

3-бөлім  
**МОЛЕКУЛАЛЫҚ БИОЛОГИЯ  
ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА**

---

Раздел 3  
**МОЛЕКУЛЯРНАЯ  
БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА**

---

Section 3  
**MOLECULAR  
BIOLOGY AND GENETICS**

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

**Получение мутантных форм  
микобактериальной АП  
эндонуклеазы MtbXthA**

Апуриновые/апирииминовые (АП) эндонуклеазы являются ключевыми ферментами, участвующими в репарации безосновных сайтов и разрывах цепей ДНК. Патогенная бактерия *Mycobacterium tuberculosis* содержит две АП эндонуклеазы: MtbXthA и MtbNfo, которые являются представителями семейств экзонуклеаза III и эндонуклеаза IV, соответственно. Известно, что оба фермента MtbXthA и MtbNfo содержат АП эндонуклеазную и 3'→5' экзонуклеазную активности. В данной работе описывается клонирование, экспрессия и очистка рекомбинантного белка MtbXthA. Результаты показали, что MtbXthA содержит АП эндонуклеазную, 3'-фосфодиэстеразную и 3'→5' неспецифическую экзонуклеазную активности. Чтобы убедиться, что наблюдаемые виды активности репарации ДНК не являются результатом загрязнения эндонуклеазами *E.coli*, были сделаны мутанты MtbXthA – MtbXthA-D180N и MtbXthA-N182A. Анализ показал, что найденные мутации D180N и N182A в MtbXthA имеют решающее значение для активности ферментов.

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

Abeldenov S.K.,  
Ramanculov E.M.,  
Saparbaev M.K., Khassenov B.B.

**Obtaining mutant forms of  
Mycobacterial AP endonuclease  
MtbXthA**

Apurinic/apyrimidinic (AP) endonucleases are a key enzymes involved in the repair of abasic sites and DNA strand breaks. Pathogenic bacterium *Mycobacterium tuberculosis* contains two AP endonucleases: MtbXthA and MtbNfo, which are representatives of exonuclease III and endonuclease IV families, respectively. It is known that both enzymes MtbXthA and MtbNfo contain AP endonuclease or 3'→5' exonuclease activities. This paper describes the cloning, expression and purification of recombinant protein MtbXthA. The results showed that comprises MtbXthA AP endonuclease, 3'-phosphodiesterase and 3'→5' nonspecific exonuclease activity. To verify that the observed activity of the types of DNA repair are not the result of contamination by endonucleases of *E.coli*, mutants MtbXthA-D180N and MtbXthA-N182A were made. The analysis showed that the discovered mutations D180N and N182A in MtbXthA are crucial for enzyme activity.

**Key words:** DNA repair, tuberculosis, AP endonucleases, genetic engineering, genomic stability.

Әбелденов С.К.,  
Раманқұлов Е.М.,  
Сапарбаев М.К., Хасенов Б.Б.

**Микобактериалды АП  
эндонуклеазаның MtbXthA  
мутантты түрін алу**

Апуриндік/апириимидиндік (АП) эндонуклеазалар үзілген ДНҚ тізбектерінің және негізі жоқ сайттардың репарациясына қатысатын ең басты ферменттер болып табылады. Патогенді *Mycobacterium tuberculosis* III эндонуклеаза және IV эндонуклеазаларға жататын, сәйкесінше, MtbXthA және MtbNfo екі АП эндонуклеазаға ие. Белгілі болғандай, MtbXthA және MtbNfo ферменттерінде АП эндонуклеазды және 3'→5' экзонуклеазды белсендік бар. Берілген жұмыста MtbXthA рекомбинантты ақуызының клондалуы, экспрессиясы және тазалануы сипатталған. Алынған нәтижелер MtbXthA ақуызында АП эндонуклеазды, 3'-фосфодиэстеразды және 3'→5' бейспецификалық экзонуклеазды белсендіктер бар екендігін көрсетті. Көріп отырған ДНҚ репарация белсендіктер *E.coli* эндонуклеазалардың қоспасы еместігін дәлел деу үшін MtbXthA – MtbXthA-D180N және MtbXthA-N182A мутанттары алынды. Жүргізілген талдау, MtbXthA-гі табылған D180N және N182A мутациялар белсендік үшін маңызды болып шықты.

**Түйін сөздер:** ДНҚ репарация, АП эндонуклеазалар, генетикалық инженерия, геномдық тұрақтылық.

## ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТНЫХ ФОРМ МИКОБАКТЕРИАЛЬНОЙ АП ЭНДОНУКЛЕАЗЫ МТВХТНА

### Введение

Туберкулез (ТБ) – заболевание, вызываемое *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), бактерией, которой инфицированы больше трети населения планеты. Лечение ТБ требует длительного приема противотуберкулезных препаратов. Понимание механизма персистенции *M. tuberculosis* внутри организма крайне необходимо для планирования короткого и эффективного курса лечения заболевания.

За 2012 год в Республике Казахстан, по данным Всемирной организации здравоохранения, выявлено 22000 новых случаев заболевания [1]. Борьба с ТБ является одной из приоритетных задач здравоохранения Казахстана. ТБ приводит к огромным человеческим потерям, а также к экономическим убыткам страны.

В ходе инфицирования, *M. tuberculosis* встречается с разнообразием механизмов защиты организма. Данные механизмы, которые встречаются на ранней стадии инфекции, возможно, являются наиболее критическими для патогена с целью выживания. Это, главным образом, составляет респираторный взрыв, который приводит к образованию реактивных форм промежуточных соединений кислорода и азота. Попадая в организм, клеточная ДНК патогена *M.tuberculosis* подвергается воздействию реактивных форм кислорода и азота внутриклеточного и внеклеточного происхождения, что в свою очередь приводит к повреждениям ДНК [2]. Данные повреждения приводят к мутациям. Микобактерии, находясь в стрессовых условиях, должны поддерживать стабильность генома, поэтому, изучение систем репарации ДНК у патогена, является очень важным для понимания механизмов поддержания генетической стабильности, мутагенеза и возникновения штаммов с множественной лекарственной устойчивостью.

Предполагается, что мутации в генах ферментов ДНК репарации могут способствовать адаптации и персистенции *M.tuberculosis* в организме, где повреждения ДНК происходят в макрофагах или во время латентной инфекции. Микобактерии, дефектные по механизмам ДНК репарации, имеют мутантный фенотип, который охарактеризован повышенной частотой мутации [3]. Данный генетический фон позволяет микобакте-

риям адаптироваться к окружающим условиям с помощью образования мутаций, приводящих к антибиотиковой резистентности. Мутантные фенотипы, образующиеся после мутаций в генах репарации ДНК, были описаны в других бактериях и были ассоциированы с появлением лекарственно-устойчивых штаммов [4].

Учитывая факт, что системы репарации ДНК играют важную роль в толерантности в отношении повреждений ДНК, вызываемых промежуточными соединениями азота и активными формами кислорода, важно изучить системы репарации ДНК, которые могут выступать в качестве потенциальных целей. Клеточная ДНК постоянно подвергается воздействию реактивных радикалов внутриклеточного или внеклеточного происхождения, часто приводящих к необратимым изменениям в генетической карте. Такие изменения приводят к мутациям. Поскольку патогенные бактерии должны адаптироваться в пределах хозяина – организма, исследования ДНК репарации в этих бактериях формируют интересную модельную систему. Фактически, *M. tuberculosis*, которая предпочтительно заражает макрофаги, первую линию защиты в иммунной системе хозяина, должна обладать сильным механизмом репарации ДНК, чтобы гарантировать поддержку целостности генома микобактерии, чтобы выжить в хозяине-организме и обеспечивать успешное инфицирование.

Вследствие того, что микобактерия постоянно подвергается враждебным факторам окружающей среды, что приводит к образованию повреждений и модификаций ДНК, сохранность генома защищена механизмами ДНК репарации [5]. Эти механизмы являются очень важными, так как они могут влиять на процессы ведущие к лекарственной устойчивости и они могут предложить новые мишени для антибиотиков.

Однако, по сравнению со многими другими прокариотами, у микобактерий отсутствует механизм, известный как репарация ошибочно спаренных нуклеотидов. Это может иметь потенциально значимое влияние на стабильность генома. Поэтому, другие существующие пути репарации ДНК, такие как, эксцизионная репарация нуклеотидов и оснований должны иметь ключевую роль в поддержании геномной стабильности. Другой важной особенностью микобактерии является ее способность оставаться в латентном состоянии в течение длительного периода времени. Ослабленная, вследствие возраста, нарушения питания или приема иммунодепрессантов, иммунная система, может привести к

реактивации бактерии. Хотя механизмы реактивации до сих пор не раскрыты, бактерия должна обладать механизмами защиты собственной ДНК и для сохранения способности размножиться во время реактивации.

Секвенирование генома *M. tuberculosis* показало [6], что бактерия содержит множество генов эксцизионной репарации оснований и эксцизионной репарации нуклеотидов.

Путь эксцизионной репарации оснований (ЭРО) включает вырезание модифицированных оснований в ДНК с помощью класса ферментов, называемых ДНК гликозилазами [7]. Данные ДНК гликозилазы катализируют гидролиз N-гликозидной связи между химически модифицированными или несоответствующими основаниями и сахаро-фосфатным остовом. Первоначальный ферментативный процесс пути ЭРО образует участки ДНК без оснований, данные участки называют апуриновыми/апиридиновыми или абазическими (безосновными) сайтами (АП сайтами) [8]. Присутствие непротессированных АП сайтов может быть более губительным, чем модифицированные основания, так как они препятствуют таким важнейшим клеточным процессам как репликация и транскрипция. Аккумуляция АП сайтов в ДНК обладает мутагенным и цитотоксическим действием. АП сайты также могут образовываться в результате депуринизации или депиримидинизации вследствие спонтанного гидролиза N-гликозидной связи.

Удаление АП сайтов инициируется ферментами, называемыми апуриновыми/апиридиновыми (АП) эндонуклеазами, которые специфически распознают данные сайты. АП эндонуклеазы образуют разрезы или «ники» (nicks) в ДНК-дуплексе с помощью гидролиза фосфодиэфирной связи с образованием 5' терминального дезоксирибозо-фосфатного остатка. Путь ЭРО завершается с заполнением соответствующего нуклеотида и лигированием ДНК.

В *E. coli* эндонуклеаза IV (Nfo) и экзонуклеаза III (Xth) разрезают фосфодиэфирную связь 5' до безосновного дезоксирибозного сахара для образования 3' гидроксила и 5' дезоксирибозного концов в месте сайта повреждения. Xth является главной АП эндонуклеазой в *E. coli* [9]. Гены *xth* и *nfo* были идентифицированы в микобактериях. Важность белков XthA и Nfo, была подчеркнута их необходимостью для бактериального выживания на начальных стадиях инфекции на модельных мышах. Было обнаружено, что главной АП эндонуклеазой у *M. tuberculosis* является Nfo [10].

Известно, что MtbXthA обладает АП эндонуклеазной, 3'-фосфодиэстеразной и 3'→5' неспецифической экзонуклеазной активностями. У ферментов семейства Xth, аминокислотные остатки гомологичные D180 и N182 у MtbXthA координируют за каталитический центр ионов металлов. У человеческого белка APE1, соответствующие мутации D210N и N212A снижают активность фермента в ~10,000 раз [11], и то же наблюдается в D146N у мутанта гомолога NExo Neisseria с только экзонуклеазной активностью [12].

Целью данной работы являлось получение рекомбинантного белка MtbXthA и его мутантных форм, а также определение их АП эндонуклеазной и 3'-фосфодиэстеразной активностей.

### 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 [13]. Двух этапную очистку рекомбинантного белка проводили на преупакованной колонке HisTrap HP производства GE Healthcare (США) объемом 1 мл и гепариновой колонке HiTrap Heparin HP. Штамм *E. coli* ArcticExpress (DE3) RP был заказан у компании Novagen (Merck4Biosciences, Франция).

В работе использовались два варианта бульона Лурия-Бертани: нормально-солевой для культивирования клеток *E. coli* (1% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 1% NaCl) и низкосолевой (1% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 0,5% NaCl). Для инкубирования трансформированных клеток, использовалась среда SOC (2% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 0,05% NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM глюкозы, pH7,5). Концентрация антибиотика канамицина в средах составляла 50 мкг/мл.

Клонирование рекомбинантных векторов, кодирующих нативный и мутантные варианты MtbXthA.

Амплифицированный ген-мишень *xthA* из *M.tuberculosis* H37Rv (Rv0427c) был клонирован

в вектор pET-28c(+) по сайтам рестрикции *Nco*I и *Not*I, таким образом, чтобы рекомбинантный MtbXthA имел С-концевую гексагистидиновую последовательность.

Условия ПЦР для амплификации гена-мишени *xthA* были следующими: геномная ДНК *M.tuberculosis* H37Rv (100 нг), 1 мкл (10 мкМ) каждого олигонуклеотида, 4 мкл (10 mM) дНТФ, 10 мкл 5x буфера для ПЦР (содержащий 7,5 mM MgCl<sub>2</sub>) и 0,5 мкл Phusion High-Fidelity ДНК-полимеразы (2 U/мкл); общий объем ПЦР смеси составил 50 мкл; сначала, ПЦР смесь нагревали в течение 25 секунд, далее проводили 30 циклов последующей программы проведения реакции: 10 сек при температуре 98°C, 20 сек при 57°C, 1 мин при 72°C и конечная элонгация в течение 7 мин при 72°C в ПЦР амплификаторе Mastercycler Nexus Gradient (Eppendorf, Германия).

Продукт ПЦР, полученный с соответствующим размером (899 п.о.) анализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле с бромистым этидием. Амплифицированный фрагмент расщепляли ферментами рестрикции в соответствующем буфере. Далее после рестрикции амплифицированный продукт очищали путем фенол-хлороформной экстракции, после чего проводили лигирование с экспрессионным вектором pET-28c (+), который также обрабатывали рестриктазами, перечисленными выше. Лигирование проводили с T4 ДНК-лигазой при 16°C в течение 16 часов. Высококкомпетентные клетки DH5α трансформировали лигазной смесью методом теплового шока. Отбор колоний-трансформантов проводили на 1,5% LB-агаре с канамицином. Затем проводили ПЦР-скрининг с использованием T7 (промотор и терминатор) праймеров. Для проведения ПЦР скрининга и секвенирующей ПЦР реакции в работе были использованы следующие виды праймеров:

1) T7fw, 5'-T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G-3';

2) T7rv, 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3';

Отобранные колонии-трансформанты инокулировали в Лурия-Бертани бульоне для получения плазмидной ДНК. Выделение плазмид из положительных клонов проводили с использованием набора Quick PureLink Plasmide MiniPrep Kit (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом производителя.

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).

Получение рекомбинантного вектора рЕТ-28с-MtbXthA с сайт-направленными мутациями в кодирующей последовательности гена xthA

Следует отметить, в настоящей работе были использованы тагированный MtbXthA белок и его мутанты. Экспрессия белка из рЕТ-28с-MtbXthA продуцирует рекомбинантный белок с 2 дополнительными N-терминальными аминокислотными остатками (МА) и еще 11 С-терминальными аминокислотными остатками (АААЕНННННН) по сравнению с нативным белком MtbXthA.

Сайт-направленные мутации в кодирующей последовательности MtbXthA в рЕТ-28с-MtbXthA были получены с использованием разработанных олигонуклеотидных праймеров, использованных для получения мутантных форм MtbXthA-D180N, MtbXthA-N182A (таблица 1).

**Таблица 1** – Праймеры с сайт-направленными мутациями

Название праймера	Последовательность 5'→3'
MtbXth D180N прямой	д(GAGCGATGTTCCAG <b>TTG</b> CCCATCAGTGCAT)
MtbXth D180N обратный	д(ATCGCACTGATGGG <b>CAA</b> CTGGAACATCGCTC)
MtbXth N182A прямой	д(CGGTCCGAGCGAT <b>GGCC</b> CAGTCGCCCATCA)
MtbXth N182A обратный	д(TGATGGGCGACT <b>GGCC</b> ATCGTCCGACCG)

#### Проведение QuickChange ПЦР

Условия QuickChange ПЦР были следующими: плазмидная ДНК рЕТ-28с-MtbXthA (10 нг), 2 мкл (5 мкМ) каждого олигонуклеотида, 1 мкл (10 мМ) дНТФ, 5 мкл 5х буфера для ПЦР (содержащий 7,5 мМ MgCl<sub>2</sub>) и 0,5 мкл Phusion High-Fidelity ДНК-полимеразы (2 У/мкл); общий объем ПЦР смеси составил 25 мкл; сначала, ПЦР смесь нагревали в течение 25 секунд при 98°C, далее 19 циклов последующей программы проведения реакции: 10 сек при температуре 98°C, 30 сек при 62°C, 2,5 мин при 72°C и конечная элонгация в течение 7 мин при 72°C в ПЦР амплификаторе Mastercycler Nexus Gradient (Eppendorf, Германия).

Далее, амплифицированные продукты, в объеме 10 мкл (QuickChange ПЦР смесь), обрабатывали ферментом DpnI при 37°C в течение 1 часа. Далее, высоко компетентные клетки DH5α трансформировали, обработанную DpnI QuickChange ПЦР смесью (5 мкл), методом теплового шока. Отбор колоний-трансформантов

проводили на 1,5% LB-агаре с канамицином. Интегрированные в плазмиды вставки были секвенированы и анализированы на наличие необходимых замен.

Экспрессия и очистка нативного и мутантных вариантов MtbXthA

Полученными векторами рЕТ-28с-MtbXthA, рЕТ-28с-MtbXthA-D180N и рЕТ-28с-MtbXthA-N182A были трансформированы компетентные клетки штамма *E.coli* ArcticExpress(DE3)RP. Колонию-трансформант культивировали в бульоне Луриа-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-тиога-лактопиранозида (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 мМ NaCl, 40 мМ Hepes-NaOH (pH 7,5) с добавлением коктейля ингибиторов протеаз (Roche Diagnostics, Швейцария). Клеточную суспензию лизировали с использованием прессы 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 мМ, добавляли имидазол до концентрации 20 мМ и наносили на колонку HisTrap HP активированную ионами Ni<sup>2+</sup>. Методом линейного градиента по имидазолу от 20 мМ до 500 мМ 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 мМ хлорида калия. Хранение очищенных образцов MtbXthA и его мутантов осуществляли при -20°C в 50% глицерине. Гомогенность белков 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 (T G A C T G C A T A X G C A T G T A G A C G A T G T G C

А Т), где Х – тетрагидрофуран (THF, аналог безосновного сайта (abasic site) и RT-C 30-мерный комплементарный олигонуклеотид, содержащий dC напротив повреждения.

Следующие олигонуклеотиды были использованы для измерения 3'→5' экзонуклеазной, 3'-фосфодиэстеразной активностей: 20-мерный Eho20<sup>THF</sup>, д (G T G G C G C G G A G A C T T A G A G A X), где X представляет собой 3'-концевой тетрагидрофуран; и комплементарный 40-мерный Rex-T, д(G G A A T T C C C C G C G C C A A A T T T C T C T A A G T C T C C G C G C C A C), содержащий T напротив тетрагидрофурана.

Радиоактивное мечение олигонуклеотидов было осуществлено с 5' конца с помощью T4 полинуклеотид киназы с отсутствием 3' фосфатазной активности (New England Biolabs) в присутствии  $\gamma$  [<sup>32</sup>P] 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 [<sup>32</sup>P]-меченных THF•C олигонуклеотидного дуплекса, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Hepes-NaOH (pH 7,6), 0,1 мг·мл<sup>-1</sup> БСА 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), эквивалентированных 7,5 М мочевиной. Обессоленные продукты реакции были разделены с помощью электрофореза в 20% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (7,5 М мочевина, 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.

## Результаты и их обсуждение

Клонирование кДНК генов в экспрессионный вектор рЕТ-28с

кДНК, кодирующая MtbXthA, была изолирована с помощью ПЦР с использованием геномной ДНК *M.tuberculosis* штамма H37Rv и олигонуклеотидных праймеров как было описано в мате-

риалах и методах. Результирующий 899 п.о. фрагмент был анализирован в 1% агарозном геле.

Далее, амплифицированный фрагмент был лигирован в вектор рЕТ-28с. Лигазной смесью были трансформированы компетентные клетки DH5α методом температурного шока. Отбор колоний-трансформантов проводился на 1,5% ЛБ-агаре с антибиотиком канамицином (50 мкг/мл). Отбор колоний-трансформантов проводили методом ПЦР скрининга с использованием T7 (T7fw и T7rv) праймеров, фланкирующих вставку в плазмиде. Было отобрано 8 колоний и проведен ПЦР-скрининг на предмет содержания вставки. ПЦР скрининг колоний-трансформантов на предмет содержания колониями DH5α вектора рЕТ-28с-MtbXthA по праймерам T7 подтвердил наличие вставки для 6 колоний из 8 подвергнутых анализу.

После проведения ПЦР-скрининга, были отобраны положительные колонии для наработки плазмидной ДНК. Из положительных клонов, после их наработки в ЛБ среде, была выделена плазмидная ДНК по протоколу MiniPrep. Концентрация ДНК рЕТ-28с-MtbXthA составила 50 нг/мкл.

Наработанные плазмиды клонов были секвенированы с использованием праймеров T7 которые перекрывают интегрированный ген в векторе рЕТ-28с.

В результате было установлено полное отсутствие мутаций в гене *xthA* в плазмиде рЕТ-28с, секвенирование подтвердило отсутствие мутаций в открытой рамке считывания в виде делеций, инсерций и замен. В результате чего, была получена рекомбинантная конструкция рЕТ-28с-MtbXthA (рисунок 1).

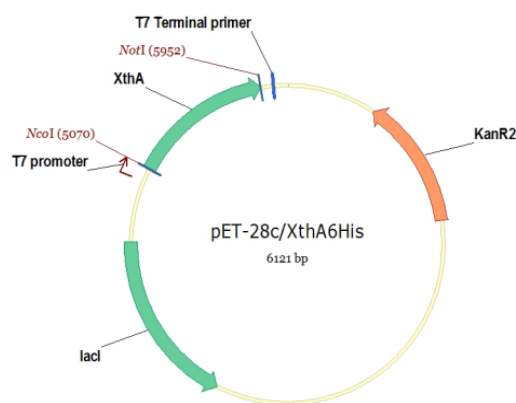


Рисунок 1 – Схематическое изображение полученного рекомбинантного вектора рЕТ-28с-MtbXthA со встроенным геном *xthA*

В данном векторе целевой ген встроен под контроль промотора РНК полимеразы бактериофага T7. В открытой рамке считывания вектора перед стартовым метионином гена имеются кодоны дополнительных аминокислотных остатков, включая шесть идущих подряд гистидинов. Общая длина белка составляет 304 а.о. Расчетная молекулярная масса рекомбинантного белка составляет 33,6 кДа.

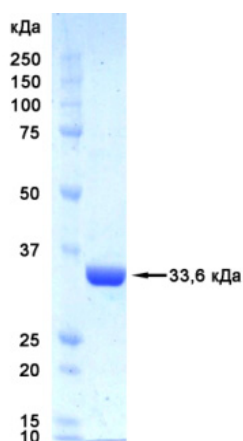
Получение рекомбинантных векторов для экспрессии мутантных вариантов MtbXthA

После получения рекомбинантного вектора pET-28c-MtbXthA, проводили амплификацию рекомбинантных векторов pET-28c-MtbXthA-

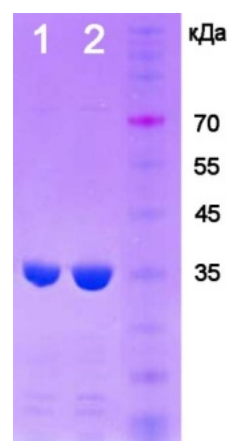
D180N и pET-28c-MtbXthA-N182A с соответствующими мутациями.

Очистка рекомбинантного белка MtbXthA и его мутантных форм

Для характеристики репарационной активности MtbXthA, микобактериальный фермент и его мутанты были очищены с помощью аффинной хроматографии из штамма *E.coli* ArcticExpress (DE3) RP, экспрессирующего С-концевую полигистидин-меченную форму белков. Кумасси-окрашенные гели показали, что очищенные MtbXthA белки обладают более 99% чистоты, не содержат значительного количества примесей белков (рисунок 2 и 3).



**Рисунок 2** – Анализ с помощью ДСН-ПААГ очищенного рекомбинантного белка MtbXthA



**Рисунок 3** – Анализ с помощью ДСН-ПААГ очищенных мутантных форм рекомбинантного белка MtbXthA. 1) MtbXthA -D180N; 2) MtbXthA-N182A

Определение АП эндонуклеазной активности у ферментов семейства Xth, аминокислотные остатки гомологичные D180 и N182 у MtbXthA координируют за каталитический центр ионов металлов. У человеческого белка APE1, соответствующие мутации D210N и N212A снижают активность фермента в ~10,000 раз [11], и то же наблюдается в D146N у мутанта гомолога NExo *Neisseria* с только экзонуклеазной активностью.

Очищенный рекомбинантный белок MtbXthA и его гомологи D180N и N182A инкубировали с  $5$ - $^{32}$ P-меченым THF•C и Echo20<sup>THF</sup>•RexT дуплексами для измерения АП и 3'-фосфодиэстеразной активностей, соответственно (рисунок 4 и 5).

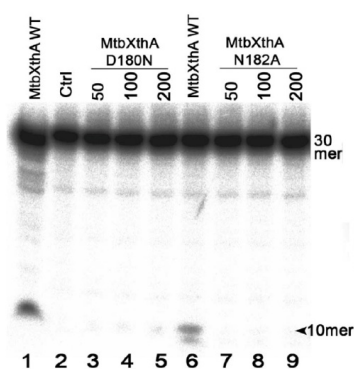
Как показано на рисунке 5, мутантные микобактериальные АП-эндонуклеазы, даже когда они присутствуют в избыточных количествах, не показывают какой либо детектируемой ак-

тивности репарации ДНК, по сравнению с диким типом MtbXthA.

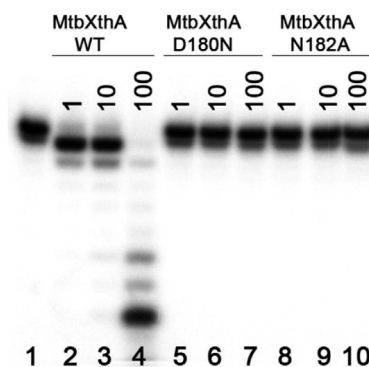
Важно отметить, что MtbXthA-D180N и MtbXthA-N182A мутанты одновременно потеряли неспецифическую 3'-5' экзонуклеазную активность на субстратных THF•C и Echo20<sup>THF</sup>•RexT дуплексах, в то время как не мутантный фермент показывает ДНК-деградирующую активность в тех же условиях.

Таким образом, в данной работе была изолирована ДНК, кодирующая ген АП эндонуклеазы MtbXthA – *xthA*. Были проведены клонирование, экспрессия и очистка рекомбинантной формы MtbXthA. Результаты работы показали, что фермент содержит АП эндонуклеазную и 3'-фосфодиэстеразную активности, а при использовании избыточного количества, фермент содержит 3'→5' неспецифическую экзонуклеазную активности.





**Рисунок 4** – Сравнение ДНК-субстрат специфичности у рекомбинантного белка MtbXthA и его мутантных форм (АП эндонуклеазная активность). Дорожки 1 и 6, 25 и 10 нМ MtbXthA; дорожка 2 – контроль THF•C; дорожки 3-5 MtbXthA-D180N; дорожки 7-9 – MtbXthA-N182A



**Рисунок 5** – Сравнение ДНК-субстрат специфичности у рекомбинантного белка MtbXthA и его мутантных форм (3'-фосфодиэстеразная активность). Дорожка 1 – контроль Echo20<sup>THF</sup>•RexT; дорожки 2-4 – MtbXthA; дорожки 5-7 – MtbXthA-D180N; дорожки 8-10 – MtbXthA-N182A.

Чтобы доказать, является ли это свойственной данной АП эндонуклеазе особенностью, или виден результат контаминации при очистке, были сконструированы и охарактеризованы каталитически неактивные мутантные формы MtbXthA-D180N и MtbXthA-N182A. Результаты показали, что все мутанты потеряли их ДНК-репарационные функции

(расщепление АП сайта и 3'-фосфодиэстеразную активность), а также 3'→5' экзонуклеазную активность. Основываясь на вышеупомянутом, можно предположить, что неспецифическая 3'→5' экзонуклеазная активность является свойственной особенностью MtbXthA фермента и данная активность, возможно, играет важную физиологическую роль.

#### Литература

- 1 World Health Organisation. Global Tuberculosis Report 2013 // . – 2013.
- 2 Schlosser-Silverman E., Elgrably-Weiss M., Rosenshine I., Kohen R., Altuvia S. Characterization of Escherichia coli DNA lesions generated within J774 macrophages // J Bacteriol. – 2000. – Т. 182. – № 18. – С. 5225-30.
- 3 Olano J., Lopez B., Reyes A., Lemos M.P., Correa N., Del Portillo P., Barrera L., Robledo J., Ritacco V., Zambrano M.M. Mutations in DNA repair genes are associated with the Haarlem lineage of Mycobacterium tuberculosis independently of their antibiotic resistance // Tuberculosis (Edinb). – 2007. – Т. 87. – № 6. – С. 502-8.
- 4 Blazquez J. Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance // Clin Infect Dis. – 2003. – Т. 37. – № 9. – С. 1201-9.
- 5 Friedberg E. C. DNA damage and repair // Nature. – 2003. – Т. 421. – № 6921. – С. 436-40.
- 6 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. – Т. 393. – № 6685. – С. 537-44.
- 7 Lindahl T. New class of enzymes acting on damaged DNA // Nature. – 1976. – Т. 259. – № 5538. – С. 64-6.
- 8 Fromme J.C., Banerjee A., Verdine G.L. DNA glycosylase recognition and catalysis // Curr Opin Struct Biol. – 2004. – Т. 14. – № 1. – С. 43-9.
- 9 Nunoshiba T., deRojas-Walker T., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R., Demple B. Activation by nitric oxide of an oxidative-stress response that defends Escherichia coli against activated macrophages // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1993. – Т. 90. – № 21. – С. 9993-7.
- 10 Puri R.V., Singh N., Gupta R.K., Tyagi A.K. Endonuclease IV Is the major apurinic/apyrimidinic endonuclease in Mycobacterium tuberculosis and is important for protection against oxidative damage // PLoS One. – 2013. – Т. 8. – № 8. – С. e71535.
- 11 Tsutakawa S.E., Shin D.S., Mol C.D., Izumi T., Arvai A.S., Mantha A.K., Szczesny B., Ivanov I.N., Hosfield D.J., Maiti B., Pique M.E., Frankel K.A., Hitomi K., Cunningham R.P., Mitra S., Tainer J.A. Conserved structural chemistry for incision activity in structurally non-homologous apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1 and endonuclease IV DNA repair enzymes // J Biol Chem. – 2013. – Т. 288. – № 12. – С. 8445-55.
- 12 Carpenter E.P., Corbett A., Thomson H., Adacha J., Jensen K., Bergeron J., Kasampalidis I., Exley R., Winterbotham M., Tang C., Baldwin G.S., Freemont P. AP endonuclease paralogues with distinct activities in DNA repair and bacterial pathogenesis // EMBO J. – 2007. – Т. 26. – № 5. – С. 1363-72.
- 13 Abeldenov S., Khassenov B. Cloning, expression and purification of recombinant analog of Taq DNA polymerase // Biotechnology. Theory and Practice. – 2014. – № 1. – С. 12-16.