

Определение влияния природных однонуклеотидных полиморфизмов на ферментативные свойства алкиладенин-ДНК-гликозилазы человека AAG биоинформатическими и экспериментальными методами

Кладова О. А.¹, Бакман А. С.¹, Тюгашев Т. Е.¹, Кузнецова А. А.¹

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

Стратегия поиска однонуклеотидных мутаций (SNP), способных негативно влиять на функционирование фермента AAG

Анализ базы данных NCBI, отбор SNP находящихся в экзонной области и приводящих к миссенс-мутациям (смена класса аминокислотного остатка в фермента)

Всего было получено 376 подходящих SNP

Ранжирование отобранных SNP по степени возможного негативного влияния на функционирование AAG с использованием программ: SIFT, PolyPhen-2, CADD, Mutation taster, MetaRNN и Provean

Всего было отобрано 153 SNP, имеющих высокую вероятность негативного влияния

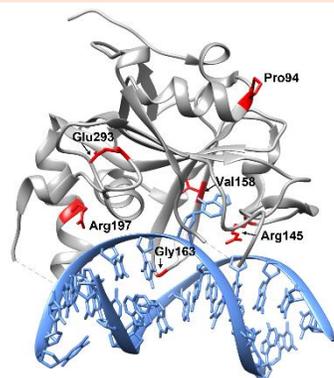
Проверка встречаемости отобранных SNP в базах данных онкологических образцов COSMIC, cBioPortal и Национального института рака

Всего было обнаружено 18 подходящих SNP

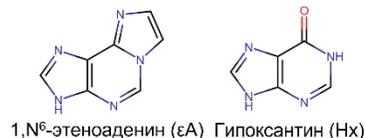
Отбор SNP для дальнейшей биохимической характеристики на основании анализа структуры AAG

Были выбраны 6 полиморфных вариантов: P94L, R145H, V158M, G163S, R197C, E293K

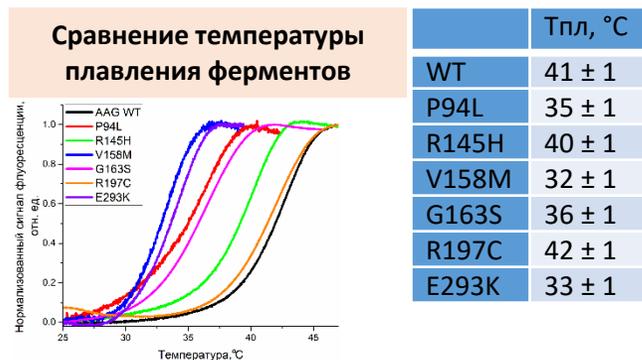
Расположение отобранных аминокислотных остатков в белке



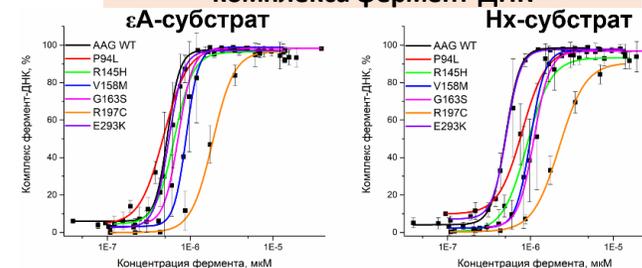
Использованные в работе ДНК-субстраты



Сравнение температуры плавления ферментов

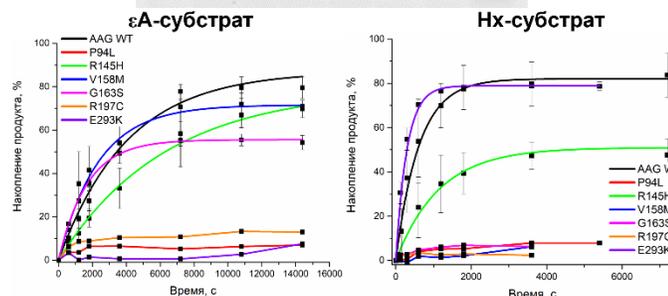
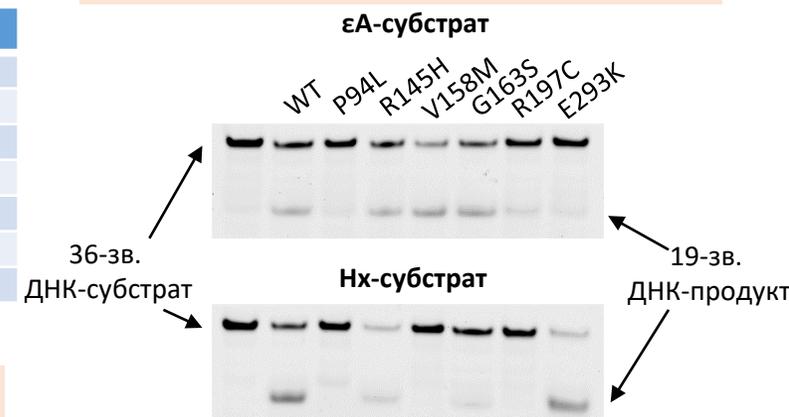


Определение константы диссоциации комплекса фермент-ДНК



	εA-субстрат K_d , мкМ	Hx-субстрат K_d , мкМ
WT	0.53 ± 0.07	0.50 ± 0.03
P94L	0.48 ± 0.03	0.8 ± 0.06
R145H	0.65 ± 0.08	0.91 ± 0.06
V158M	0.89 ± 0.01	1.0 ± 0.2
G163S	0.72 ± 0.09	1.10 ± 0.07
R197C	1.87 ± 0.08	2.2 ± 0.1
E293K	0.55 ± 0.08	0.51 ± 0.03

Анализ каталитической активности ферментов



	εA-субстрат k_{obs} , с ⁻¹	Hx-субстрат k_{obs} , с ⁻¹
WT	$(2.5 ± 0.4) × 10^{-4}$	$(16 ± 2) × 10^{-4}$
P94L	н/а	н/а
R145H	$(1.6 ± 0.1) × 10^{-4}$	$(9 ± 1) × 10^{-4}$
V158M	$(4.3 ± 0.4) × 10^{-4}$	н/а
G163S	$(5.9 ± 0.1) × 10^{-4}$	н/а
R197C	н/а	н/а
E293K	н/а	$(34 ± 2) × 10^{-4}$