

УДК 616-002.5

АПУРИНОВАЯ/АПИРИМИДИНОВАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗНАЯ РЕПАРАЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТА MtbXthA У ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Абельденов С.К.¹, Раманкулов Е.М.¹, Сапарбаев М.К.², Хасенов Б.Б.¹

¹Национальный центр биотехнологии

ул. Валиханова, 13/1, Астана, 010000, Казахстан

²CNRS, UMR 8200, Gustave Roussy, F-94805 Villejuif Cedex, France

abeldenov@gmail.com

АБСТРАКТ

Туберкулез остается одной из самых главных причин смертности в мире от бактериальной инфекции, что связано с появлением в последние годы штаммов *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью. Важную роль в поддержании геномной стабильности возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* играют ферменты репарации ДНК, в частности АП (апуриновые/апириимидиновые) эндонуклеазы. АП эндонуклеазы являются ключевыми ферментами репарации ДНК, вовлеченных в удаление безосновных сайтов. При возникновении повреждений ДНК специфичные ДНК гликозилазы удаляют поврежденное основание и образуется АП сайт. АП эндонуклеазы образуют разрывы в фосфодиэфирной связи в месте АП сайта и вырезают сахаро-фосфатный остаток. Одной из таких АП эндонуклеаз является фермент репарации MtbXthA. В данной работе исследована АП эндонуклеазная репарационная активность фермента. С помощью стандартных методов генетической инженерии был клонирован, экспрессирован и очищен рекомбинантный белок MtbXthA. Установлено, что АП эндонуклеазная активность MtbXthA зависит от ионов Mg²⁺ и Mn²⁺. Продемонстрировано, что максимальная АП эндонуклеазная активность MtbXthA проявляется при температуре +37°C. Отмечено, что MtbXthA оказался очень чувствительным к ионной силе. Так, 10-кратное ингибирование реакции наблюдалось при использовании 100 мМ хлорида калия. Оптимальным для MtbXthA является слабокислое значение pH 6,0-6,5.

Ключевые слова: репарация ДНК, туберкулез, АП эндонуклеазы, генетическая инженерия, геномная стабильность.

APURINIC/APYRIMIDINIC ENDONUCLEASE REPAIR ACTIVITY OF MtbXthA REPAIR ENZYME IN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*, THE CAUSATIVE AGENT OF *TUBERCULOSIS*

Abeldenov S.K.¹, Ramankulov E.M.¹, Saparbaev M.K.², Khassenov B.B.¹

¹National Center for Biotechnology

13/1, Valikhanov str., Astana, 010000, Kazakhstan

²CNRS, UMR 8200, Gustave Roussy, F-94805 Villejuif Cedex, France

abeldenov@gmail.com

ABSTRACT

Tuberculosis is one of the leading causes of mortality worldwide due to a bacterial infection, which is associated with the emergence of multi-drug resistant strains in recent years. DNA repair enzymes, particularly AP (apurinic/apyrimidinic (AP)) endonucleases play an important role in maintaining genomic stability of *Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of tuberculosis. AP endonucleases are key DNA repair enzymes that are involved in the removal of abasic sites. In case of DNA damage, specific DNA glycosylases remove the damaged bases and form the AP site. AP endonucleases form breaks in the phosphodiester bond at the AP site and cut the sugar-phosphate residue. In this work, activity of the AP endonuclease repair enzyme, MtbXthA was studied.

Recombinant MtbXthA protein was cloned, expressed, and purified using standard methods of genetic engineering. It was established that the AP endonuclease activity of MtbXthA depends on the ions Mg^{2+} and Mn^{2+} . Maximum AP endonuclease activity of MtbXthA was demonstrated at 37°C. It was noted that MtbXthA was very sensitive to ionic strength, since a 10-fold inhibition of the reaction was observed using 100 mM potassium chloride. Optimal pH for MtbXthA activity was slightly acidic (pH 6.0-6.5).

Keywords: DNA repair, tuberculosis, AP endonucleases, genetic engineering, genomic stability.

ВВЕДЕНИЕ

Туберкулез остается одной из главных глобальных проблем здравоохранения. В 2013 году было обнаружено 9 миллионов новых случаев и 1,5 миллиона человека умерло от заболевания за этот период [1]. Вследствие долгой ко-эволюции патогена и человека [2, 3, 4, 5] у микобактерии выработались эффективные механизмы устойчивости к окислительному стрессу, «фабриками» которого являются макрофаги [6]. Из-за локализации микобактерий в макрофагах их ДНК постоянно подвергается воздействию радикалов как внутриклеточного, так и внеклеточного происхождения [7]. Большая часть повреждений репарируется, не удаленные повреждения в свою очередь могут привести к мутациям [8], ряд из которых, в свою очередь, могут оказаться полезными для выживания патогена [9].

Известно, что АП эндонуклеазы являются ферментами, участвующими в пути эксцизионной репарации оснований [10]. При возникновении повреждений ДНК специфичные ДНК гликозилазы удаляют поврежденное основание и образуется апуриновый/апиримидиновый сайт. АП эндонуклеазы образуют разрывы в фосфодиэфирной связи в месте АП сайта и вырезают сахаро-фосфатный остаток, вследствие чего происходит дальнейшее восстановление поврежденной нити с помощью ДНК полимеразы и ДНК лигазы (рисунок 1).

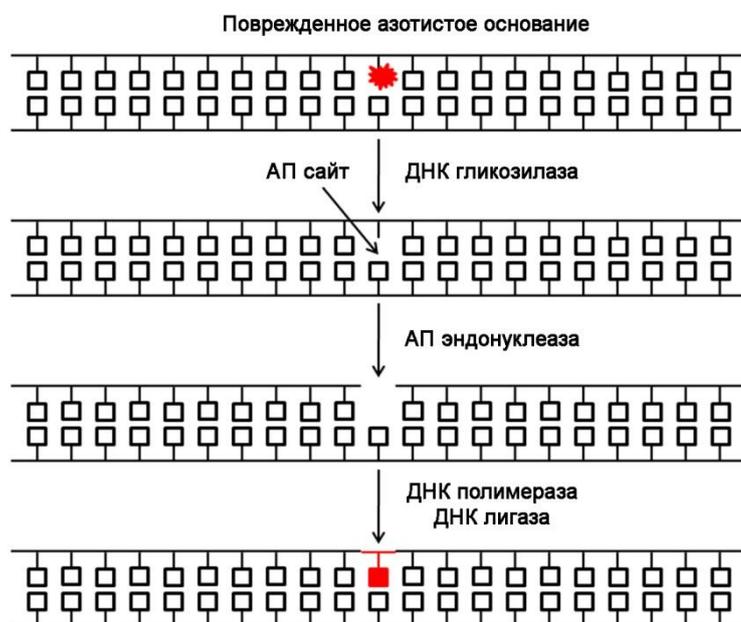


Рис. 1. Схематическое представление пути эксцизионной репарации оснований

Fig. 1. Schematic representation of the base excision repair pathway

Одними из хорошо известных ДНК повреждающих агентов являются реактивные формы кислорода и реактивные формы азота, генерируемые в результате клеточного

метаболизма [10]. Многочисленные исследования показали, что *Mycobacterium tuberculosis* успешно проявляет устойчивость к иммунному ответу человеческого организма, в частности, поддерживает нейтральный уровень pH внутри бактерии при кислом значении pH в окружающей среде, проводит нейтрализацию реактивных форм кислорода и азота и эффективно репарирует повреждения ДНК, вызванные данными молекулами [6]. Соответственно, можно предположить, что микобактерии должны обладать надежными механизмами репарации ДНК. В результате полногеномного секвенирования *Mycobacterium tuberculosis* установлено, что патоген не имеет в своем составе ферментов, участвующих в механизме удаления ошибочно спаренных нуклеотидов (mismatch repair pathway) [11]. Тем не менее, находясь в постоянной конфронтации с иммунной системой человека, геном микобактерий достаточно стабилен, что проявляется в стабильности частоты мутации [9]. В связи с чем возникает вопрос, каким образом поддерживается стабильность генома микобактерий и какова роль ферментов репарации, участвующих в механизме эксцизионной репарации поврежденных оснований.

Целью данной работы являлось изучение АП эндонуклеазной активности фермента репарации ДНК *Mycobacterium tuberculosis* XthA. Данный аспект включает в себя получение рекомбинантного XthA в клетках *Escherichia coli* и определение АП эндонуклеазной активности фермента в зависимости от температуры, pH, ионной силы реакционного буфера и наличия в нем ионов металлов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы, ДНК, плазмиды и реагенты

Штаммы *E. coli* и плазмидные вектора были использованы из лабораторной коллекции. Использовались ферменты рестрикции и T4 ДНК-лигаза производства Thermo Scientific (США). Для сборки экспрессионной конструкции был использован плазмидный вектор pET-28c(+) (Novagen, Великобритания). Для амплификации гена-мишени была использована высокоточная Phusion High-Fidelity ДНК-полимераза (Thermo Scientific, США). Отбор колоний трансформантов проводили с помощью метода ПЦР-скрининга с использованием рекомбинантной *Taq* ДНК полимеразы, полученной в лаборатории [12]. Двухэтапную очистку рекомбинантного белка проводили на предупакованной колонке HisTrap HP производства GE Healthcare (США) объемом 1 мл и гепариновой колонке HiTrap Heparin HP. Эквilibрирование колонки, загрузку лизата и элюцию целевого белка осуществляли в соответствии с описанной методикой [13, 14].

Экспрессия и очистка MtbXthA

Амплифицированный ген-мишень *xthA* из *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Rv0427c) был клонирован в вектор pET-28c(+) по сайтам рестрикции *NcoI* и *NotI* таким образом, чтобы рекомбинантный MtbXthA имел С-концевую гексагистидиновую последовательность. Интегрированная в плазмиду вставка была секвенирована и анализирована на соответствие с требуемой последовательностью банка геномных данных с использованием программного обеспечения Vector NTI Advance (TM) 11,0 (Invitrogen, США).

Полученным вектором pET-28c(+)/MtbXthA были трансформированы компетентные клетки штамма *E. coli* ArcticExpress(DE3)RP. Колонию-трансформант культивировали в бульоне Лурия-Бертани с канамицином (50 мкг/мл). В середине логарифмической фазы роста бактериальной массы ($OD_{600}=0,6$) проводили активацию T7 промотора добавлением изопропил- β -D-1-тио-галактопиранозид (ИПТГ) в конечной концентрации 1 мМ. Культуру инкубировали с ИПТГ в течение 16 часов при комнатной температуре и встряхивании 100 об/мин. Клетки собирали центрифугированием при угловом ускорении

6000xg, в течение 7 минут и при температуре +4°C. Все этапы очистки проводили при +4°C. Бактериальный лизат суспендировали в буфере 20 mM NaCl, 40 mM HEPES-NaOH (pH 7,5) с добавлением коктейля ингибиторов протеаз (Roche Diagnostics, Швейцария). Клеточную суспензию лизировали с использованием пресса Френча при 124 МПа. От клеточного дебриса лизаты освобождали центрифугированием при 40000xg в течение 60 мин при +4°C. Концентрацию NaCl в осветленном лизате увеличивали до 500 mM, добавляли имидазол до концентрации 20 mM и наносили на колонку HisTrap HP, активированную ионами Ni²⁺. Методом линейного градиента по имидазолу от 20 mM до 500 mM проводили фракционирование элюатов с помощью хроматографа FPLC АКТА Purifier 10. Элюированные фракции, содержащие рекомбинантный белок, объединяли и наносили на гепариновую колонку HiTrap Heparin HP. Связанные белки элюировали в градиенте 50-600 mM хлорида калия. Хранение очищенных образцов MtbXthA осуществляли при -20°C в 50% глицерине. Гомогенность белка проверяли с помощью 12% ПААГ-ДСН.

Определение АП эндонуклеазной активности

Для детекции АП эндонуклеазной активности были использованы олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие радиоактивную метку. Олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие модифицированные остатки, и их комплементарные олигонуклеотиды были приобретены у компании Eurogentec (Seraing, Бельгия). Они включали в себя: THF-RT 30-мер d(TGACTGCATAXGCATGTAGACGATGTGCAT), где X – тетрагидрофуран (THF, аналог бесосновного сайта (abasic site) и RT-C 30-мерный комплементарный олигонуклеотид, содержащий dC напротив повреждения.

Радиоактивное мечение олигонуклеотидов было осуществлено с 5' конца с помощью T4 полинуклеотид киназы с отсутствием 3' фосфатазной активности (New England Biolabs) в присутствии γ [³²P] АТФ (3000 Ci/ммоль) (PerkinElmer) в соответствии с рекомендациями производителя. Отжиг меченных олигонуклеотидов проводили с их соответствующими комплементарными олигонуклеотидами в буфере, содержащем 50 mM KCl, 20 mM HEPES-KOH (pH 7,5) при +65°C в течение 3 мин с последующим охлаждением до комнатной температуры в течение 2 часов.

Реакцию BER (base excision repair) анализа проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 10 нМ [³²P] -меченных THF•C олигонуклеотидного дуплекса, 2 mM MgCl₂, 20 mM HEPES-NaOH (pH 7,6), 0,1 мг мл⁻¹ BSA и 20 нМ фермента при +37°C в течение 30 мин.

Реакцию останавливали добавлением 10 мкл раствора, содержащего 0,5% ДСН и 20 mM ЭДТА, с последующим обессоливанием, с помощью колонок с Sephadex G25 (GE Healthcare), эквивилиброванных 7,5 М мочевиной. Обессоленные продукты реакции были разделены с помощью электрофореза в 20% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (7,5 М мочевины, 0,5×ТВЕ). Гели экспонировали на экран Fuji FLA-3000 Phosphor Screen и сканировали с помощью Fuji FLA-3000/FLA-9500. Анализ результатов проводился с использованием программного обеспечения Image Gauge V4.0. Каждый эксперимент выполнялся в трех повторностях.

Определение АП эндонуклеазной активности MtbXthA в зависимости от концентрации ионов металлов, ионной силы, температуры и значения pH

АП эндонуклеазную активность MtbXthA определяли путем добавления в реакционный буфер солей: MgCl₂, CaCl₂, MnCl₂, ZnCl₂, FeCl₂, CoCl₂ и NiCl₂. Для чего 10 нМ 5'-³²P-меченного 30-мерного ДНК-дуплекса, содержащего один THF остаток, инкубировали в течение 30 мин при +37°C с 100 нМ MtbXthA в буфере: 20 mM HEPES-

NaOH (pH 7,6), 0,1 мг/мл BSA, 0,01% Nonidet P-40) и XCl_2 (где $X=Mg, Ca, Mn, Zn, Fe, Co$ и Ni) в концентрации 0,1-10 мМ.

Зависимость активности MtbXthA от ионной силы определяли путем добавления в реакционный буфер хлорида калия в различной концентрации. 10 нМ $5'$ - ^{32}P -меченный 30-мерный ДНК-дуплекс, содержащий один THF остаток, инкубировали в течение 30 мин при $37^\circ C$ с 20 нМ MtbXthA (условия реакции: 20 мМ Hepes-NaOH (pH 7,6), 0,1 мг/мл BSA, 0,01% Nonidet P-40, 2 мМ $MgCl_2$ с добавлением KCl в концентрации 0, 25, 50, 100 и 200 мМ).

Зависимости АП эндонуклеазной активности MtbXthA от температуры инкубации измеряли в диапазоне от $+20^\circ C$ до $+42^\circ C$. 10 нМ $5'$ - ^{32}P -меченный 30-мерный ДНК-дуплекс, содержащий один THF остаток, инкубировали в течение 30 мин с 20 нМ MtbXthA (условия реакции: 20 мМ Hepes-NaOH (pH 7,6), 0,1 мг/мл BSA, 0,01% Nonidet P-40, 2 мМ $MgCl_2$) при температурах инкубации: $+20^\circ C$, $+25^\circ C$, $+30^\circ C$, $+37^\circ C$, $+42^\circ C$.

Для обоснования биохимических особенностей MtbXthA были проведены эксперименты по зависимости активности фермента от pH в диапазоне от 4,0 до 9,0. 10 нМ $5'$ - ^{32}P -меченный 30-мерный ДНК-дуплекс, содержащий один THF остаток, инкубировали в течение 30 мин с 20 нМ MtbXthA (условия реакции: 20 мМ Hepes-NaOH (pH =4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0), 0,1 мг/мл BSA, 0,01% Nonidet P-40, 2 мМ $MgCl_2$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методами генетической инженерии получена экспрессионная конструкция, несущая полноразмерный ген АП эндонуклеазы *Mycobacterium tuberculosis xthA*, встроенный под контроль промотора бактериофага T7. Размер гена составляет 876 пар оснований. Секвенирование генетической конструкции подтвердило отсутствие мутаций в открытой рамке считывания и соответствие с данными GenBank (NC_000962.3). Результирующий белок вместе с полигистидиновым полипептидом насчитывает 304 аминокислотных остатков с расчетной массой 33,6 кДа. В результате хроматографической очистки с 1 литра индуцированной культуры получено 2 мг высокоочищенного рекомбинантного белка MtbXthA (рисунок 2).

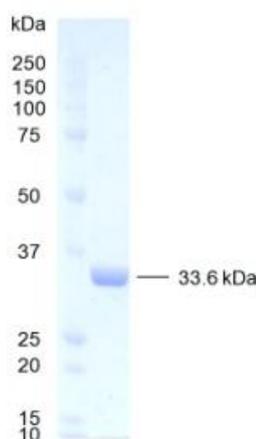


Рис. 2. Очищенный белок MtbXthA

Fig. 2. Purified MtbXthA protein

Эксперименты по определению зависимости АП эндонуклеазной активности от ионов металлов показали, что из всех изученных металлов на активность фермента MtbXthA влияет присутствие ионов Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} и Ni^{2+} . В частности, обнаружена сильная

зависимость активности MtbXthA от концентрации ионов Mg^{2+} и Mn^{2+} . Установлено, что оптимальная концентрация ионов Mg^{2+} и Mn^{2+} для MtbXthA составляет 2 и 0,5 мМ соответственно (рисунок 3).

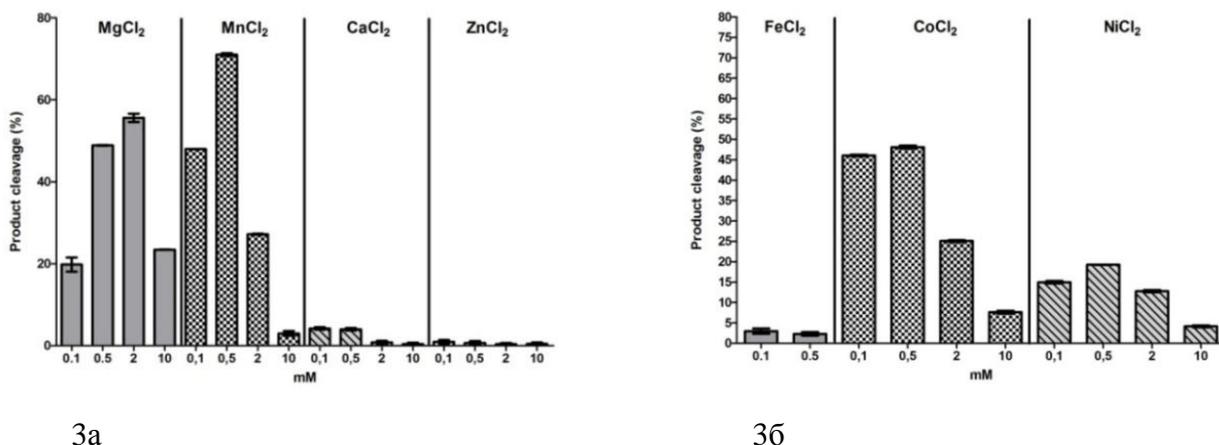


Рис. 3. Графическое представление зависимости АП эндонуклеазной активности MtbXthA в присутствии различных ионов металлов

Fig. 3. Graphical representation of metal dependence of the MtbXthA AP endonuclease activity (in the presence of various metal ions)

Изучение зависимости АП эндонуклеазной активности MtbXthA от ионной силы показало, что уровень продуктов расщепления резко уменьшается с увеличением концентрации хлорида калия в реакционном буфере (рисунок 4). Данный факт согласуется с оптимумом для Xth из *E. coli* [15].

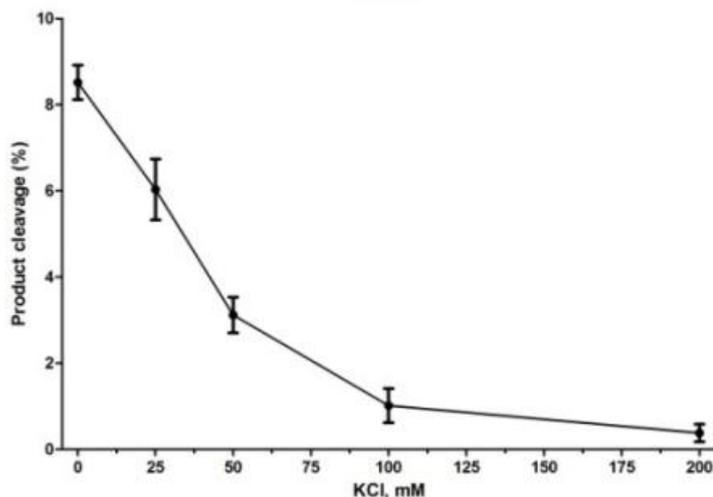


Рис. 4. Графическое представление зависимости АП эндонуклеазной активности MtbXthA от ионной силы

Fig. 4. Graphical representation of the effect of ionic strength on MtbXthA AP endonuclease activity

Установлено, что оптимальной температурой для проявления максимальной АП эндонуклеазной активности MtbXthA является +37°C. При снижении и повышении температуры концентрация продукта расщепления субстрата снижается (рисунок 5).

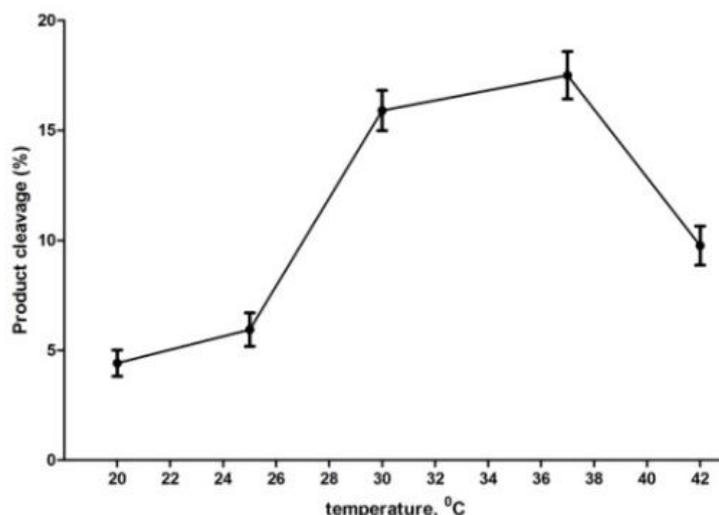


Рис. 5. Графическое представление зависимости АП эндонуклеазной активности MtbXthA от температуры инкубации

Fig. 5. Graphical representation of the effect of incubation temperature on MtbXthA AP endonuclease activity

Исследование зависимости активности MtbXthA от различных значений pH показало, что оптимумом для эндонуклеазной активности MtbXthA является слабокислое значение pH 6,0-6,5 (рисунок 6).

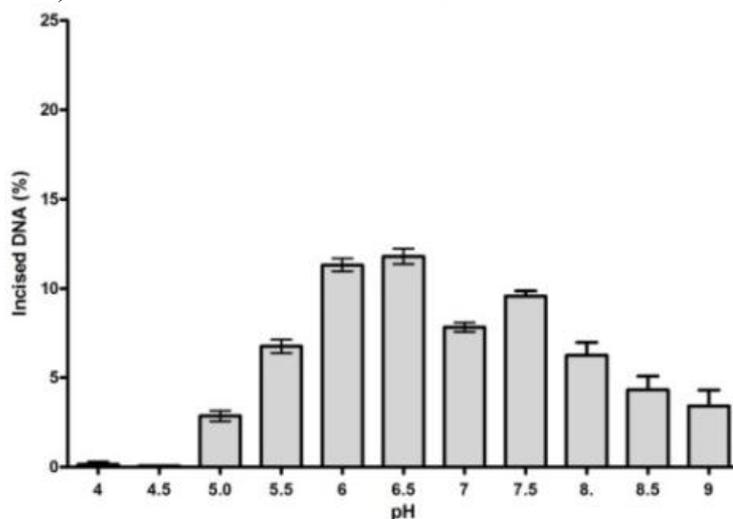


Рис. 6. Графическое представление pH зависимости АП эндонуклеазной активности MtbXthA

Fig. 6. Graphical representation of the effect of pH on MtbXthA AP endonuclease activity

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение репарации ДНК микобактерий как основного молекулярного механизма, поддерживающего стабильность геномной ДНК, является важным для понимания всего патогенеза туберкулеза [16]. Ранее было уже отмечено исследователями о значении гена *xthA* для роста микобактерий [17]. Ввиду того, что микобактерии не располагают гомологами ферментов, участвующих в репарации ошибочно спаренных нуклеотидов, а частота мутаций при этом относительно невысокая, то можно предположить, что репарация поврежденных оснований, и АП эндонуклеазы соответственно, играют определяющую роль в поддержании стабильности ДНК.

В этой работе было установлено, что MtbXthA является сильно зависимым ферментом от ионов Mg^{2+} . Слабокислое значение pH является наилучшим для эффективной работы фермента, а оптимальная температура соответствует нормальной температуре человека. Полученные количественные данные по зависимости АП эндонуклеазной активности MtbXthA от ряда параметров, показывают высокую устойчивость фермента к внешним факторам, что обеспечивает высокую эффективность эксцизионной репарации оснований в противодействии иммунной системе человека. В связи с чем АП эндонуклеаза MtbXthA может выступать хорошим объектом при поиске лекарств для таргетной терапии туберкулеза.

Финансирование

Исследование проведено в рамках гранта «Биохимическая характеристика ферментов репарации повреждений ДНК у возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis*» по программе «Грантовое финансирование научных исследований» на 2015-2017 годы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Organization W.H. Global Tuberculosis Report 2014. □ 2014.
2. Gagneux S. Host-pathogen coevolution in human tuberculosis // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* □ 2012. □ T. 367, №1590. □ C. 850-859.
3. Comas I., Coscolla M., Luo T., Borrell S., Holt K. E., Kato-Maeda M., Parkhill J., Malla B., Berg S., Thwaites G., Yeboah-Manu D., Bothamley G., Mei J., Wei L., Bentley S., Harris S. R., Niemann S., Diel R., Aseffa A., Gao Q., Young D., Gagneux S. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans // *Nat Genet.* □ 2013. □ T. 45, №10. □ C. 1176-1182.
4. Hershberg R., Lipatov M., Small P. M., Sheffer H., Niemann S., Homolka S., Roach J.C., Kremer K., Petrov D.A., Feldman M.W., Gagneux S. High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography // *PLoS Biol.* □ 2008. □ T. 6, №12. □ C. e311.
5. Behr M. A. Evolution of *Mycobacterium tuberculosis* // *Adv Exp Med Biol.* □ 2013. □ T. 783. □ C. 81-91.
6. Ehrt S., Schnappinger D. Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses // *Cell Microbiol.* □ 2009. □ T. 11, №8. □ C. 1170-1178.
7. Mizrahi V., Andersen S.J. DNA repair in *Mycobacterium tuberculosis*. What have we learnt from the genome sequence? // *Mol Microbiol.* □ 1998. □ T. 29, №6. □ C. 1331-1339.
8. McGrath M., Gey van Pittius N.C., van Helden P.D., Warren R.M., Warner D.F. Mutation rate and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // *J Antimicrob Chemother.* □ 2014. □ T. 69, №2. □ C. 292-302.
9. Ford C.B., Shah R.R., Maeda M.K., Gagneux S., Murray M.B., Cohen T., Johnston J.C., Gardy J., Lipsitch M., Fortune S.M. *Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis // *Nat Genet.* □ 2013. □ T. 45, №7. □ C. 784-790.
10. Kurthkoti K., Varshney U. Base excision and nucleotide excision repair pathways in mycobacteria // *Tuberculosis (Edinb).* □ 2011. □ T. 91, №6. □ C. 533-543.
11. Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E., 3rd, Tekaia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Krogh A., McLean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Osborne J., Quail M.A., Rajandream M.A., Rogers J., Rutter S., Seeger K., Skelton J., Squares R., Squares S., Sulston J.E., Taylor K., Whitehead S., Barrell B.G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence // *Nature.* □ 1998. □ T. 393, №6685. □ C. 537-544.
12. Abeldenov S.K.B. Cloning, expression and purification of recombinant analog of Taq DNA polymerase // *Biotechnology. Theory and Practice.* □ 2014. □ №1. □ C. 12-16.
13. Хасенов Б.Б., Султанкулов Б.М., Кожахметов С.С., Ахметов С.Б., Раманкулов Е.М., Муканов К.К. Получение рекомбинантного антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота р24 // *Биотехнология. Теория и практика.* □ 2011. □ №2. □ C. 50-56.
14. Mussakhmetov A., Nurmagambetova A., Abeldenov S., Khassenov B. Purification of recombinant Pfu DNA polymerase by double step affinity chromatography // *Biotechnology. Theory and Practice.* □ 2014. □ №2. □ C. 42-47.
15. Takeuchi M., Lillis R., Demple B., Takeshita M. Interactions of *Escherichia coli* endonuclease IV and exonuclease III with abasic sites in DNA // *J Biol Chem.* □ 1994. □ T. 269, №34. □ C. 21907-21914.
16. Warner D.F., Tonjum T., Mizrahi V. DNA metabolism in mycobacterial pathogenesis // *Curr Top Microbiol Immunol.* □ 2013. □ T. 374. □ C. 27-51.

17. Sasseti C.M., Rubin E.J. Genetic requirements for mycobacterial survival during infection // Proc Natl Acad Sci USA. 2003. T. 100, №22. C. 12989-12994.

REFERENCES

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report, 2014.
2. Gagneux S. Host-pathogen coevolution in human tuberculosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 2012, vol. 367, no. 1590, pp. 850-859. PMID: 22312052.
3. Comas I., Coscolla M., Luo T., Borrell S., Holt K. E., Kato-Maeda M., Parkhill J., Malla B., Berg S., Thwaites G., Yeboah-Manu D., Bothamley G., Mei J., Wei L., Bentley S., Harris S. R., Niemann S., Diel R., Aseffa A., Gao Q., Young D., Gagneux S. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nat Genet.*, 2013, vol. 45, no. 10, pp. 1176-1182. PMID: 23995134.
4. Hershberg R., Lipatov M., Small P.M., Sheffer H., Niemann S., Homolka S., Roach J.C., Kremer K., Petrov D.A., Feldman M.W., Gagneux S. High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography. *PLoS Biol.*, 2008, vol. 6, no. 12, pp. e311. PMID: 19090620.
5. Behr M.A. Evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Adv Exp Med Biol.*, 2013, vol. 783, pp. 81-91. PMID: 23468104.
6. Ehrh S., Schnappinger D. Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses. *Cell Microbiol.*, 2009, vol. 11, no. 8, pp. 1170-1178. PMID: 19438516.
7. Mizrahi V., Andersen S.J. DNA repair in *Mycobacterium tuberculosis*. What have we learnt from the genome sequence? *Mol Microbiol.*, 1998, vol. 29, no. 6, pp. 1331-1339. PMID: 9781872.
8. McGrath M., Gey van Pittius N.C., van Helden P.D., Warren R.M., Warner D.F. Mutation rate and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother.*, 2014, vol. 69, no. 2, pp. 292-302. PMID: 24072169.
9. Ford C.B., Shah R.R., Maeda M.K., Gagneux S., Murray M.B., Cohen T., Johnston J.C., Gardy J., Lipsitch M., Fortune S.M. *Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. *Nat Genet.*, 2013, vol. 45, no. 7, pp. 784-790. PMID: 23749189.
10. Kurthkoti K., Varshney U. Base excision and nucleotide excision repair pathways in mycobacteria. *Tuberculosis (Edinb.)*, 2011, vol. 91, no. 6, pp. 533-543. PMID: 21764637.
11. Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E., 3rd, Tekaiia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Krogh A., McLean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Osborne J., Quail M.A., Rajandream M.A., Rogers J., Rutter S., Seeger K., Skelton J., Squares R., Squares S., Sulston J.E., Taylor K., Whitehead S., Barrell B.G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 1998, vol. 393, no. 6685, pp. 537-544. PMID: 9634230.
12. Abeldenov S.K.B. Cloning, expression and purification of recombinant analog of Taq DNA polymerase. *Biotechnology. Theory and Practice*, 2014, no. 1, pp. 12-16.
13. Khasenov B.B., Sultankulov B.M., Kozhakhmetov S.S., Akhmetov S.B., Ramankulov E.M., Mukanov K.K. Получение рекомбинантного антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота p24 [Producing a p24 recombinant antigen of bovine leucosis virus]. *Biotehnologija. Teorija i praktika – Biotechnology. Theory and Practice*, 2011, no. 2, pp. 50-56.

14. Mussakhmetov A., Nurmagambetova A., Abeldenov S., Khassenov B. Purification of recombinant Pfu DNA polymerase by double step affinity chromatography. *Biotechnology. Theory and Practice*, 2014, no. 2, pp. 42-47.

15. Takeuchi M., Lillis R., Demple B., Takeshita M. Interactions of *Escherichia coli* endonuclease IV and exonuclease III with abasic sites in DNA. *J Biol Chem.*, 1994, vol. 269, no. 34, pp. 21907-21914. PMID: 7520446.

16. Warner D.F., Tonjum T., Mizrahi V. DNA metabolism in mycobacterial pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 2013, vol. 374, pp. 27-51. PMID: 23633106.

17. Sasseti C.M., Rubin E.J. Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2003, vol. 100, no. 22, pp. 12989-12994. PMID: 14569030.

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ТУБЕРКУЛЕЗ ҚОЗДЫРҒЫШЫНДАҒЫ MtbXthA ФЕРМЕНТІНІҢ АПУРИНДІК/АПИРИМИДИНДІК ЭНДОНУКЛЕАЗАЛЫҚ РЕПАРАЦИЯЛЫҚ БЕЛСЕНДІЛІГІ

Әбілденев С.К.¹, Раманқұлов Е.М.¹, Сапарбаев М.К.², Хасенов Б.Б.¹

¹Ұлттық биотехнология орталығы

Уәлиханов к-сі, 13/1, Астана, 010000, Қазақстан

²CNRS, UMR 8200, Gustave Roussy, F-94805 Villejuif Cedex, France

abeldenov@gmail.com

АБСТРАКТ

Туберкулез әлемдегі бактериялық инфекциядан адам өлімінің ең басты себептерінің бірі болып қала береді, бұл соңғы жылдары көптеген дәрілік төзімділікке ие *Mycobacterium tuberculosis* штамдарының пайда болуымен байланысты. Туберкулез қоздырғышы *Mycobacterium tuberculosis* туберкулез қоздырғышының геномдық тұрақтылығын қамтамасыз етуде маңызды рөлді ДНҚ репарация ферменттері атқаруда, атап айтқанда, АП (апуриндік/апиримидиндік) эндонуклеазалар. АП эндонуклеазалары негізсіз сайттарды жоюға қатысатын, ДНҚ репарациясындағы негізгі ферменттер болып табылады. ДНҚ зақымданулары пайда болған кезде, гликозилазаның айрықша ДНҚ-лары зақымдалған негізді жояды және АП сайты пайда болады. АП эндонуклеазалар фосфодиэфирлі байланыстарды үзіп, қант-фосфатты қалдықты алып тастайды. Осындай АП эндонуклеазалардың бірі- MtbXthA репарация ферменті болып табылады. Берілген жұмыста ферменттің репарациялық АП эндонуклеазды белсенділігі зерттелді. Генетикалық инженерияның стандартты әдістерінің көмегімен MtbXthA рекомбинантты ақуызы клондалып, экспрессияланды және тазаланды. MtbXthA АП эндонуклеазалық белсенділігі Mg^{2+} және Mn^{2+} иондарына тәуелді екендігі анықталды. MtbXthA АП эндонуклеазалық белсенділігі $+37^{\circ}C$ температурасы кезінде ең жоғары көрсеткішіне жететіндігі көрсетілді. MtbXthA-ның иондық күшке өте сезімтал екендігі белгілі болды. Мәселен, 100 мМ калий хлоридін қолданған кезде, реакцияның 10 есе тежелгені байқалды. MtbXthA үшін рН 6,0-6,5 әлсіз қышқылды мәні оңтайлы болып табылады.

Негізгі сөздер: ДНҚ репарациясы, туберкулез, АП эндонуклеазалары, генетикалық инженерия, геномдық тұрақтылық.