

Эффективность удаления метилированных повреждений из ДНК природными вариантами ДНК-диоксигеназы человека ABH2

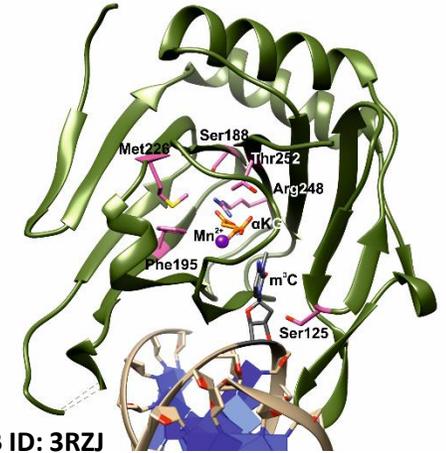
Давлетгильдеева А. Т.¹, Колесникова В. А.², Сагалакова В. В.¹, Тюгашев Т. Е.¹, Джоу М.², Кузнецов Н. А.^{1,2}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского Отделения Российской Академии Наук, 630090, Новосибирск, проспект академика Лаврентьева 8, e-mail: davletgildeeva@1bio.ru

² Новосибирский Государственный Университет, 630090, Новосибирск, Пирогова 1

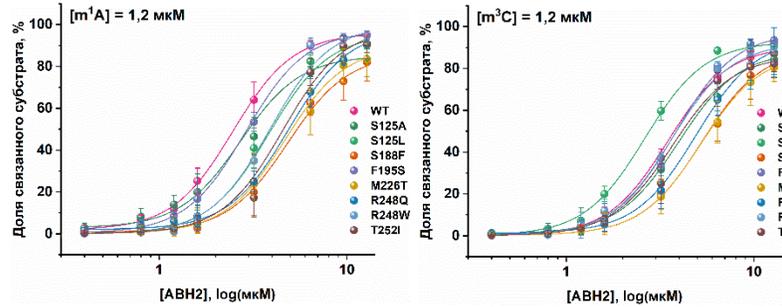


Расположение отобранных аминокислотных остатков в белке



PDB ID: 3RZJ

Определение константы диссоциации комплекса фермент-ДНК



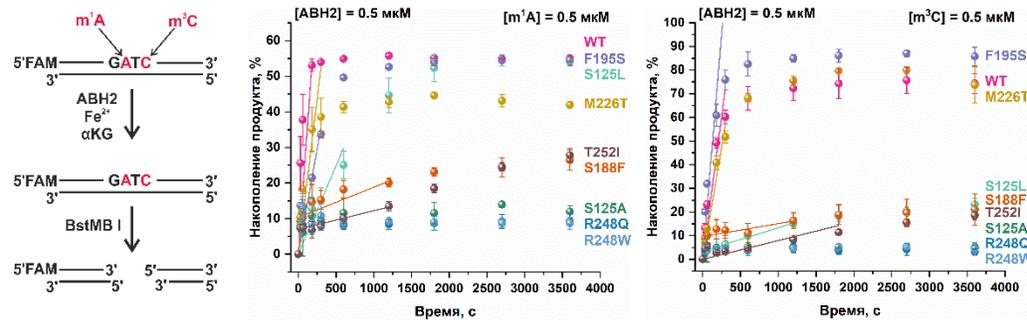
Зависимость доли связанной ДНК, содержащей m¹A или m³C, от концентрации фермента ABH2 с аппроксимацией полученных данных.

	K _d , мкМ	
	m ¹ A	m ³ C
WT	2.5 ± 0.1	3.5 ± 0.1
S125A*	2.7 ± 0.2	4.0 ± 0.3
S125L	3.8 ± 0.4	2.6 ± 0.3
S188F	4.8 ± 0.6	5.3 ± 0.4
F195S	2.9 ± 0.1	3.8 ± 0.1
M226T	4.7 ± 0.4	5.2 ± 0.3
R248Q	4.9 ± 0.2	4.9 ± 0.2
R248W	3.9 ± 0.4	3.6 ± 0.6
T252I	4.6 ± 0.5	3.7 ± 0.4

Константы диссоциации (K_d), установленные путем обработки экспериментальных данных с использованием уравнения Хилла.

$$F = F_u + \frac{F_b - F_u}{1 + \left(\frac{K_d}{E_0}\right)^h}$$

Анализ каталитической активности ферментов



Зависимость уровня накопления продуктов реакции деметилирования от времени. Начальная скорость реакции оценивалась с помощью линейной аппроксимации. [Фермент] = [ДНК-субстрат] = 0.5 мкМ. T = 37 °C.

	k _{obs} , с ⁻¹	
WT	4.1 ± 0.3	m ¹ A
S125L	0.9 ± 0.3	
S188F	0.2 ± 0.1	
F195S	1.8 ± 0.2	
M226T	4 ± 1	
T252I	0.12 ± 0.05	m ³ C
WT	4.3 ± 0.4	
S125L	0.014 ± 0.004	
S188F	0.13 ± 0.05	
F195S	7.2 ± 0.5	
M226T	5 ± 1	
T252I	0.15 ± 0.05	

Наблюдаемые константы скорости k_{obs}, характеризующие каталитическую активность ABH2 WT и его активных полиморфных вариантов S125L, S188F, F195S, M226T и T252I по отношению к ДНК-субстратам, содержащим m¹A или m³C. Значения k_{obs} определяли по приведенному ниже уравнению, где V₀ – начальная скорость, E₀ и S₀ – общие концентрации фермента и ДНК, а K_d – равновесная константа диссоциации.

$$k_{obs} = 2V_0 \left(E_0 + S_0 + K_d - \sqrt{(E_0 + S_0 + K_d)^2 - 4E_0S_0} \right)^{-1}$$

Среди более чем 2,5 тыс. известных SNP гена ABH2 человека из базы данных NCBI был отобран 231 вариант, находящийся в экзонной области и приводящий к миссенс-мутациям. 33 SNP были отобраны для дальнейшего анализа на основании предсказания негативных последствий замен, вызванных этими SNP, большинством (больше 8) из 11 использованных программ: SIFT, PolyPhen2, CADD, REVEL, MetaLR, AlphaMissense, PROVEAN, WS-SNPs&GO, PANTHER, PredictSNP и PhD-SNP. В данной работе представлена биохимическая характеристика 7 полиморфных вариантов из выбранного списка.