

УДК 575.112:577.322.2:004.94

СТРУКТУРНЫЕ И ДИНАМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МУТАНТОВ БЕЛКА SOD1, АССОЦИИРОВАННЫХ С БОКОВЫМ АМИОТРОФИЧЕСКИМ СКЛЕРОЗОМ

© 2014 г. **Н.А. Алемасов, Н.В. Иванисенко, В.А. Иванисенко**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: alemasov@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 24 сентября 2014 г. Принята к публикации 21 октября 2014 г.

Одной из причин гибели нейронов головного и спинного мозга при заболевании боковым амиотрофическим склерозом является образование внутриклеточных белковых агрегатов, вызванных мутациями в гене *SOD1*. Ранее показано, что продолжительность жизни пациентов отрицательно коррелирует с термостабильностью мутантных форм белка SOD1, носителями которых они были. В настоящей работе сделано предположение, что усиливать агрегацию мутантов SOD1 может не только дестабилизация структуры белка за счет разрушения водородных связей, но также возникновение новых водородных связей, стабилизирующих патогенную конформацию мутанта. Методом молекулярной динамики оценено время существования водородных связей в белке. Установлено, что корреляция этой оценки с продолжительностью жизни пациентов ($R = 0,89, p < 0,00001$) оказалась существенно сильнее корреляции, полученной ранее на основе анализа термостабильности мутантов.

Ключевые слова: SOD1, нейродегенеративные заболевания, молекулярная динамика, водородные связи, предсказание, время жизни.

ВВЕДЕНИЕ

Боковой амиотрофический склероз (БАС) – нейродегенеративное заболевание, при котором поражаются двигательные нейроны (моторная кора головного мозга, передние рога спинного мозга и ядра черепно-мозговых нервов). Поражение двигательных нейронов вызывает прогрессирующий паралич и атрофию мышц, приводящую в итоге к смерти пациентов из-за нарушения функции легких (Haidet-Phillips *et al.*, 2011; Alavi *et al.*, 2013). Частота встречаемости заболевания составляет один – два случая на 100 тыс. (Brown, 1997; Alavi *et al.*, 2013). По разным данным, от 1 до 23 % случаев БАС имеют наследственную природу (Eisen *et al.*, 2008; Alavi *et al.*, 2013). Наиболее распространенными наследственными причинами развития БАС считаются мутации в гене *SOD1*, кодирующем фермент супероксиддисмутаза-1 (Bosco *et al.*, 2010; Ivanova *et al.*, 2014). На данный момент

известно свыше 170 мутаций этого гена, вызывающих различные формы БАС (<http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>).

На молекулярном уровне мутации приводят к различным изменениям в структуре белка SOD1. Одним из следствий мутации белков супероксиддисмутаза-1 (SOD1) является образование внутриклеточных агрегатов (Bruijn *et al.*, 1998; Deng *et al.*, 2006). Предложено большое количество объяснений агрегации SOD1 (Ross, Poirier, 2004).

Byström с соавт. (2010) показано, что продолжительность жизни пациентов со дня первой диагностики заболевания отрицательно коррелирует ($R = 0,78$) с потерей термостабильности мутантов, носителями которых они были. Однако найденная закономерность хорошо работала только для ограниченного круга мутаций, в то время как эффекты большого количества мутаций, связанных с изменением заряда аминокислотных остатков, не подчинялись построенной зависимости.

Большинство работ (Stathopoulos *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2005; Chiti, Dobson, 2009), посвященных проблеме агрегации мутантных белков, основано на экспериментальных данных по изменению их термодинамической стабильности и упускает анализ отдельных факторов, включающих сети водородных связей, солевые мостики и другие физико-химические, структурные и конформационные характеристики белков.

В настоящей работе сделано предположение, что некоторые мутации могут оказывать пространственно-распределенный эффект на физико-химические и структурные характеристики, определяющие подверженность белка агрегации. При этом происходят локальные разнонаправленные изменения характеристик различных участков пространственной структуры белка, компенсирующие друг друга в масштабе всей структуры. Такой интегральный показатель, как термостабильность, не позволяет выявить закономерности агрегации белков. В частности, патогенные мутации SOD1, влияющие на сеть водородных связей путем разрушения одних и возникновения других связей, могут повышать вероятность перехода из нативной конформации SOD1 в ее патогенную форму.

Для проверки этой гипотезы методом молекулярной динамики (МД) (Alder, Wainwright, 1959) оценена стабильность водородных связей, которая рассчитана как суммарное время существования водородной связи за период моделирования. Нами рассмотрены следующие мутации белка SOD1 человека: Ала4Вал, Цис6Ала, Вал7Глу, Гли12Арг, Гли37Арг, Лей38Вал, Гли41Сер, Гис46Арг, Гис48Гли, Асп76Вал, Асн86Лиз, Ала89Вал, Асп90Ала, Гли93Арг, Вал94Ала, Глу100Гли, Асп101Асн, Цис111Сер, Гли114Ала, Вал118Лей, Асп124Вал, Асп125Гис, Гли127Арг. Показано, что разница во временах существования водородных связей для мутантов и белка дикого типа имеет корреляцию ($R = 0,89$, $p < 0,00001$) с продолжительностью жизни более сильную, чем корреляция, основанная на термостабильности, выявленная в работе Byström с соавт. (2010).

Построена регрессионная модель, предсказывающая продолжительность жизни пациентов по структурным характеристикам мутантов

SOD1. С использованием подхода случайных перестановок показано статистически значимое отличие продолжительности жизни пациентов, предсказанной с помощью регрессии, от продолжительности, ожидаемой по случайным причинам (S).

МЕТОДЫ

Протокол молекулярной динамики

В работе для моделирования в рамках метода молекулярной динамики был применен программный комплекс AMBER 12 (Salomon-Ferrer *et al.*, 2013). В качестве аппаратной платформы выступал гибридный высокопроизводительный кластер ЦКП «Биоинформатика» (<http://bioinformatics.bionet.nsc.ru/>), который содержит ускорители NVIDIA Tesla M2090. При моделировании МД применен следующий набор параметров: шаг интегрирования – 2 фс; радиус отсечения взаимодействий – 10 Å; температура – 300 К; время моделирования – 50 нс. В качестве модели воды использована TIP3P. Кубическая ячейка имела сторону 12 Å и состояла из более чем 20 000 молекул воды, растворенного в ней белка (гомодимер, 154 аминокислотных остатка, PDBID: 2C9V) из 4 376 атомов. В зависимости от заряда мутантного белка в раствор добавляли около 36 ионов Na^+ и 30 ионов Cl^- , что соответствовало концентрации 0,137 моль. Для обеспечения достоверности результатов моделирования каждая траектория повторена 5 раз. В итоге для 24 форм белка получено 120 траекторий, общей протяженностью более 6 мкс.

Белок для нормального функционирования в клетке требует включения в свой состав ионов меди и цинка. Известно, что количество атомов меди ~0,2/димер, а цинка ~1,5/димер (Ayers *et al.*, 2014), это говорит о том, что моделирование может осуществляться без учета иона меди.

Данные по времени жизни пациентов

Данные по временам жизни пациентов, носителей известных мутаций, взяты из базы данных ALS mutation database (Yoshida *et al.*, 2010) и исследования Wang с соавт. (2008). Данные по мутациям Ала89Вал (Sato *et al.*, 2005) и Гли127Арг (Holmøy *et al.*, 2010) были найдены в

отдельных работах. Всего использованы сведения о 18 заменах: Ала4Вал, Вал7Глу, Гли12Арг, Гли37Арг, Лей38Вал, Гли41Сер, Гис46Арг, Гис48Глн, Асп76Вал, Асн86Лиз, Ала89Вал, Асп90Ала, Гли93Арг, Глу100Гли, Асп101Асн, Гли114Ала, Асп125Гис, Гли127Арг. Регрессии построены на основе 16 мутаций, без информации об Ала89Вал и Гли127Арг, поскольку по каждой из этих двух мутаций есть сведения только об одном пациенте-носителе.

Мутация Вал94Ала была промоделирована для проверки гипотезы: замена валина на аланин в области белка, доступной растворителю, не должна влиять на подверженность его агрегации и, следовательно, на возникновение БАС. Время жизни пациентов, носителей мутации Вал94Ала, в литературных источниках не найдено.

Структурные характеристики мутантных форм белка и его дикого типа

Для построения модели, связывающей время жизни пациента, несущего определенную мутацию, и структурные характеристики белка, была создана таблица, состоящая из N строк и M столбцов, где N – количество аминокислотных остатков белка SOD1 ($N = 306$), M – количество исследуемых мутаций ($M = 23$).

В ячейках таблицы содержалось относительное усредненное по пяти траекториям время существования внутримолекулярных водородных связей (НВ), контактирующих с остатком $n \in [1; N]$ из мутанта $m \in [1; M]$. Величина НВ для остатка n рассчитана путем суммирования времен существования водородной связи в траектории МД для всех атомов остатка вне зависимости от того, являются ли они донорами или акцепторами данной связи. Далее проводилась нормировка НВ на всю длину траектории. В таблицу заносилась разность НВ мутантов и белка дикого типа. На следующем шаге были отобраны аминокислотные остатки, которые удовлетворяли следующему критерию: коэффициент корреляции Пирсона между строками таблицы, содержащими НВ, и соответствующими временами жизни пациентов с мутациями из обучающей выборки должен превосходить пороговое значение $R = 0,5$. Величина порога выбрана таким образом, что

можно сказать: большая часть НВ мутантов для выбранной строки коррелирует со временами жизни пациентов. Для построения регрессионного уравнения, связывающего время жизни пациентов и структурные характеристики мутантных SOD1, носителями которых они были, рассчитывали суммарный вектор из выбранных по порогу строк.

Сравнение построенной модели со случайными моделями

В качестве метода статистической проверки построенной модели на корректность был выбран метод рандомизации, использованный на двух этапах: «shuffle» и «permutation». На этапе «shuffle» применен метод, аналогичный методу bootstrap (Efron, 1979), но без возвращения выбранных случайным образом значений.

Все имеющиеся литературные данные были разбиты на обучающую и тестовую выборку в пропорции 2:1. Таким образом, из 16 мутаций с известными литературными данными для построения регрессии использовано 11 мутаций, для проверки предсказания – пять мутаций.

1. Этап «shuffle» заключался в таком построении обучающей выборки, чтобы из имеющихся 16 мутаций выбрать случайным образом две трети, то есть 11. Тестовая выборка составлена из оставшихся пяти мутаций. Столбцы таблицы с НВ переставлялись в соответствии с совершенной выборкой мутаций.

2. Этап «permutation» представлял собой случайное перемешивание (permutation) элементов вектора из 16 элементов, соответствующих литературным данным о времени жизни пациентов с данными мутациями. При этом таблица со значениями НВ не изменялась. Пропорции для обучающей и тестовой выборки аналогичны предыдущему этапу: 11/5.

Для каждой выборки из «shuffle» и «permutation» находилась свой набор строк таблицы с параметрами НВ, коррелирующими с соответствующей строкой времен жизни пациентов.

После для обоих этапов происходило построение распределений величины S – среднего квадрата разности между вектором длины 5, содержащим предсказанные времена жизни, и литературными данными для соответствующих пяти мутаций из тестовой выборки. Было

проведено 10^5 выборок (shuffle) и столько же перемешиваний (permutation). Полученные распределения величины S сравнивали с применением непараметрических критериев χ^2 , Краскела – Уоллиса (Kruskal, Wallis, 1952) и Колмогорова – Смирнова (Kolmogorov, 1933; Smirnov, 1948). Данный подход использован для оценки степени случайности предсказаний: в случае если распределение S , полученное на этапе «shuffle», не отличается в смысле упомянутых выше критериев от S на этапе «permutation», то это свидетельствует в пользу случайности предсказаний.

Построение регрессии

В случае достоверного отличия распределений S , полученных на предыдущем шаге для построения финальной регрессии и последующего предсказания времени жизни пациентов, использован весь набор известных литературных данных, состоящий из 16 мутаций. Таким образом, предсказания были сделаны для оставшейся доли мутаций, для которых нет литературных данных о времени жизни пациентов: Цис6Ала, Ала89Вал, Вал94Ала, Цис111Сер, Вал118Лей, Асп124Вал, Гли127Арг.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом шаге анализа осуществлено моделирование молекулярной динамики 24 димеров SOD1 для расчета сетей водородных связей, образованных в структуре анализируемых белков и оценки их характеристик. В качестве основной характеристики водородной связи рассчитывалась ее стабильность как суммарное время существования в течение моделирования МД, нормированное на всю ее длительность. Для проверки качества оценки стабильности

было установлено, что выбранная длительность моделирования в 50 нс достаточна для выхода этого показателя на постоянный уровень.

Перед построением финальной регрессии методом случайного перемешивания была проанализирована достоверность построенной модели, используемой для предсказания времени жизни пациентов (см. Материалы и методы). Показано статистически значимое отличие наблюдаемой величины S от ожидаемой по случайным причинам (см. таблицу), отсюда следует, что результаты предсказаний модели взяты из генеральной совокупности, достоверно отличной от случайной. Из рис. 1 видно, что форма кривых для обоих распределений различна, и при этом график для распределения S на этапе «permutation» расположен правее графика S для «shuffle». Величина этого сдвига косвенно отражена в значениях критериев сравнения. Таким образом, предсказания модели также в среднем лучше случайных предсказаний.

Таблица НВ содержит количество строк на порядок больше числа столбцов. Следовательно, при построении на ее основе регрессии может возникнуть проблема переобучения. Настоящий шаг в том числе дает возможность проверить, имеет ли место проблема: если бы переобучение состоялось, то распределения S для обоих этапов были бы не отличимы друг от друга и регрессия оказалась бы недостоверной. Как видно (таблица, рис. 1), этого не произошло.

После успешного анализа достоверности модели была построена финальная регрессия. Коэффициент линейной корреляции Пирсона между изменением стабильности водородных связей, вызванным мутациями в белке SOD1, и временем жизни пациентов-носителей этих мутаций составил $R = 0,8877$, $p = 0,0000045$. Построенная модель линейной регрессии (время

Значимость различия между ожидаемым по случайным причинам и наблюдаемым распределением величины S

| Критерий | Критическое значение критерия | Уровень значимости отличий |
|------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| χ^2 | 4 117 | $p < 0,000001$ |
| Краскела – Уоллиса | 796 | $p < 4 \times 10^{-175}$ |
| Колмогорова – Смирнова | 0,2064 | $p < 5 \times 10^{-186}$ |

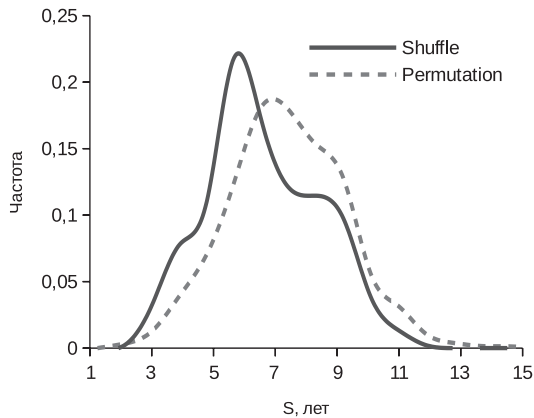


Рис. 1. Распределения наблюдаемого (сплошная линия) и ожидаемого по случайным причинам (пунктирная линия) значений S при проверке достоверности модели. Графики получены сглаживанием сплайн-кривой между каждой из 32 точек гистограммы.

жизни = $7,04 \times HB + 4,19$) позволила предсказать времена жизни для двух пациентов-носителей мутаций Ала89Вал и Гли127Арг (рис. 2).

В работе Holmøy с соавт. (2010) приведены сведения о времени жизни пациента, носителя мутации Гли127Арг, составившем 7 мес. Как видно из рисунка, предсказания хорошо согласуются с данным фактом. Также имелась информация об одном пациенте с мутацией Ала89Вал (Sato *et al.*, 2005). Заболевание у этого пациента длилось около 6 лет, и на момент публикации этих авторов пациент был жив. Согласно предсказаниям модели, мутация Ала89Вал занимает промежуточное положение по степени тяжести заболевания, что согласуется с описанными выше фактами. Предсказания также были сделаны еще для пяти мутаций (Цис6Ала, Вал94Ала, Цис111Сер, Вал118Лей, Асп124Вал), для которых нет литературных данных о времени жизни пациентов. Оказалось, что все эти мутации распределились от 1,8 до 12,7 года на шкале времени жизни пациентов. Рисунок 3 демонстрирует чувствительные к мутациям аминокислотные остатки, обнаруженные на основе анализа модели. На этапе построения финальной регрессии выявлено 11 аминокислотных остатков, для которых значение HB коррелирует со временем жизни пациентов.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы предположили, что как стабилизация, так и дестабилизация структуры белка влияют на увеличение вероятности нахождения его в метастабильном патогенном состоянии (Ross, Poirier, 2004) и, следовательно, на подверженность белка агрегации (Bruijn *et al.*, 1998). В частности, структура может стабилизироваться за счет появления новых водородных связей в структуре мутанта, отсутствующих в белке дикого типа. Вновь возникшие водородные связи, в свою очередь, могут стабилизировать белок в патогенной конформации, увеличивая его способность образовывать агрегаты.

На поверхности свободной энергии в пространстве конформационных состояний белка такие мутации могут понижать локальный минимум энергии, соответствующий патогенной конформации белка. Разрушение водородных связей в результате мутаций может снижать потенциальный барьер на поверхности свободной энергии между нативным и патогенным состояниями белка, что повышает вероятность перехода между этими двумя состояниями.

Анализ изменения стабильности индивидуальных водородных связей в результате мутаций позволил нам рассчитать динамику и перестройку сети водородных связей, характеристики которой имели высокую корреляцию с продолжительностью жизни пациентов. Ранее показано, что в процессе динамики белков происходит постоянный разрыв первичных водородных связей и создание альтернативных, что предотвращает резкое увеличение конформационной энтропии при повышении температуры и, следовательно, поддерживает стабильность белка (Khechinashvili *et al.*, 2006). Воздействие таких дестабилизирующих факторов по-разному влияет на водородные связи, образованные между сближенными и удаленными друг от друга в первичной структуре аминокислотными остатками (Nisius, Grzesiek, 2012).

Согласно нашим расчетам (рис. 3), в частности, мутации в белке SOD1 оказывают стабилизирующее влияние на водородные связи, образованные аминокислотным остатком Гис120, а для водородных связей остатка Сер142 этот эффект является дестабилизирующим. Извест-

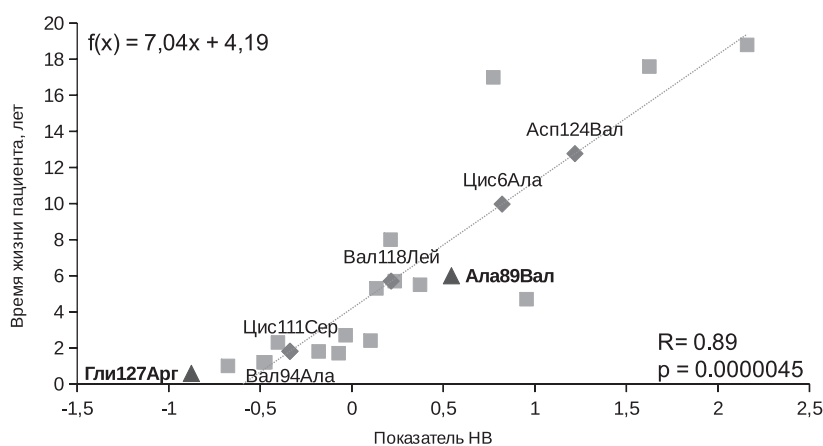


Рис. 2. Регрессионная зависимость между показателем NB в мутантах белка SOD1 и временем жизни пациентов-носителей этих мутаций. Квадратами (■) показаны мутантные белки, входящие в обучающую выборку. Треугольниками (▲) обозначены предсказания времени жизни для двух пациентов-носителей мутаций Ала89Вал и Гли127Арг. Ромбами (◆) отмечены предсказания для мутаций Цис6Ала, Вал94Ала, Цис111Сер, Вал118Лей, Асп124Вал.

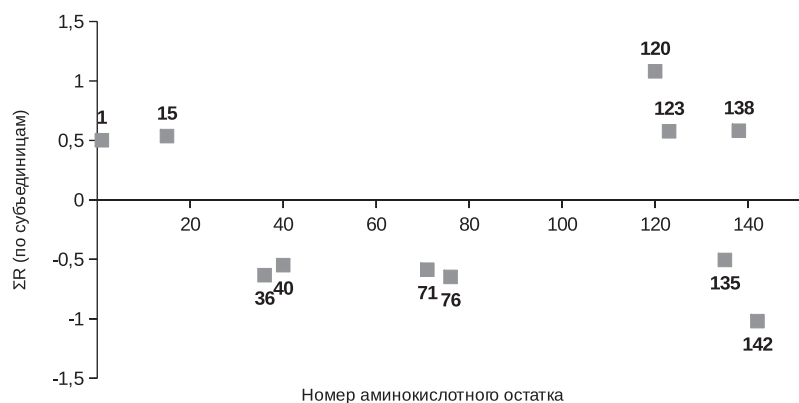


Рис. 3. Профиль корреляций изменения стабильности индивидуальных водородных связей со временем жизни пациентов. По оси абсцисс отложены номера аминокислотных остатков в структуре мономера, образующих водородные связи. По оси ординат отложена сумма коэффициентов корреляции для аминокислотных остатков по обеим субъединицам белка.

но, что Гис120 непосредственно участвует в связывании иона меди, необходимого для ферментативной активности SOD1 (Nagano, 2012). Примером отрицательной корреляции между стабильностью водородных связей в мутантных белках SOD1 и продолжительностью жизни пациентов, носителей этих мутаций, может служить сеть водородных связей, образуемых с участием остатка Гис71. Этот остаток связывает ион Zn, что стабилизирует структуру SOD1 (Arnesano *et al.*, 2004; Ding, Dokholyan, 2008).

Известно, что остатки 38–40 стабилизируют β-бочонок (Deng *et al.*, 1995). При этом Лей38 имеет ван-дер-ваальсовый контакт с Гис43, ко-

торый, в свою очередь, связан с каталитически важным остатком Арг143 (Muneeswaran *et al.*, 2014). В работе Wright с соавт. (2013) выделены два района (1–30 и 90–120), имеющие особое значение для агрегации мутантных белков SOD1. Оказалось, что в этих районах стабильность водородных связей коррелирует с продолжительностью жизни пациентов (рис. 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами выдвинута гипотеза о влиянии как стабилизации, так и дестабилизации структуры белка на увеличение веро-

ятности нахождения белка в промежуточном, метастабильном состоянии и, следовательно, на подверженность его агрегации. Показано, что в локальной дестабилизации белка чаще участвуют те аминокислотные остатки, которые связаны с выполняемой ими той или иной функцией. Выявлена важная роль водородных связей в увеличении вероятности локальной дестабилизации его структуры. В дальнейшем планируется расширить список исследуемых мутаций белка SOD1.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана междисциплинарными интеграционными проектами СО РАН № 130, 39, 47, а также проектом фундаментальных исследований СО РАН VI.61.1.2.

ЛИТЕРАТУРА

- Alavi A., Nafissi S., Rohani M. *et al.* Genetic analysis and SOD1 mutation screening in Iranian amyotrophic lateral sclerosis patients // *Neurobiol. Aging*. 2013. V. 34. No. 5. P. 1516.e1–1516.e8.
- Alder B.J., Wainwright T.E. Studies in Molecular Dynamics. I. General Method // *J. Chem. Phys.* 1959. V. 31. No. 2. P. 459.
- Arnesano F., Banci L., Bertini I. *et al.* The unusually stable quaternary structure of human Cu, Zn-superoxide dismutase 1 is controlled by both metal occupancy and disulfide status // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. No. 46. P. 47998–48003.
- Ayers J., Lelie H., Workman A. *et al.* Distinctive features of the D101N and D101G variants of superoxide dismutase 1; two mutations that produce rapidly progressing motor neuron disease // *J. Neurochem.* 2014. V. 128. No. 2. P. 305–314.
- Bosco D.A., Morfini G., Karabacak N.M. *et al.* Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS // *Nat. Neurosci.* 2010. V. 13. No. 11. P. 1396–1403.
- Brown R.H. Amyotrophic lateral sclerosis. Insights from genetics // *Arch. Neurol.* 1997. V. 54. No. 10. P. 1246–1250.
- Bruijn L.I., Houseweart M.K., Kato S. *et al.* Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1 // *Science*. 1998. V. 281. No. 5384. P. 1851–1854.
- Byström R., Andersen P.M., Grubner G., Oliveberg M. SOD1 mutations targeting surface hydrogen bonds promote amyotrophic lateral sclerosis without reducing apo-state stability // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. No. 25. P. 19544–19552.
- Chiti F., Dobson C.M. Amyloid formation by globular proteins under native conditions // *Nat. Chem. Biol.* 2009. V. 5. No. 1. P. 15–22.
- Deng H.X., Tainer J.A., Mitsumoto H. *et al.* Two novel SOD1 mutations in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis // *Hum. Mol. Genet.* 1995. V. 4. No. 6. P. 1113–1116.
- Deng H.X., Shi Y., Furukawa Y. *et al.* Conversion to the amyotrophic lateral sclerosis phenotype is associated with intermolecular linked insoluble aggregates of SOD1 in mitochondria // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006. V. 103. No. 18. P. 7142–7147.
- Ding F., Dokholyan N. V. Dynamical roles of metal ions and the disulfide bond in Cu, Zn superoxide dismutase folding and aggregation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. V. 105. No. 50. P. 19696–19701.
- Efron B. Bootstrap methods: another look at the jackknife // *Ann. Stat.* 1979. V. 7. No. 1. P. 1–26.
- Eisen A., Mezei M.M., Stewart H.G. *et al.* SOD1 gene mutations in ALS patients from British Columbia, Canada: clinical features, neurophysiology and ethical issues in management // *Amyotroph. Lateral Scler.* 2008. V. 9. No. 2. P. 108–119.
- Haidet-Phillips A.M., Hester M.E., Miranda C.J. *et al.* Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons // *Nat. Biotechnol.* 2011. V. 29. No. 9. P. 824–828.
- Holmøy T., Wilson J.A., von der Lippe C. *et al.* G127R: A novel SOD1 mutation associated with rapidly evolving ALS and severe pain syndrome // *Amyotroph. Lateral Scler.* 2010. V. 11. No. 5. P. 478–480.
- Ivanova M.I., Sievers S.A., Guenther E.L. *et al.* Aggregation-triggering segments of SOD1 fibril formation support a common pathway for familial and sporadic ALS // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014. V. 111. No. 1. P. 197–201.
- Khechinashvili N.N., Fedorov M.V., Kabanov A.V. *et al.* Side chain dynamics and alternative hydrogen bonding in the mechanism of protein thermostabilization // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2006. V. 24. No. 3. P. 255–262.
- Kolmogorov A. Sulla determinazione empirica di una legge di distribuzione // *G. dell'Istituto Ital. degli Attuari.* 1933. V. 4. P. 1–11.
- Kruskal W.H., Wallis W.A. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis // *J. Am. Stat. Assoc.* 1952. V. 47. No. 260. P. 583–621.
- Muneeswaran G., Kartheeswaran S., Muthukumar K. *et al.* Comparative structural and conformational studies on H43R and W32F mutants of copper-zinc superoxide dismutase by molecular dynamics simulation // *Biophys. Chem.* 2014. V. 185. P. 70–78.
- Nagano S. Oxidative Modifications of Cu, Zn-Superoxide Dismutase (SOD1)—The Relevance to Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) // *Amyotrophic Lateral Sclerosis. InTech*. 2012. P. 301–312.
- Nisius L., Grzesiek S. Key stabilizing elements of protein structure identified through pressure and temperature perturbation of its hydrogen bond network // *Nat. Chem.* 2012. V. 4. No. 9. P. 711–717.
- Ross C.A., Poirier M.A. Protein aggregation and neurodegenerative disease // *Nat. Med.* 2004. V. 10 Suppl. P. S10–S17.

- Salomon-Ferrer R., Case D.A., Walker R.C. An overview of the Amber biomolecular simulation package // *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 2013. V. 3. No. 2. P. 198–210.
- Sato T., Nakanishi T., Yamamoto Y. *et al.* Rapid disease progression correlates with instability of mutant SOD1 in familial ALS // *Neurology.* 2005. V. 65. No. 12. P. 1954–1957.
- Smirnov N. Table for estimating the goodness of fit of empirical distributions // *Ann. Math. Stat.* 1948. V. 19. P. 279–281.
- Stathopoulos P.B., Rumfeldt J.A.O., Scholz G.A. *et al.* Cu/Zn superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis show enhanced formation of aggregates in vitro // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003. V. 100. No. 12. P. 7021–7026.
- Wang Q., Johnson J.L., Agar N.Y.R., Agar J. N. *et al.* Protein aggregation and protein instability govern familial amyotrophic lateral sclerosis patient survival // *PLoS Biol.* 2008. V. 6. No. 7. P. e170.
- Wright G.S.A., Antonyuk S.V., Kershaw N.M. *et al.* Ligand binding and aggregation of pathogenic SOD1 // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. P. 1758.
- Yoshida M., Takahashi Y., Koike A. *et al.* A mutation database for amyotrophic lateral sclerosis // *Hum. Mutat.* 2010. V. 31. No. 9. P. 1003–1010.

STRUCTURAL AND DYNAMIC PROPERTIES OF MUTANTS OF THE SOD1 PROTEIN ASSOCIATED WITH AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

N.A. Alemasov, N.V. Ivanisenko, V.A. Ivanisenko

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: alemasov@bionet.nsc.ru

Summary

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease, which affects motor neurons in the brain and spinal cord and leads to patients' death. One of the causes of motor neuron degeneration and death is the formation of intracellular protein aggregates formed by a mutant SOD1 protein. Recently, it has been shown that the survival time of ALS patients with specific mutation in SOD1 gene inversely correlates with thermodynamic stability of the SOD1 mutant protein. In the present paper, we hypothesize that mutant SOD1 aggregation can be facilitated by not only destabilization due to hydrogen bonds disruption but also by formation of new hydrogen bonds, which can stabilize intermediate "pathogenic" conformations of the mutant SOD1 protein. Molecular dynamics simulations were conducted to estimate frequencies of hydrogen bond occurrence in the protein structure. It was shown that the regression model based on frequencies of hydrogen bond occurrence significantly better correlated with patients' survival time ($R = 0.89, p < 0.00001$) than the estimation based on thermodynamic stability analysis of mutant SOD1 proteins.

Key words: SOD1, neurodegenerative diseases, molecular dynamics, hydrogen bonds, prediction, survival time.