

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ
АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 57.088.1

МУТАЦИИ В ГЕНЕ *SOD1* ПРИ БОКОВОМ АМИОТРОФИЧЕСКОМ
СКЛЕРОЗЕ: ВОЗМОЖНОСТИ МЕТОДА МОЛЕКУЛЯРНОГО
МОДЕЛИРОВАНИЯ

© 2013 г. Е. В. Лысогорская*, А. В. Россохин, Н. Ю. Абрамычева,
М. Н. Захарова, С. Н. Иллариошкин

Научный центр неврологии Российской академии медицинских наук, Москва 125367

Поступила в редакцию 16.04.2013 г.

Принята к печати 26.04.2013 г.

Перспективным методом оценки структуры белка, позволяющим на уровне атомов представить его энергетически выгодную конформацию, является метод молекулярного моделирования. Этот метод имеет большое значение при исследовании межмолекулярных взаимодействий и подтверждении патогенетической значимости изменений структуры белка, привносимых конкретными мутациями. Мы применили молекулярное моделирование для оценки мутаций в гене *SOD1* у пациентов с боковым амиотрофическим склерозом – тяжелым нейродегенеративным заболеванием, характеризующимся гибелью двигательных нейронов спинного и головного мозга. Продукт гена *SOD1* – цитозольный димерный фермент Cu/Zn-супероксиддисмутаза (СОД1), отвечающий в клетке за детоксикацию супероксидных радикалов. Показано, что все 8 выявленных нами кодирующих точечных мутаций гена приводили к умеренному или значительному изменению энергии белка СОД1. Мутация His49Arg повышала энергию белка, а построение соответствующей модели указывало на пространственную дестабилизацию молекулы и нарушение взаимодействия с ионом металла в активном центре. Остальные 7 мутаций (Gly17Ala, Leu85Val, Asn87Ser, Asp91Ala, Ser106Leu, Glu134Gly, Leu145Phe), напротив, приводили к снижению энергии белка и повышению пространственной стабильности СОД1, что может сопровождаться повышенной склонностью «инертной» мутантной молекулы к мисфолдингу и внутриклеточной агрегации. Таким образом, результаты анализа *in silico* мутаций гена *SOD1* подтверждают принадлежность бокового амиотрофического склероза к классу так называемых конформационных болезней центральной нервной системы, характерной чертой которых является формирование в нейронах цитотоксичных нерастворимых белковых включений.

Ключевые слова: боковой амиотрофический склероз, ген *SOD1*, мутационный анализ, молекулярное моделирование.

SOD1 GENE MUTATIONS IN PATIENTS WITH AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS: POTENTIAL FOR THE METHOD OF MOLECULAR MODELING, by E. V. Lysogorskaja*, A. V. Rossokhin, N. Yu. Abramychyeva, M. N. Zakharova, S. N. Illarioshkin (Research Center of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 125367 Russia; *e-mail: kutakovaev@gmail.com). The molecular modeling method is promising for the assessment of protein structure, being able to present an energetically beneficial protein conformation with atomic precision. This method is of great importance for studying molecular interactions and confirming pathogenic significance of the changes in the protein structure caused by particular mutations. In the present study we used molecular modeling for the assessment of mutations in the *SOD1* gene in patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS), a severe neurodegenerative disorder characterized by the loss of the spinal and cerebral motor neurons. The product of *SOD1* is a cytosolic dimeric enzyme Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) responsible for detoxification of the cellular superoxide radicals. We showed that all 8 revealed coding point mutations of the gene led to moderate or significant changes of the SOD1 protein energy. Mutation His49Arg increased the protein energy, and reconstruction of the respective model pointed out to spatial destabilization of the molecule and abnormal interaction with the metal ion inside the active center. The other 7 mutations (Gly17Ala, Leu85Val, Asn87Ser, Asp91Ala, Ser106Leu, Glu134Gly, and Leu145Phe), on the contrary, led to decrease of the protein energy and increase of the spatial stability of SOD1, which is usually accompanied by increased propensity of the 'inert' mutant molecule to misfolding and cellular aggregation. Thereby, the results of *in silico* analysis of the *SOD1* gene mutations confirm staying of ALS within the class of

Принятые сокращения: БАС – боковой амиотрофический склероз; СОД1 – цитозольная Cu/Zn-супероксиддисмутаза.
*Эл. почта: kutakovaev@gmail.com

the so-called conformational diseases of the central nervous system, a characteristic feature of which is forming of cytotoxic insoluble protein inclusions in neurons.

Keywords: amyotrophic lateral sclerosis, *SOD1* gene, mutation analysis, molecular modeling.

DOI: 10.7868/S0026898413050121

В последние годы, в связи с развитием компьютерной техники, в биологии стал активно развиваться весьма перспективный подход к изучению молекулярных процессов, определяемый термином “*in silico*” и связанный с применением методов молекулярного моделирования [1–3]. Данная методика позволяет с разрешением на уровне атомов построить модель анализируемого белка и найти его энергетически оптимальную конформацию [4]. Это имеет большое значение для изучения разнообразных межбелковых взаимодействий, включая рецепторно-лигандные процессы, для анализа молекулярных механизмов развития заболеваний человека и подтверждения патогенетической значимости выявляемых мутаций. Таким образом, молекулярное моделирование позволяет серьезно расширить арсенал традиционных технологий, применяемых в биомедицинских исследованиях.

Использование указанного подхода актуально при исследовании патогенеза нейродегенеративных заболеваний, точные механизмы которых до настоящего времени не определены. Одно из таких нейродегенеративных заболеваний – боковой амиотрофический склероз (БАС) – быстро прогрессирующая смертельная болезнь, обусловленная неуклонной гибелью двигательных нейронов, развитием параличей и дыхательной недостаточности [5]. Свыше 90% всех случаев БАС имеют неустановленную этиологию и являются спорадическими, а у остальных пациентов имеют место семейные (как правило, аутосомно-доминантные) формы БАС, связанные с редкими мутациями генов *SOD1*, *ALS2*, *FUS*, *TARDBP* и др. [6–10].

Благодаря идентификации генетических повреждений, ассоциированных с развитием ряда наследственно-семейных и спорадических форм БАС, к настоящему времени известны важные элементы патогенетического каскада при данном заболевании. Так, одним из ключевых белков, чья роль в избирательном повреждении двигательных нейронов при БАС считается твердо установленной, является цитозольная Cu/Zn-супероксиддисмутаза (СОД1), кодируемая геном *SOD1* [11]. СОД1 имеет молекулярную массу 32,5 кДа и отвечает за детоксикацию супероксидных радикалов с превращением их в молекулы кислорода и перекись водорода [11]. СОД1 – чрезвычайно высококонсервативный белок [11, 12], поэтому большинство аминокислотных замен в его составе

должны быть патогенетически значимыми. Однако характер белковой дисфункции при конкретных точечных мутациях *SOD1* в большинстве случаев остается неясным. С учетом данных о сохранной активности мутантного фермента можно предположить, что измененный белок приобретает качественно новые цитотоксические свойства [13]. Согласно современным представлениям, цитотоксическая функция мутантного белка СОД1 может реализовываться двумя основными путями: а) через формирование патологических конформеров СОД1 и клеточных белковых агрегатов; б) через нарушение субстратной специфичности мутантного белка и прямое цитотоксическое действие агрессивных метаболитов – продуктов аномального СОД1-опосредованного катализа [14]. Наиболее вероятно, что в патогенезе БАС имеет значение сочетание обоих вышеуказанных механизмов.

К настоящему времени у пациентов с БАС описано более 160 мутаций в гене *SOD1*. В данном исследовании представлен выявленный нами спектр мутаций в гене *SOD1* в обширной когорте российских пациентов с БАС. Цель работы – установление возможностей метода молекулярного моделирования в качестве дополнительного аналитического подхода, позволяющего подтвердить патогенетическую значимость выявленных мутаций *SOD1*, и уточнение молекулярных механизмов нейрональной цитотоксичности при данном заболевании.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Молекулярно-генетическое исследование. Образцы геномной ДНК 206 пациентов (98 женщин и 108 мужчин), страдающих БАС, выделяли из крови с помощью набора Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Полное секвенирование кодирующей области гена *SOD1* проводили на генетическом анализаторе 3130 Applied Biosystems с использованием BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Молекулярное моделирование. Аминокислотные последовательности белков СОД1 (sod_m и sod_h) мыши и человека получены с помощью базы данных SwissProt [15]. В банке белковых структур (Brookhaven Protein Data Bank) получены координаты структур sod_m и sod_h (3GTT и 3ECU соответственно).

```

h MATKAVCVLKGDPVQGIINFEQKESNGPVKVGWSIKGLTEGLHGFHVHEFGDNTAGCTSA 61
m -AMKAVCVLKGDPVQGTIHFEQKASGEPPVLSGQITGLTEGQHGFHVHQYGDNTQGCTSA 61
* ***** * ***** * ** * * ***** ***** * * * * *

h GPHFNPLSRKHGGPKDEERHVGDLGNVTADKDGVADVSIEDSVISLSGDHCIIGRTLVVH 121
m GPHFNPHSKKHGGPADEERHVGDLGNVTAGKDGVANVSIEDRVISLSGEHSIIGRTTMVVH 121
***** * ***** ***** ***** ***** ***** * ***** **

h EKADDLGKGGNEESTKTGNAGSRLLACGVIGIAQ 154
m EKQDDLGKGGNEESTKTGNAGSRLLACGVIGIAQ 154
** *****

```

Рис. 2. Схема выравнивания последовательности белка СОД1 мыши (m) и человека (h). Жирным шрифтом выделены мутировавшие аминокислотные остатки. Звездочками показаны совпадающие остатки.

СОД1 имеет глобулярную структуру и состоит из двух субъединиц, в активных центрах которых связаны ионы Zn^{2+} и Cu^{2+} (рис. 1). При процедуре выравнивания (сравнения) аминокислотных последовательностей белков СОД1 мыши и человека, проводимой при помощи программы ClustalW2, выявлен высокий уровень гомологии двух принадлежащих разным видам белков (рис. 2). В связи с этим в качестве шаблона при построении моделей нативного и мутантного белков использовали структуру мышинной молекулы СОД1, в активных центрах обеих субъединиц которой содержатся ионы цинка.

Далее аминокислотные остатки в структуре шаблона замещали остатками моделируемого белка. При этом для остатков, идентичных в шаблоне и модели, в качестве стартовых значений торсионных углов боковых цепей принимали величины, характерные для структуры шаблона. В случае несовпадения остатков в качестве стартовой принимали *trans*-конформацию боковой цепи.

При построении молекулы белка учитывали ван-дер-ваальсовы и электростатические взаимодействия. Ван-дер-ваальсовы взаимодействия вычисляли с использованием силового поля AMBER [16] с расстоянием отсечки 9 Å. При вычислении электростатических взаимодействий и энергии гидратации использовали выражение диэлектрической проницаемости как функции расстояния между парами атомов и степени их экспозиции в водное окружение [4].

С целью поиска оптимальной энергетической конформации модели белка выполняли процедуру минимизации энергии Монте-Карло (МКМ) [17]. Построение модели белка и поиск его минимальной энергетической конформации (МЕК)

осуществляли при помощи компьютерной программы ZMM [18]. Процедура МКМ автоматически завершалась, если в течение последовательных 5000 шагов не происходило уменьшение энергии белка. На начальном этапе траектории МКМ практически неизбежны стерические конфликты (особенно в случае внедрения мутаций) между боковыми цепями близлежащих остатков. Для сохранения пространственной структуры белка на C_{α} -атомы аминокислотных остатков накладывали специальные констрейнты. Констрейнт представляет собой параболическую функцию, которая резко повышает энергию системы при отклонении C_{α} - атома от своего положения, заданного в шаблоне, на расстояние, превышающее 1 Å. Процедура МКМ и поиск МЕК выполняли как для белка “дикого типа”, так и в случае каждой из описанных выше мутаций.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При секвенировании *SOD1* в кодирующей области гена выявлено 8 мутаций у 10 неродственных пациентов с БАС: Gly17Ala, His49Arg, Leu85Val, Asn87Ser, Asp91Ala, Ser106Leu, Glu134Gly, Leu145Phe (номенклатура мутаций – по электронной базе [15]). Краткая клиническая характеристика пациентов-носителей данных мутаций представлена в таблице.

С целью доказательства патогенетической значимости тех или иных мутаций применяли различные подходы [19]: а) исследование культуральных и животных моделей, выявляющее ферментативный дефект или развитие заболевания у трансгенных животных; б) теоретический анализ характера нуклеотидной замены (нонсенс-мута-

ция с обрывом трансляции, локализация мутации в консервативной или функционально значимой области белка и т.д.); в) анализ сегрегации мутаций у здоровых и больных членовотягощенных семей; г) анализ частот выявляемых нуклеотидных вариантов в группе больных в сопоставлении с нормальным популяционным контролем. В последние годы для решения этой задачи все более активно привлекают современные методы оценки структуры белка на молекулярном уровне, к числу которых относится и метод молекулярного моделирования.

Среди мутаций, выявленных в нашей группе пациентов с БАС, патогенетическую значимость можно считать установленной для Leu85Val (rs121912452), Asp91Ala (rs80265967), Asn87Ser и Leu145Phe.

Патогенетическая значимость замен Leu85Val убедительно показана при исследовании активности СОД1 в культуре кожных фибробластов: активность фермента в данном эксперименте снижалась более чем на 75% от исходного уровня [20]. Значение Leu145Phe также подтверждено при исследовании активности СОД1 [21]. При изучении роли мутации Asp91Ala также исследовали ферментативную активность СОД1, при этом впервые предположили значение не только снижения функции фермента, но и приобретения мутантным белком новых патологических свойств (мутация по типу “gain-of-function”) [22]. В подтверждении патогенетической значимости Asn87Ser решающую роль сыграло наблюдение большого числа семей с БАС, больные члены которых (в отличие от здоровых лиц и популяционного контроля) имели данную мутацию — более 55 семей в различных популяциях мира [8].

Еще четыре мутации (Gly17Ala, His49Arg, Ser106Leu и Glu134Gly), выявленные у обследованных нами пациентов с БАС, с определенной частотой встречаются в других популяциях мира, но их биологические свойства до настоящего времени не вполне ясны.

В результате проведенного нами молекулярного моделирования, включавшего сравнительный анализ СОД1 дикого типа и белка после внесения каждой из обнаруженных в нашей группе пациентов кодирующих мутаций, установлено, что все выявленные мутации приводили к умеренному или значительному изменению энергии белка (рис. 3).

Одна из мутаций, локализованная в непосредственной близости к активному центру — His49Arg, приводила к повышению энергии белка, что соответствует ухудшению конформационной стабильности. Исследование выявило существенное отличие энергии остатков H49 (дикий) и R49 (мутант): –25.9 и –15.1 ккал/моль соответственно. При этом вклад в изменение энергии остатка вносили как ван-дер-ваальсова, так и электростатическая компоненты энергии (–21.3 и –12.9 ккал/моль, –4.2 и –1.8 ккал/моль соответственно). Несмотря на тот факт, что мутированный остаток расположен несколько в стороне от активного центра, энергия взаимодействия с ионом цинка у дикого и мутированного белка отличается: –0.6 и 1.1 ккал/моль соответственно. Положительное значение энергии указывает на дестабилизирующий характер мутации, нарушающей взаимодействие с ионом металла в активном центре.

Кроме того, для мутации His49Arg имеет значение и изменение размера и геометрии боковой цепи белкового остатка. Несмотря на одинаковый положительный заряд у нативного и мутированного остатков, их боковые цепи существенно

Клинические характеристики пациентов-носителей мутаций в гене *SOD1*

ID пациента	Мутация	Энергия белка, ккал/моль	Возраст/пол	Форма заболевания	Темп прогрессирования
187	Gly17Ala	–1627.2	31/ж	Первично-генерализованная, спорадическая	Быстрый
15	His 49Arg	–1608.9	50/м	Шейно-грудная, спорадическая	Медленный
120	Leu85Val	–1647.5	39/м	Бульбарная, семейная	Быстрый
145	Leu85Val	–1647.5	29/м	Шейно-грудная, семейная	Медленный
155	Asn87Ser	–1628.6	54/ж	Шейно-грудная, спорадическая	Быстрый
224	Asn87Ser	–1628.6	50/ж	Пояснично-крестцовая, семейная	Медленный
206	Asp91Ala	–1662.3	62/ж	Пояснично-крестцовая, спорадическая	Медленный
116	Ser106Leu	–1666.6	46/м	Пояснично-крестцовая, семейная	Медленный
176	Glu134Gly	–1648.0	34/ж	Шейно-грудная, спорадическая	Медленный
17	Leu145Phe	–1659.4	44/ж	Пояснично-крестцовая, спорадическая	Медленный

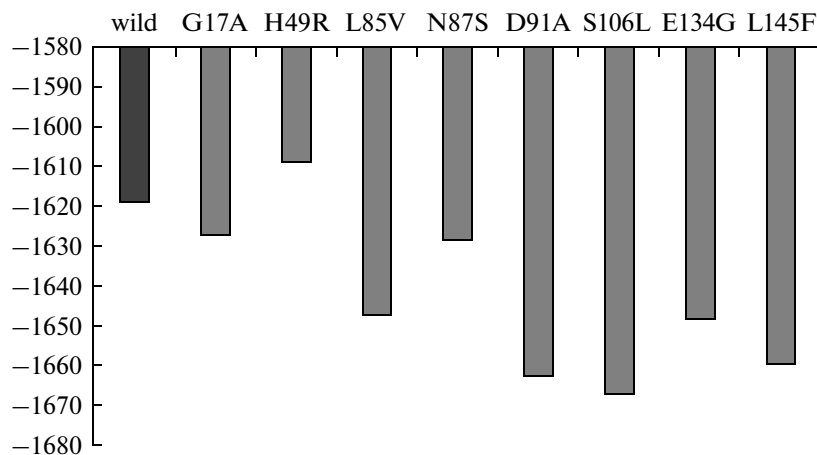


Рис. 3. Гистограмма распределения энергии белка (ккал/моль) для внедренных в модель мутаций. “wild” – белок дикого типа.

различны по размеру: аргинин обладает более массивной боковой цепью (рис. 4). В мутированном белке после процедуры МКМ очевиден неразрешенный стерический конфликт между аргинином в положениях 49 и 144 (5.7 ккал/моль). Если сравнить с белком дикого типа, то он обладает отрицательной энергией взаимодействия белковых остатков в этих положениях (–1.7 ккал/моль), а также заметно меньшей энергией взаимодействия аминокислотных остатков в положениях 49 и 121 по сравнению с мутированным белком: –1 (дикий) и 0.5 (мутант) ккал/моль. Таким образом, для более массивной боковой цепи аргинина недостаточно места в структуре белка при его стандартной укладке. Данная мутация приводит к пространственной дестабилизации молекулы СОД1, что позволяет предполагать изменение глобальной конформации белка и несомненную патогенетическую значимость замены His49Arg в реализации клеточных механизмов БАС у носителей данной мутации.

Остальные изученные мутации приводили к снижению энергии белка и повышению стабильности белковой молекулы СОД1, при этом максимально стабильными являются молекулы белка с внесенными заменами Leu85Val, Asp91Ala, Glu134Gly и Leu145Phe (рис. 3). Такое изменение энергии белка по данным молекулярного моделирования может сопровождаться повышенной склонностью “инертной” мутантной молекулы к мисфолдингу и внутриклеточной агрегации, что показывает принадлежность БАС к классу так называемых конформационных болезней центральной нервной системы [14, 23, 24]. Характерной чертой конформационных болезней (протеинопатий) является формирование в нейронах, клетках глии и межклеточном пространстве нерастворимых белковых включений, причем наибольшая цитотоксичность чаще

всего характерна не для зрелых агрегатов, а для промежуточных олигомерных структур. Такие включения – результат разнообразных молекулярных событий, меняющих конформацию и устойчивость определенных белков-мишеней, например: патологическое удлинение полиглутаминовых цепей при заболеваниях с экспансией CAG-повторов (болезнь Гентингтона, доминантные атаксии), изменение структуры или экспрессии в нейронах уровня амилоидогенных субстратов – α -синуклеина (болезнь Паркинсона), β -амилоида (болезнь Альцгеймера), тау-протеина (таупатии) и т.д. [14, 25, 26].

При БАС в нейронах пораженных отделов нервной системы обнаружены белковые включения различного типа – тельца Хирано, гиалиновые тельца, включения Буниной и Лафоры, тельца Леви, убиквитированные включения и др. [5], причем при разных формах БАС нейрональные включения и их комбинации могут быть различными. Определение конкретных белковых молекул в составе тех или иных включений имеет большое значение, поскольку позволяет уточнить патогенез БАС. Так, известно, что основным компонентом телец Леви является альфа-синуклеин, тельца Хирано содержат актин, важным компонентом включений Буниной является белок TDP43, а СОД1 обнаруживается в составе убиквитированных включений и гиалиновых телец. Наличие агрегированной СОД1 выявлено в составе убиквитированных включений у 80% больных семейной формой БАС из различных популяций [27]. Несмотря на то, что мутации гена *SOD1* ассоциированы в среднем лишь с 20% семейных форм заболевания [9, 10], этот факт подтверждает важную универсальную роль *SOD1*-ассоциированных механизмов в патогенетическом каскаде БАС.

Один из возможных механизмов агрегации СОД1 при БАС – изменение третичной структу-

ры белка в результате мутации и последующих посттрансляционных окислительных модификаций [27]. Другой – диссоциация СОД1 на мономеры в результате потери иона цинка, что повышает способность СОД1 к агрегации. По современным представлениям именно ионы цинка рассматривают в качестве фактора, обеспечивающего стабильность белковой молекулы СОД1 [28, 29]. Данную гипотезу подтверждает факт замедления течения заболевания у трансгенных животных при обогащении их диеты цинком [30].

В ряде случаев при БАС в дегенерирующих нейронах накапливаются белковые агрегаты, содержащие СОД1. Именно этот процесс подтверждают данные, полученные в результате молекулярного моделирования, – большинство обнаруженных в гене *SOD1* мутаций приводят к увеличению стабильности белковой молекулы, вероятному снижению ее доступности для убиквитин-протеасомного комплекса и к ухудшению связывания иона цинка. Кроме того, СОД1 – многофункциональный белок и важный участник межмолекулярных взаимоотношений практически во всех клетках организма, особенно в клетках печени, эритроцитах крови и нейронах. Поэтому патогенетическая значимость мутаций, расположенных вне активного центра молекулы белка и затрагивающих преимущественно его боковые цепи, экспонированные наружу, может быть крайне высока. Она связана с тем, что именно данные области белковой молекулы не только участвуют в димеризации двух молекул СОД1, но и осуществляют межмолекулярные взаимодействия, позволяющие СОД1 выполнять свою функцию в клетках [21].

Таким образом, полученные в результате молекулярного моделирования данные подтверждают патологическую роль точечных мутаций в гене *SOD1*, выявленных у больных БАС из исследуемой группы, а также подтверждают современные представления о БАС как о конформационной болезни центральной нервной системы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chiti F., Stefani M., Taddei N., Ramponi G., Dobson C.M. 2003. Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates. *Nature*. **424**(6950), 805–808.
- Padhi A.K., Kumar H., Vasaikar S.V., Jayaram B., Gomes J. 2012. Mechanisms of loss of functions of human angiogenin variants implicated in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*. **7**(2), e32479.
- Sierra Bello O., Gonzalez J., Capani F., Barreto G.E. 2012. In silico docking reveals possible Riluzole binding sites on Nav1.6 sodium channel: implications for amyotrophic lateral sclerosis therapy. *J. Theor. Biol.* **315**, 53–63.
- Garden D.P., Zhorov B.S. 2010. Docking flexible ligands in proteins with a solvent exposure- and distance-dependent dielectric function. *J. Computer-aided Mol. Design*. **24**(2), 91–105.
- Завалишин И.А. 2009. *Боковой амиотрофический склероз*. М.: ГЭОТАР-Медиа.
- Иллариошкин С.Н. 2007. Генетика. В кн.: *Боковой амиотрофический склероз*. Под ред. И.А. Завалишина. М.: Евразия, 230–255.
- Brown J.A., Min J., Staropoli J.F., Collin E., Bi S., Feng X., Barone R., Cao Y., O'Malley L., Xin W., Mullen T.E., Sims K.B. 2012. SOD1, ANG, TARDBP and FUS mutations in amyotrophic lateral sclerosis: a United States clinical testing lab experience. *Amyotroph. Lateral. Scler.* **13**(2), 217–222.
- Millecamps S., Salachas F., Cazeneuve C., Gordon P., Bricka B., Camuzat A., Guillot-Noël L., Russaouen O., Bruneteau G., Pradat P.F., Le Forestier N., Vandenberghe N., Danel-Brunaud V., Guy N., Thauvin-Robinet C., Lacomblez L., Couratier P., Hannequin D., Seilhean D., Le Ber I., Corcia P., Camu W., Brice A., Rouleau G., LeGuern E., Meininger V. 2010. SOD1, ANG, VAPB, TARDBP, and FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis: genotype-phenotype correlations. *J. Med. Genet.* **47**(8), 554–560.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1450/>
- Mackenzie I.R.A., Rademakers R., Neumann M. 2010. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol.* **9**(10), 995–1007
- Rosen D.R., Siddique T., Patterson D., Figlewicz D.A., Sapp P., Hentati A., Donaldson D., et al. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. **362**, 59–62.
- <http://string-db.org/>
- Julien J.-P. 2001. Amyotrophic lateral sclerosis: unfolding the toxicity of the misfolded. *Cell*. **104**, 581–591.
- Иллариошкин С.Н. 2003. *Конформационные болезни мозга*. М.: Янус-К.
- <http://www.uniprot.org/>
- Weiner J., Kollman P.A., Case D.A., Singh U.C., Chio C., Alagona G., Profeta S., Weiner P.K. 1984. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 765–784.
- Li Z., Scheraga H.A. 1987. Monte Carlo-minimization approach to the multiple-minima problem in protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **84**, 6611–6615.
- <http://www.zmmsoft.com/>
- Иллариошкин С.Н. 2004. *ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование*. М.: МИА.
- Aoki M., Abe K., Houi K., Ogasawara M., Matsubara Y., Kobayashi T., Mochio S., Narisawa K., Itoyama Y. 1995. Variance of age at onset in a Japanese family with amyotrophic lateral sclerosis associated with a novel Cu/Zn superoxide dismutase mutation. *Ann. Neurol.* **37**, 676–679.
- Deng H.X., Hentati A., Tainer J.A., Iqbal Z., Cayabyab A., Hung W.Y., Getzoff E.D., Hu P., Herzfeldt B., Roos R.P., et al. 1993. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science*. **261**(5124), 1047–1051.

22. Andersen P.M., Nilsson P., Ala-Hurula V., Keranen M. L., Tarvainen I., Haltia T., Nilsson L., Binzer M., Forsgren L., Marklund S.L. 1995. Amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for an asp90-to-ala mutation in CuZn-superoxide dismutase. *Nature Genet.* **10**, 61–66.
23. Skovronsky D.M., Lee V.M., Trojanowski J.Q. 2006. Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. *Annu. Rev. Pathol.* **1**, 151–170.
24. Шелковникова Т.А., Куликова А.А., Цветков Ф.О., Петерс О., Бачурин С.О., Бухман В.Л., Нинкина Н.Н. 2012. Протеинопатии – формы нейродегенеративных заболеваний, в основе которых лежит патологическая агрегация белков. *Молекулярная биология.* **46**(3), 402–415.
25. Ross C.A., Tabrizi S.J. 2011. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol.* **10**, 83–98.
26. Rubinsztein D.C. 2006. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature.* **443**, 780–786.
27. Захарова М.Н. 2007. Этиология и патогенез. В кн.: *Боковой амиотрофический склероз*. Под ред. И.А. Завалишина. М: Евразия.
28. Leinweber B., Barofsky E., Barofsky D.F., Ermilov V., Nylin K., Beckman J.S. 2004. Aggregation of ALS mutant superoxide dismutase expressed in *Escherichia coli*. *Free Radic. Biol. Med.* **36**(7), 911–918.
29. Stathopoulos P.B., Rumfeldt J.A., Scholz G.A., Irani R.A., Frey H.E., Hallewell R.A., Lepock J.R., Meiering E.M. 2003. Cu/Zn superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis show enhanced formation of aggregates *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**(12), 7021–7026.
30. Ermilova I.P., Ermilov V.B., Levy M., Ho E., Pereira C., Beckman J.S. 2005. Protection by dietary zinc in ALS mutant G93A SOD transgenic mice. *Neurosci. Lett.* **379**(1), 42–46.

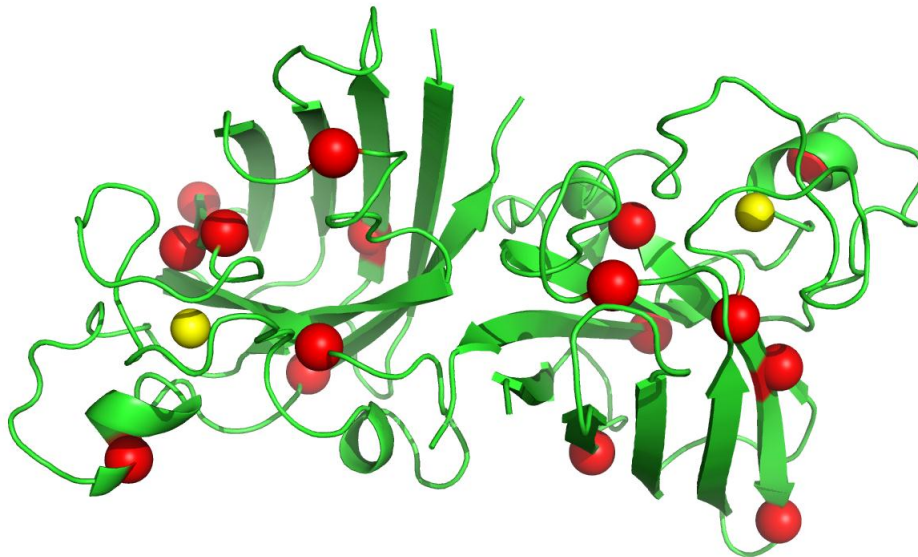


Рис. 1. Трехмерная структура глобулярного белка СОД1. В-тяги показаны стрелками. Желтые сферы изображают ионы Cu^{2+} и Zn^{2+} . Места расположения мутированных остатков показаны красными сферами.

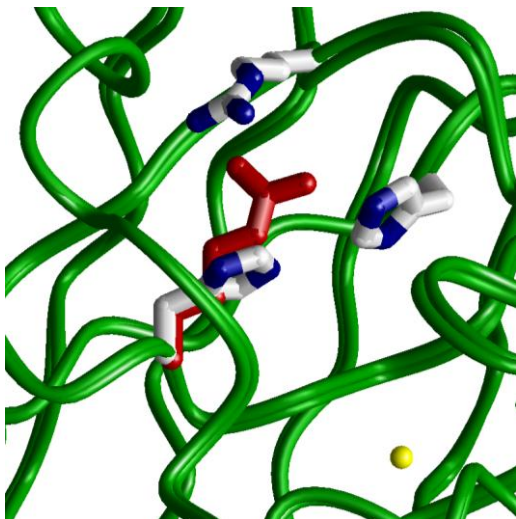


Рис. 4. Структурная модель влияния мутации His49Arg. В увеличенном виде показан участок одной из субъединиц СОД1, содержащий остатки Н49, Н121 и R149. Боковая цепь мутированного остатка R49 выделена красным цветом. Атомы водорода на рисунке не показаны. Желтый шар изображает ион Zn^{2+} в активном центре. Синим цветом показаны атомы N, серым – атомы C.