // *Methods Mol. Biol*. 2012. Vol. 849. P. 321–346.
347. Chernova T.A., Chernoff Y.O., Wilkinson K.D. Yeast models for amyloids and prions: environmental modulation and drug discovery // *Molecules*. 2019. Vol. 24, № 18. P. 3388.
348. Muley V.Y., Akhter Y., Galande S. PDZ domains across the microbial world: molecular link to the proteases, stress response, and protein synthesis // *Genome Biol. Evol.* / ed. Gojobori T. 2019. Vol. 11, № 3. P. 644–659.
349. Halfmann R., Wright J.R., Alberti S., Lindquist S., Rexach M. Prion formation by a yeast GLFG nucleoporin // *Prion*. 2012. Vol. 6, № 4. P. 391–399.
350. Lemkau L.R., Comellas G., Kloepper K.D., Woods W.S., George J.M., Rienstra C.M. Mutant protein A30P α -synuclein adopts wild-type fibril structure, despite slower fibrillation kinetics // *J. Biol. Chem*. 2012. Vol. 287, № 14. P. 11526–11532.
351. Hu C.-D., Chinenov Y., Kerppola T.K. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation // *Mol. Cell*. 2002. Vol. 9, № 4. P. 789–798.
352. Croucher D.R., Iconomou M., Hastings J.F., Kennedy S.P., Han J.Z.R., Shearer R.F., et al. Bimolecular complementation affinity purification (BiCAP) reveals

- dimer-specific protein interactions for ERBB2 dimers // *Sci. Signal.* 2016. Vol. 9, № 436. P. ra69.
353. Guan Y., Zhao X., Liu F., Yan S., Wang Y., Du C., et al. Pathogenic mutations differentially regulate cell-to-cell transmission of α -synuclein // *Front. Cell. Neurosci.* 2020. Vol. 14. P. 159.
354. Wördehoff M.M., Hoyer W. α -Synuclein aggregation monitored by thioflavin T fluorescence assay // *Bio-protocol.* 2018. Vol. 8, № 14. P. e2941.
355. Barage S.H., Sonawane K.D. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease // *Neuropeptides.* 2015. Vol. 52. P. 1–18.
356. Ricciarelli R., Fedele E. The amyloid cascade hypothesis in Alzheimer's disease: it's time to change our mind // *Curr. Neuropharmacol.* 2017. Vol. 15, № 6. P. 926–935.
357. Khurana R., Uversky V.N., Nielsen L., Fink A.L. Is Congo red an amyloid-specific dye? // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 25. P. 22715–22721.
358. Navarro S., Ventura S. Computational re-design of protein structures to improve solubility. // *Expert Opin. Drug Discov.* 2019. Vol. 14, № 10. P. 1077–1088.
359. Shaw G., Morse S., Ararat M., Graham F.L. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells // *FASEB J.* 2002. Vol. 16, № 8. P. 869–871.
360. Delenclos M., Burgess J.D., Lamprokostopoulou A., Outeiro T.F., Vekrellis K., McLean P.J. Cellular models of alpha-synuclein toxicity and aggregation // *J. Neurochem.* 2019. Vol. 150, № 5. P. 566–576.
361. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. // *Nature.* 2021. Vol. 596, № 7873. P. 583–589.
362. Varadi M., Anyango S., Deshpande M., Nair S., Natassia C., Yordanova G., et al. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. // *Nucleic Acids Res.* 2022. Vol. 50, № D1. P. D439–D444.

363. Hernandez S.M., Tikhonova E.B., Karamyshev A.L. Protein-protein interactions in alpha-synuclein biogenesis: new potential targets in Parkinson's disease // *Front. Aging Neurosci.* 2020. Vol. 12. P. 72.
364. Gupta A.K., Pokhriyal R., Das U., Khan M.I., Ratna Kumar D., Gupta R., et al. Evaluation of α -synuclein and apolipoprotein E as potential biomarkers in cerebrospinal fluid to monitor pharmacotherapeutic efficacy in dopamine dictated disease states of Parkinson's disease and schizophrenia. // *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2019. Vol. 15. P. 2073–2085.
365. Shyu Y.J., Suarez C.D., Hu C.-D. Visualization of ternary complexes in living cells by using a BiFC-based FRET assay // *Nat. Protoc.* 2008. Vol. 3, № 11. P. 1693–1702.
366. Kerppola T.K. Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells // *Nat. Protoc.* 2006. Vol. 1, № 3. P. 1278–1286.
367. Lashuel H.A., Overk C.R., Oueslati A., Masliah E. The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2013. Vol. 14, № 1. P. 38–48.
368. Kuusimäki T., Al-Abdulrasul H., Kurki S., Hietala J., Hartikainen S., Koponen M., et al. Increased risk of Parkinson's disease in patients with schizophrenia spectrum disorders // *Mov. Disord.* 2021. Vol. 36, № 6. P. 1353–1361.
369. Gadit A. Schizophrenia and Parkinson's disease: challenges in management // *BMJ Case Rep.* 2011. Vol. 2011. P. bcr1120115108.
370. Souza J.M., Giasson B.I., Chen Q., Lee V.M., Ischiropoulos H. Dityrosine cross-linking promotes formation of stable alpha -synuclein polymers. Implication of nitrative and oxidative stress in the pathogenesis of neurodegenerative synucleinopathies // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275, № 24. P. 18344–18349.
371. Takahashi T., Yamashita H., Nakamura T., Nagano Y., Nakamura S. Tyrosine 125 of alpha-synuclein plays a critical role for dimerization following nitrative stress. // *Brain Res.* 2002. Vol. 938, № 1–2. P. 73–80.
372. Olivares D., Huang X., Branden L., Greig N.H., Rogers J.T. Physiological and

- pathological role of alpha-synuclein in Parkinson's disease through iron mediated oxidative stress; the role of a putative iron-responsive element // *Int. J. Mol. Sci.* 2009. Vol. 10, № 3. P. 1226–1260.
373. Hodara R., Norris E.H., Giasson B.I., Mishizen-Eberz A.J., Lynch D.R., Lee V.M.-Y., et al. Functional consequences of alpha-synuclein tyrosine nitration: diminished binding to lipid vesicles and increased fibril formation // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 46. P. 47746–47753.

ACKNOWLEDGEMENTS

«The gods gave humans barely enough knowledge for them to fill their stomachs. Yet, they used it to craft tools, write books, and build cities, and now they've set their sights on the stars and the abyss... With every moment that goes by, they're creating brand-new knowledge, so I never want to take my eyes off them.»

In conclusion, I would like to write words of gratitude to my supervisor, Stanislav Aleksandrovich Bondarev, for his responsive guidance, methodological advice, help in planning experiments, as well as for his infinitely great support and faith in me. I would like to thank my laboratory colleagues for their support, active discussion of working issues and regular scientific seminars. In particular I would like to thank Nina Pavlovna Trubitsina for her help in carrying out the work and discussing the results obtained.

I am grateful to Trubitsina Nina Pavlovna, Barbitov Yury Aleksandrovich, Matveenko Andrey Georgievich, Zhuravleva Galina Anatolievna and Bondarev Stanislav Aleksandrovich for their great work in preparation of two review articles, materials of which were used in this work.

I thank Galina Anatolievna Zhuravleva for her critical reading of the thesis text.

I would like to thank Natalya Viktorovna Katolikova and Daniil Valerievich Kachkin for the provided cell cultures.

In addition to the staff of the Department of Genetics and Biotechnology, I would also like to thank Anna Romanovich, Nikolay Kostin and Maxim Vorobiev of the SPbU Resource Centers for their help in working on the equipment.

I thank my parents and my sister for supporting me during my postgraduate studies and during the writing of my dissertation.