

МРНТИ 34.15.27; 31.27.17;
76.29.53; 31.27.19

Научная статья

<https://doi.org/10.32523/2616-7034-2026-155-2-19-37>

Биохимическая и функциональная характеристика эндонуклеазы NucS из *Mycobacterium tuberculosis*

Ұ.Ө. Зейн¹, Б.Ш. Якупов², С.А. Тимошук³, А.М. Тургимбаева⁴,
Р. И. Берсимбай⁵, С.К. Абельденов^{6*}

^{1,3,5} Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, Астана, Казахстан.

^{2,4,6} Национальный центр биотехнологии, Астана, Казахстан.

E-mail: ¹zeinulan1@gmail.com, ²bakhtiyarkupov@gmail.com, ³savva_750@mail.ru,
⁴turgimbayeva@gmail.com, ⁵ribersim@gmail.com, ⁶abeldenov@biocenter.kz

Аннотация. Нарастающая лекарственная устойчивость *M. tuberculosis* обуславливает необходимость поиска новых молекулярных мишеней. Перспективным объектом в этом отношении является эндонуклеаза NucS — функциональный аналог канонической системы репарации ошибочно спаренных оснований MutS–MutL–MutH, отсутствующих у микобактерий.

В настоящей работе проведена биохимическая и функциональная характеристика NucS из *M. tuberculosis*. Рекомбинантные белки MtbNucS и MtbDnaN получены в системе *E. coli Arctic Express* (DE3). Показано, что MtbNucS проявляет избирательную нуклеазную активность в отношении субстратов с мисматчами G•T и U•G; оптимальные условия катализа — 25 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 40 мМ MgCl₂ и 2,5 мМ MnCl₂. Скользящий зажим MtbDnaN оказывает двухфазный дозозависимый эффект на активность фермента. Сайт-направленный мутагенез подтвердил ключевую роль остатков W52 и D137 в формировании активного центра NucS. Полученные данные обосновывают перспективность MtbNucS как мишени для разработки новых противотуберкулёзных препаратов.

Ключевые слова: туберкулез, *Mycobacterium tuberculosis*, NucS, репарация ДНК, репарация ошибочно спаренных оснований, антибиотикорезистентность.

Введение

По данным ВОЗ за 2021–2024 годы, Казахстан входит в число 30 стран с наиболее высокой распространённостью множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ) и устойчивого к рифампицину (РУ-ТБ) [1]. В 2023 году в стране зарегистрировано 14 000 случаев туберкулёза (70 на 100 000 населения), из которых 5 600 (28 на 100 000) приходилось на МЛУ-ТБ/РУ-ТБ [2].

Существующие антибиотики воздействуют на ключевые клеточные процессы, однако нарастающая лекарственная устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* существенно ограничивает их эффективность. Это обуславливает необходимость поиска новых молекулярных мишеней, среди которых особый интерес представляют системы репарации ДНК, играющие ключевую роль в выживаемости и вирулентности микобактерий [3].

В ходе инфекционного процесса геном *M. tuberculosis* непрерывно подвергается повреждающему воздействию со стороны макрофагов хозяина и антибиотиков, а системы репарации ДНК обеспечивают геномную стабильность патогена и его патогенность [4, 5]. Примечательно, что, в отличие от большинства организмов, *M. tuberculosis* лишён классических белков системы репарации неспаренных оснований (MMR) — MutS и MutL [6], несмотря на то что частота и спектр спонтанного мутагенеза у него сопоставимы с видами с функциональной репарацией ошибочно спаренных оснований [7], что указывает на существование альтернативного механизма репарации ошибочно спаренных оснований (MMR).

У микобактерий роль канонической системы MutS–MutL–MutH выполняет белок NucS. Делеция *nucS* у *M. smegmatis* воспроизводит фенотип MMR-дефицитных штаммов: резкое возрастание частоты мутаций, преобладание транзиций и усиление гомологичной рекомбинации. В комплексе с ДНК-полимеразой DnaE1 NucS обеспечивает исключительно низкий уровень мутагенеза — порядка 10^{-10} на нуклеотид за поколение [7].

Филогенетический анализ показывает, что NucS возник у архей после их дивергенции и был передан актинобактериям посредством горизонтального переноса генов, сопровождавшегося утратой системы MutS–MutL у их общего предка. За пределами актинобактерий и группы *Deinococcus-Thermus* NucS-подобные белки не обнаружены, что объясняет их мозаичное филогенетическое распределение [7].

Хотя ранее высказывалось предположение о том, что однонуклеотидные полиморфизмы в генах репарации и репликации лежат в основе гипермутабельности *M. tuberculosis* [8], их фактический вклад в мутагенез оказался незначительным. Вместе с тем были идентифицированы гипермутабельные клинические изоляты *M. tuberculosis* со сниженной активностью белка NucS [7], что подчёркивает его ключевую роль в поддержании геномной стабильности патогена.

Инактивация *nucS* у *M. smegmatis* повышает частоту мутаций примерно в 100 раз [9], а в зависимости от вида организма и антибиотика — в 86–280 раз, что сопоставимо с эффектом инактивации *mutS/mutL*, при которой прирост мутагенеза достигает 100–1000 раз [10].

Сравнительный анализ последовательностей NucS из *S. ambifaciens* и его ортологов из *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* и *C. glutamicum* показал высокую степень идентичности — 75%, 78% и 72% соответственно, — свидетельствующую о значительной эволюционной консервативности белка среди актинобактерий. Структурно N-концевой домен NucS отвечает за связывание ДНК, тогда как C-концевой RecB-подобный домен несёт каталитическую нуклеазную активность [11]. Каталитическая активность NucS дополнительно

усиливается при взаимодействии со скользящим зажимом: у архей эту роль выполняет PCNA, связывание с которым осуществляется через консервативный PIP-мотив [12].

Приведённые данные обосновывают перспективность ферментов репарации ДНК как молекулярных мишеней для разработки новых противотуберкулёзных препаратов в условиях нарастающей лекарственной устойчивости [3, 4, 13]. Настоящая работа посвящена биохимической и функциональной характеристике нуклеазы NucS из *M. tuberculosis*.

Материалы и методы исследования

Амплификация и клонирование генов *nucS* и *dnaN*

Гены *nucS* и *dnaN* амплифицировали из геномной ДНК *M. tuberculosis* H37Rv с использованием ДНК-полимеразы Phusion (1×HF буфер, 0,2 мМ дНТФ, 42 нг матрицы). Для клонирования *nucS* в pET28c(+) и pMBP-parallel2 использовали праймеры с сайтами NdeI/EcoRI и NcoI/EcoRI соответственно; для *dnaN* — праймеры с сайтами NdeI/BamHI. Температурный профиль для *nucS*: +98°C 1 мин; 35 циклов (+98°C 10 с, +55°C 30 с, +72°C 30 с); +72°C 7 мин; для *dnaN* — аналогично, но элонгация +72°C 1 мин и финальная +72°C 10 мин.

ПЦР-продукты очищали набором Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (NEB). Вставки и векторы гидролизовали соответствующими рестриктазами и лигировали при +4°C в течение 16 часов (50 нг вектора, 40 нг вставки, 0,5 ед. T4 ДНК-лигазы). Клетки *E. coli* DH5α трансформировали тепловым шоком; положительные клоны отбирали ПЦР-скринингом с праймерами T7 или M13. Плазмидную ДНК выделяли набором MiniPrep (Thermo Scientific) и верифицировали секвенированием по Сэнгеру.

Для амплификации генов использовали следующие праймеры (Таблица 1).

Таблица 1

Список праймеров

NdeI-MtbNucS_fw	5' GGTTCATATGAGTCGGGTGCGTCTAGTC 3'
EcoRI-MtbNucS_rv	5' CCGGAATTCCTCAGAACAGCCGGTACTCG 3'
NcoI-MtbNucS-parallel2	5' GCCATGGGAAGTCGGGTGCGTCTAGTC 3'
EcoRI-MtbNucS-parallel2	5' CCTTTGAATTCTCAGAACAGCCGGTACTCGCC 3'
NdeI-MtbDnaN	5' GGGTTTCATATGGACGCGGCTACGACAAGAGTTG 3'
BamHI-MtbDnaN	5' CGCGGATCCTCAGCCCGGCAACCGAAC 3'

Сайт-направленный мутагенез

Мутантные варианты NucS W52S и D137A получали методом сайт-направленного мутагенеза на векторе pMBP-parallel2/MtbNucS с использованием набора QuickChange® XL (Stratagene) и соответствующих пар праймеров. После ПЦР реакционную смесь (15 мкл) инкубировали с DpnI (0,5 мкл) при +37°C в течение 1 часа для деградации матричной ДНК, после чего трансформировали клетки *E. coli* DH5α тепловым шоком. Наличие целевых замен верифицировали секвенированием по Сэнгеру.

Для сайт-направленного мутагенеза использовали следующие праймеры (Таблица 2).

Таблица 2

Список праймеров для сайт-направленного мутагенеза

MtbNucS_W52S_Fw	5' GTTGAAC TCGATGAGTCCGCCGTGCT 3'
MtbNucS_W52S_Rv	5' GACTCATCGAGTTCAACGGCTTGTAG 3'
MtbNucS_D137A_Fw	5' GCGATCGGCCCCGTCGACCTGCTGT 3'
MtbNucS_D137A_Rv	5' TCGACGGGGCCGATCGCGGTCATGT 3'

Хроматографическая очистка рекомбинантных белков MtbNucS и MtbDnaN

Белки MtbNucS дикого типа и мутантные варианты W52S и D137A экспрессировали в *E. coli* Arctic Express (DE3), трансформированной соответствующими плазмидами pMBP-parallel2. Экспрессию индуцировали 0,5 мМ ИПТГ при OD₆₀₀ = 0,6 с последующей инкубацией при +18°C, 100 об/мин в течение 16 часов. Клетки осаждали (6000×g, +4°C, 7 мин), ресуспендировали в буфере 20 мМ Tris-HCl pH 8,0, 200 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА с ингибиторами протеаз и разрушали обработкой лизоцимом (3 мг/мл, 20 мин) и ультразвуком. Лизат осаждали центрифугированием (40 000×g, +4°C, 1 час). Очистку проводили последовательно на колонках MBPTrap HP, HisTrap, Q/SP и Sephacryl S-200 (все Cytiva) на системе ÄKTA go в градиенте мальтозы до 10 мМ.

Белок MtbDnaN экспрессировали аналогично из плазмиды pET28c(+)/MtbDnaN и очищали металл-хелатной хроматографией на колонке HisTrap HP в градиенте имидазола 50–500 мМ. Все белковые фракции хранили при –20°C в 50% глицерине.

Определение репарационной активности

Субстратную специфичность исследовали с использованием 22-мерных и 75-мерных ДНК-дуплексов формата X•N, где X — ошибочно спаренный нуклеотид (A, G, C, T или U) в TAMRA-меченой цепи, N — комплементарный нуклеотид (A, G, C или T) в противоположной цепи. Дуплексы получали отжигом в буфере 50 мМ KCl, 20 мМ HEPES-KOH (pH 7,5) при +65°C в течение 5 минут с последующим охлаждением до комнатной температуры в течение 1 часа.

Реакционная смесь (20 мкл) содержала 20 нМ субстрата 5'-TAMRA-X•N, 25 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 5 мМ DTT, 0,1 мг/мл BSA, 0,1% Triton X-100 и фермент в варьируемых концентрациях. Инкубацию проводили при +37°C; реакцию останавливали стоп-буфером (0,2% ДСН, 20 мМ ЭДТА). Продукты реакции обессоливали на колонках с сефадексом G25 (GE Healthcare, 7,5 М мочевины) и разделяли электрофорезом в денатурирующем 20% ПААГ (7,5 М мочевины, 0,5× TBE). Гели сканировали на системе Molecular Imager® PharoSFX™ и анализировали в программе Image Gauge v.4.0.

Список олигонуклеотидов, использованных для определения субстратной специфичности фермента (Таблица 3).

Таблица 3

Список олигонуклеотидов

U-22-TAMRA	TAMRA-d(CACTTCGGAUTGTGACTGATCC), где U - 2' дезоксиуридин
22-COMPL-G	5' GGATCAGTCACAGTCCGAAGTG 3'
U-75-TAMRA	TAMRA-d(CATTACAGCGCCTGCAAGCTCAATTAA TCGTAXTGCTACACTG-GAGTACCGGAGCGTCGTCATGACAACGAATGG), где X - 2'-deoxyuridine
75-mer_compl-G	5' CCATTTCGTTGTCATGACGACGCTCCGGTACTCCAGT GTAGCAGTACGAT-TAATTGAGCTTGCAGGCGCTGTAATG 3'
75-mer_compl-A	5' CCATTTCGTTGTCATGACGACGCTCCGGTACTCCAGT GTAGCAATACGAT-TAATTGAGCTTGCAGGCGCTGTAATG 3'
TAMRA - Mis-match-G	5' CGAACTGCCTGGAATCCTGACGACGTGTAGCGAACG ATCACCTCA 3'
TAMRA - Mis-match-T	5' CGAACTGCCTGGAATCCTGACGACTTGTAGCGAAC GATCACCTCA 3'
Mismatch-T-compl	5' TGAGGTGATCGTTCGCTACATGTCGTCAGGATTCCA GGCAGTTTCG 3'
Mismatch-C-compl	5' TGAGGTGATCGTTCGCTACACGTCGTCAGGATTCC AGGCAGTTTCG 3'
A-22-TAMRA	TAMRA-d(CACTTCGGAATGTGACTGATCC), где А в 10 положении
C-22-TAMRA	TAMRA-d(CACTTCGGACTGTGACTGATCC), где С в 10 положении
G-22-TAMRA	TAMRA-d(CACTTCGGAGTGTGACTGATCC), где G в 10 положении
T-22-TAMRA	TAMRA-d(CACTTCGGATTGTGACTGATCC), где Т в 10 положении
22-COMPL-T	5' GGATCAGTCACATTCGGAAGTG 3'
22-COMPL-A	5' GGATCAGTCACAATCCGAAGTG 3'
22-COMPL-C	5' GGATCAGTCACACTCCGAAGTG 3'
22-COMPL-G	5' GGATCAGTCACAGTCCGAAGTG 3'

Филогенетический анализ и построение модели

Аминокислотную последовательность MtbNucS получали из NCBI GenBank; поиск гомологов проводили алгоритмом BLASTp, множественное выравнивание — в программах Clustal Omega и MEGA11. Структуру гомолога EndoMS *T. kodakarensis* (PDB ID: 5GKE) загружали из базы данных PDB; предсказание структуры MtbNucS выполняли с использованием платформы AlphaFold. Наложение структур и сравнительный анализ расположения аминокислотных остатков проводили в программе PyMOL (Schrödinger, NY).

Результаты и обсуждение

Клонирование генов nucS и dnaN из M. tuberculosis в вектора pET28c(+) и pMBP-parallel2

Гены *nucS* (681 п.о.) и *dnaN* (1209 п.о.) были амплифицированы из геномной ДНК *M. tuberculosis* и клонированы в векторы pET28c(+) и pMBP-parallel2 по соответствующим сайтам рестрикции. Секвенирование по Сэнгеру подтвердило 100% идентичность полученных последовательностей референсным данным GenBank (NC_000962.3) и отсутствие мутаций. В результате были сконструированы плазмиды pET28c/MtbNucS, pMBP-parallel2/MtbNucS и pET28c/MtbDnaN.

Оптимизация экспрессии и очистка белка TEV

Для отщепления MBP-метки от гибридного белка MBP-NucS была получена рекомбинантная TEV-протеаза. Оптимальные условия экспрессии — 0,5 мМ ИПТГ, +18°C, ночная инкубация — были подобраны в штамме *E. coli Arctic Express* (DE3) путём сравнения трёх штаммов при различных концентрациях индуктора. Очистку проводили двухэтапно: аффинной хроматографией на колонке HisTrap HP (через N-концевую His-метку) с последующей катионообменной хроматографией на колонке SP HP (через C-концевую полиаргининовую метку). Полученная фракция TEV-протеазы (рис. 1) была использована для гидролиза MBP-NucS с целью высвобождения нативной формы NucS.

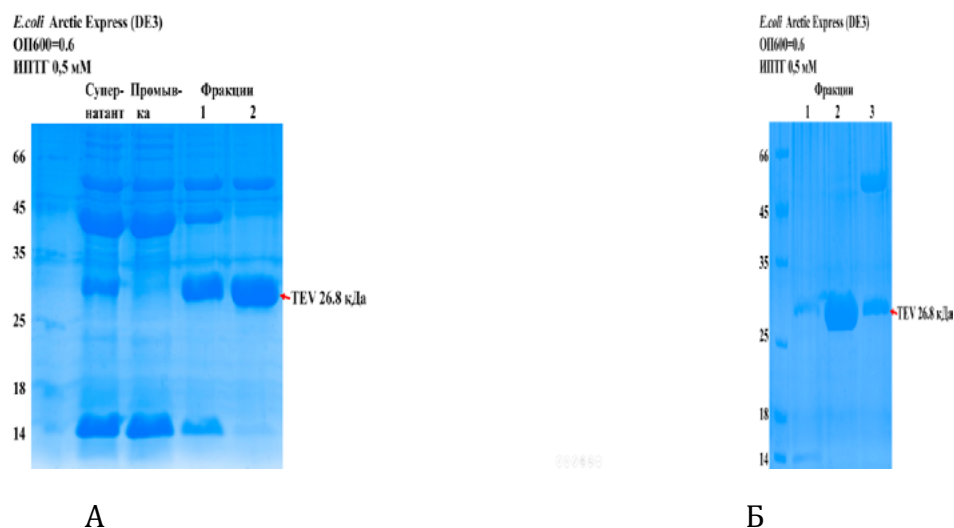


Рисунок 1. Гели двухэтапной очистки TEV-протеазы: (А) аффинная хроматография на колонке HisTrap HP, основанная на взаимодействии N-концевой гистидиновой метки с никельсодержащим сорбентом; (Б) ионно-обменная хроматография на катионообменной колонке SP HP, использующая положительный заряд C-концевой полиаргининовой метки для дополнительной очистки белка

Оптимизация условий экспрессии и хроматографическая очистка белка MtbNucS из вектора pET28c(+)/MtbNucS

Экспрессию белка NucS тестировали в трёх штаммах *E. coli* — Arctic Express (DE3), BL21 (DE3) и Rosetta2 (DE3). Наибольший уровень экспрессии был достигнут в штамме Arctic Express (DE3), тогда как в BL21 (DE3) и Rosetta2 (DE3) целевой белок определялся лишь в следовых количествах. Однако во всех условиях NucS преимущественно накапливался в нерастворимой фракции, что свидетельствует о его склонности к агрегации.

Дополнительная оптимизация в штамме Arctic Express (DE3) показала, что наилучшие результаты достигаются при индукции 0,5 мМ ИПТГ на стадии OD₆₀₀ = 0,6 с инкубацией при +18°C в течение 16 часов. Повышение концентрации ИПТГ и оптической плотности культуры до OD₆₀₀ = 0,8 приводило к снижению уровня экспрессии. При оптимальных условиях из 3 л культуры было получено воспроизводимое количество растворимого NucS, достаточное для биохимических экспериментов (рис. 2). В финальной фракции присутствовал шаперон Cpn60, удалить который полностью не удалось, однако его присутствие не влияло на каталитическую активность NucS.

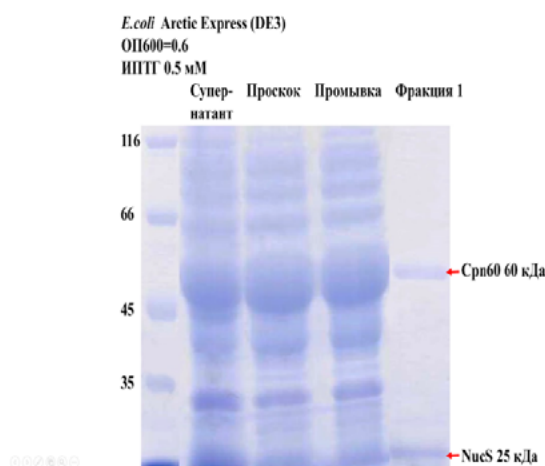


Рисунок 2. Электрофореграмма (SDS-PAGE) очистки рекомбинантного белка NucS.

Оптимизация условий экспрессии и хроматографическая очистка белка MtbNucS из вектора pMBP-parallel2/MtbNucS

Для повышения растворимости NucS использовали стратегию слияния с MBP на основе вектора pMBP-parallel2. Экспрессию гибридного белка MBP-NucS проводили в *E. coli* Arctic Express (DE3) (600 мл ЛБ, 0,5 мМ ИПТГ, OD₆₀₀ = 0,6, +18°C, 16 часов). После аффинной очистки на колонке MBPTrap была получена высокоочищенная фракция MBP-NucS с молекулярной массой ~70 кДа (рисунок 3).

Для высвобождения нативного NucS проводили гидролиз TEV-протеазой в различных условиях: +37°C (2 и 3,5 ч) и +4°C (16 ч) с варьированием количества протеазы (5–40 ед.). Во всех случаях расщепление оставалось неполным: на электрофорезе выявлялись полосы нерасщепленного MBP-NucS (~70 кДа), MBP (~45 кДа) и целевого NucS (~25 кДа). Неполный гидролиз, по всей видимости, обусловлен стерической недоступностью сайта расщепления или частичной агрегацией гибридного белка (рис. 3).

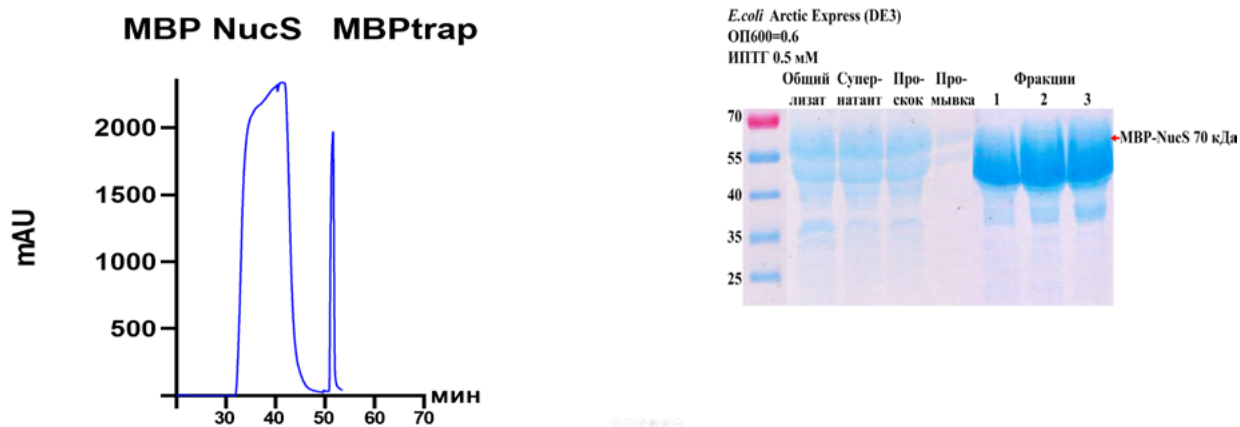


Рисунок 3. Результат хроматографической очистки рекомбинантного гибридного белка MBP-NucS из водорастворимой фракции на MBPTrap HP колонке: А – хроматограмма, Б – электрофореграмма

Для выделения целевого белка после гидролиза TEV-протеазой была применена аффинная хроматография на колонке HisTrap HP, обеспечивающая удержание His-меченой протеазы и свободного MBP. Электрофоретический анализ показал наличие двух компонентов: нерасщепленного MBP-NucS и целевого NucS, что свидетельствует об эффективном удалении свободного MBP (рис. 4).

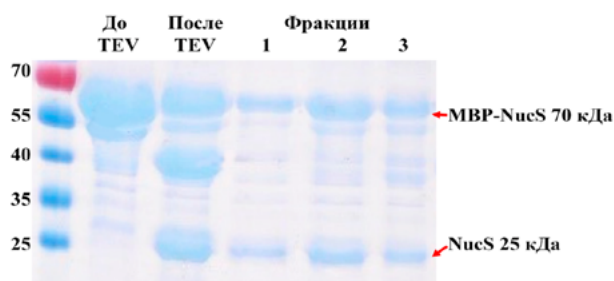


Рисунок 4. Очистка белка NucS после гидролиза TEV протеазой и разделение на MBP-NucS и NucS с использованием колонки HisTrap HP

Оптимальным соотношением для протеолиза оказалось 1 мкг/мл белка на 0,1 мкг/мкл TEV-протеазы, однако полного расщепления MBP-NucS достичь не удалось, по всей видимости, вследствие стерической недоступности сайта узнавания протеазы.

Финальную очистку NucS проводили гель-фильтрацией на колонке Sephacryl S-200, что позволило разделить компоненты смеси по гидродинамическому объёму, удалить остатки нерасщепленного MBP-NucS и TEV-протеазы и получить обогащенную фракцию целевого белка для последующих биохимических экспериментов (рис. 5).

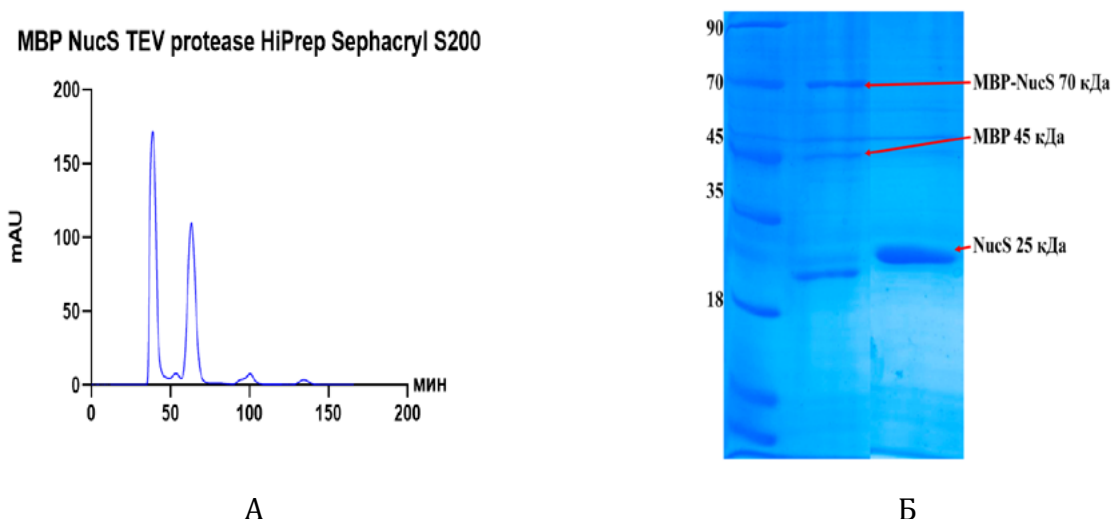


Рисунок 5. Хроматограмма (А) и электрофореграмма в SDS (Б) очистки рекомбинантного белка MBP-NucS на колонке Sephacryl S-200 после гидролиза TEV-протеазой

Хроматографическая очистка белка MtbDnaN из вектора pET28c(+)/MtbNucS

Рекомбинантный белок MtbDnaN был экспрессирован в *E. coli Arctic Express* (DE3) и очищен металл-хелатной хроматографией через N-концевую His-метку. Электрофоретический анализ подтвердил чистоту препарата на уровне ~95% (рис. 6). В растворе MtbDnaN существует в виде димера с молекулярной массой ~84 кДа.

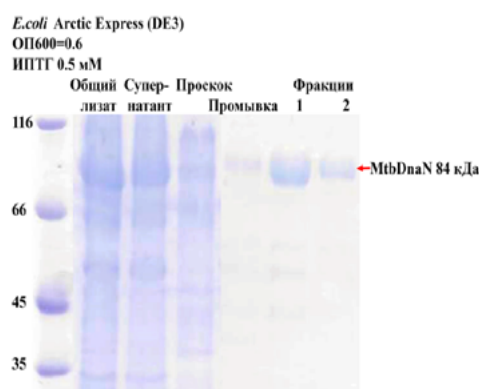


Рисунок 6. Электрофореграмма хроматографической очистки рекомбинантного белка MtbDnaN

Определение репарационной активности MtbNucS

Каталитическую активность NucS исследовали в реакции гидролиза 45-мерного субстрата 45GT (5'-TAMRA, 10 нМ) в буфере 25 мМ HEPES-NaOH (pH 6,5), 2,5 мМ MgCl₂, 5 мМ DTT, 0,1 мг/мл BSA, 0,1% Triton X-100 при +37°C в течение 1 часа. Была зафиксирована слабая, но воспроизводимая активность фермента (рис. 7), что может быть обусловлено неполным отщеплением MBP-метки, частичной агрегацией белка или необходимостью дополнительных кофакторов, в частности скользящего зажима DnaN.

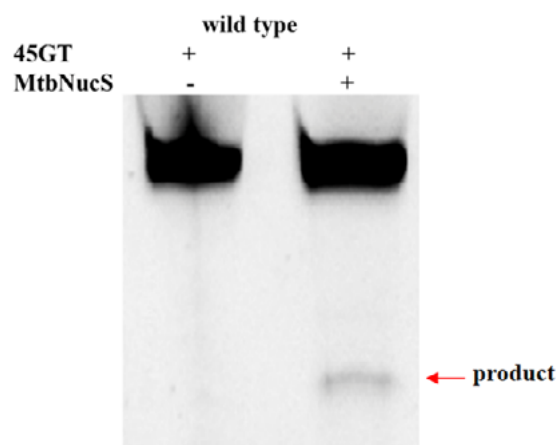


Рисунок 7. Определение активности белка NucS в отношении флуоресцентно-меченого субстрата 45GT (5'-TAMRA).

Для определения субстратной специфичности белка NucS была проведена серия реакций с набором 22-мерных олигонуклеотидных субстратов, меченных флуорофором TAMRA на 5'-конце, в стандартных реакционных условиях (25 mM Tris-HCl pH 8.0; 2,5 mM MgCl₂; 5 mM DTT; 0,1 мг/мл BSA; 0,1% Triton X-100; +37°C; 1 час). Анализ продуктов реакции показал, что белок NucS проявляет избирательную каталитическую активность в отношении субстрата, содержащего мисматч U•G — урацил напротив гуанина (рис. 8). Полученные данные согласуются с предполагаемой ролью NucS в распознавании и репарации ошибочно спаренных оснований.

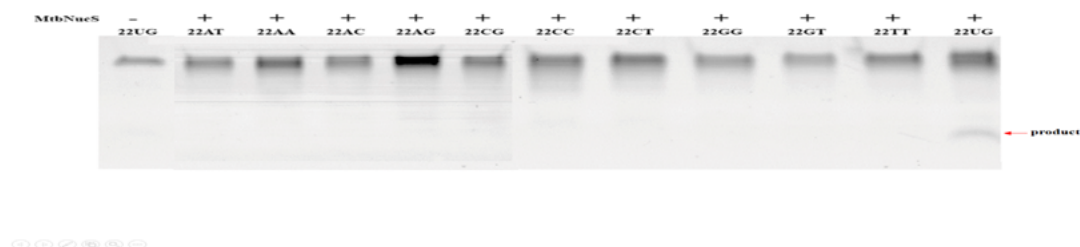
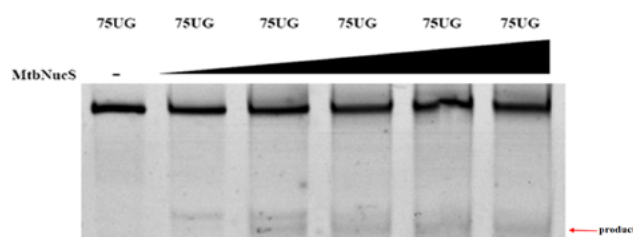


Рисунок 8. Активность белка NucS в отношении субстрата, содержащего урацил напротив гуанина

С целью оценки зависимости процессивности NucS от концентрации белка была проведена серия реакций с 75-мерным субстратом 75 UG, содержащим мисматч U•G и меченным TAMRA на 5'-конце, в аналогичных условиях (рис. 9). Результаты показали, что повышение концентрации белка NucS в реакционной смеси сопровождается умеренным, но воспроизводимым увеличением процессивности фермента в отношении данного субстрата. Дозозависимый характер активности свидетельствует о том, что каталитическая эффективность NucS определяется в том числе доступностью фермента относительно субстрата, что может иметь значение для регуляции репарационной активности в условиях клетки.



©©©©©©

Рисунок 9. Влияние концентрации белка NucS на процессивность при действии на субстрат 75GT (5'-TAMRA)

Зависимость эндонуклеазной активности MtbNucS от присутствия кофакторов металлов

Поскольку активность ряда эндонуклеаз MMR-систем зависит от двухвалентных ионов металлов [30, 31], было исследовано их влияние на активность NucS. Показано, что повышение концентрации $MgCl_2$ (рис. 10) и $MnCl_2$ концентрационно-зависимо стимулирует активность фермента, тогда как добавление $CoCl_2$ оказывает ингибирующее действие — частичное в комбинации с $MgCl_2$ и полное в комбинации с $MnCl_2$, вероятно вследствие конкуренции Co^{2+} за координационные центры активного сайта. Для дальнейших экспериментов были выбраны концентрации 40 mM $MgCl_2$ и 2,5 mM $MnCl_2$.

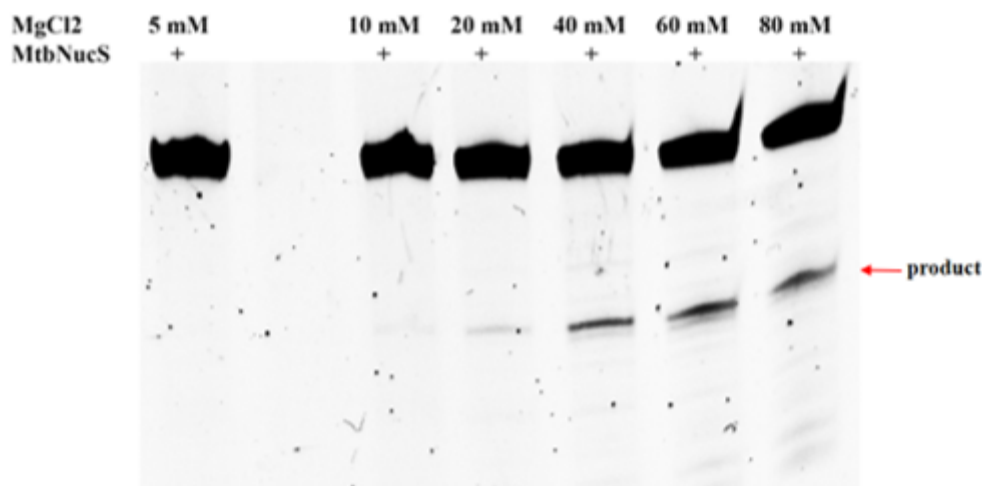


Рисунок 10. Влияние ионов $MgCl_2$ на активность белка NucS.

Стимуляция активности эндонуклеазы MtbNucS с помощью β -зажима

Скользкий зажим DnaN координирует активность ферментов репарации ДНК у *M. tuberculosis* [14, 15] и напрямую взаимодействует с NucS через консервативный пентапептидный мотив на С-конце последнего, стимулируя расщепление мисматч-содержащей ДНК [16, 17]. Критическая роль этого взаимодействия подтверждена на

модели *M. smegmatis* [18]. В нашей работе было установлено что добавление MtbDnaN к реакциям с NucS из обоих векторов вызывает двухфазный эффект: низкие концентрации DnaN умеренно стимулируют процессивность NucS, тогда как избыток белка приводит к практически полному подавлению гидролиза (рис. 11). Данный эффект может быть обусловлен нарушением стехиометрии комплекса NucS–DnaN и требует дальнейшего изучения.

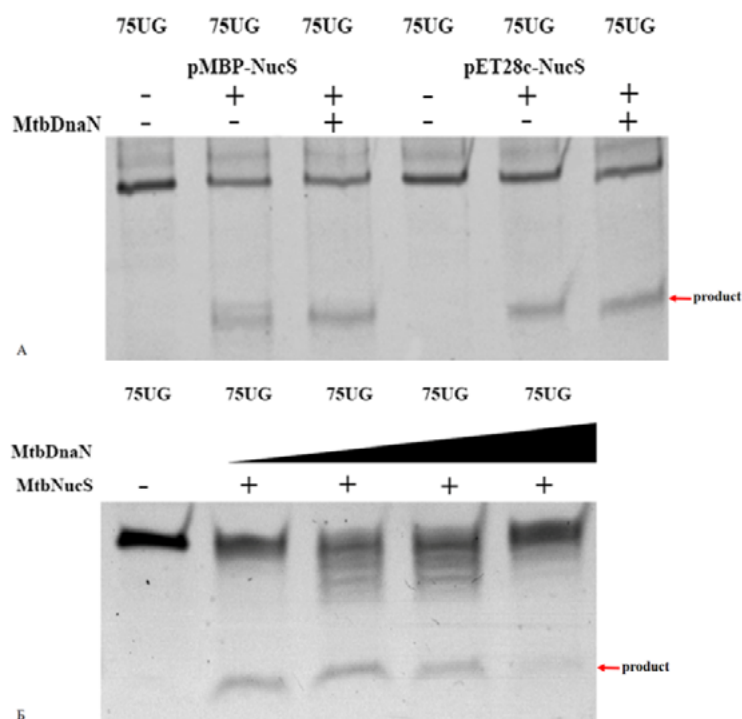
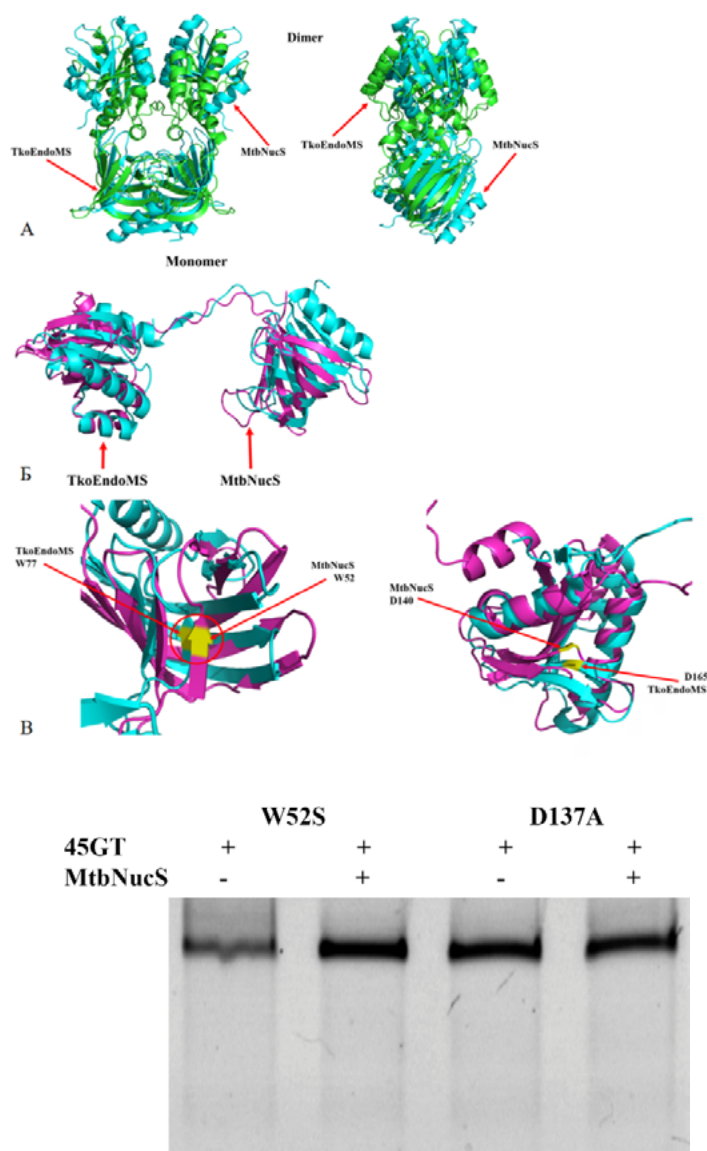


Рисунок 11. Влияние белка MtbDnaN на активность NucS (A) — реакция с добавлением MtbDnaN; (B) — влияние увеличения концентрации MtbDnaN на расщепление субстрата

Гомологичное моделирование и сайт направленный мутагенез

Сравнительный биоинформатический анализ NucS *M. tuberculosis* и EndoMS *T. kodakarensis* выявил консервативные остатки W52 и D137, соответствующие ключевым для взаимодействия с субстратом позициям W77 и D165 EndoMS [19]. Наложение AlphaFold-модели NucS на кристаллическую структуру EndoMS (PDB ID: 5GKE) в PyMOL подтвердило структурную консервативность данных остатков (рис. 12A). Мутантные варианты W52S и D137A, полученные сайт-направленным мутагенезом, практически полностью утрачивали активность в отношении субстрата 45GT, что экспериментально подтверждает ключевую роль этих остатков в катализе и консервативность механизма действия эндонуклеаз данного семейства у бактерий и архей (рис. 12Б).



Б

Рисунок 12. (А) Сравнение трёхмерных структур белков NucS *M. tuberculosis* и EndoMS *Thermococcus kodakarensis*. (Б) Активность нативного и мутантных вариантов белка NucS *M. tuberculosis* при гидролизе ДНК-субстрата 45GT.

Закключение

Была проведена биохимическая и функциональная характеристика нуклеазы NucS из *M. tuberculosis* — ключевого компонента альтернативной системы репарации ошибочно спаренных оснований, функционирующей у микобактерий вместо канонической системы MutS–MutL–MutH.

Гены *nucS* и *dnaN* были успешно клонированы в экспрессионные векторы pET28c(+) и pMBP-parallel2, а соответствующие рекомбинантные белки получены в системе *E. coli Arctic Express* (DE3). Показано, что белок MtbNucS проявляет нуклеазную активность в отношении ДНК-субстратов, содержащих мисматчи типа G•T и U•G. Оптимальные условия катализа определены как 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 40 mM MgCl₂ и 2,5 mM MnCl₂, при этом ионы Co²⁺ полностью ингибируют активность фермента. Установлено, что скользящий зажим MtbD-

paN оказывает дозозависимый двухфазный эффект на активность NucS: стимулирующий при низких концентрациях и ингибирующий при избытке белка. Биоинформатический анализ и сайт-направленный мутагенез подтвердили ключевую роль консервативных остатков W52 и D137 в формировании активного центра фермента и их функциональную аналогию с остатками W77 и D165 архейного гомолога EndoMS.

Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что MtbNucS обеспечивает геномную стабильность *M. tuberculosis* и, с учётом его уникальных структурно-функциональных особенностей и отсутствия гомологов у человека, представляет перспективную мишень для разработки новых противотуберкулёзных препаратов, актуальных в условиях нарастающей множественной лекарственной устойчивости.

Вклад авторов

Ұ.З. и С.А. – руководство исследованием, критический пересмотр содержания; **Ұ.З., Б.Я., С.Т. и А.Т.** – концептуализация, проведение экспериментов, обработка данных, подготовка аннотации, подготовка иллюстрированного материала и формулирование выводов; **Ұ.З., Р.Б., и С.А.** – редактирование текста, структурная и библиографическая проверка. Все авторы ознакомились с окончательной версией рукописи и одобрили её к публикации.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан в рамках грантового проекта AP19680500 «Изучение молекулярных механизмов репарации ошибочно спаренных нуклеотидов у возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis*».

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

Список литературы

1. Всемирная организация здравоохранения. Доклад: Глобальный доклад по туберкулёзу 2024 / Всемирная организация здравоохранения, 2024. – URL: <https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/7292c91e-ffb0-4cef-ac39-0200f06961ea/content>. (дата обращения 2025-23-10)
2. Всемирная организация здравоохранения. Информационный бюллетень: Профиль туберкулёза: Казахстан / Всемирная организация здравоохранения, 2025. – URL: <https://data.who.int/countries/398>. (дата обращения 2025-23-10)
3. Kurthkoti K., Kumar P., Sang P. B., Varshney U. Base excision repair pathways of bacteria: new promise for an old problem // Future Med Chem. – 2020. – Т. 12, № 4. – С. 339-355. <https://doi.org/10.4155/fmc-2019-0267>

4. Memar M. Y., Yekani M., Celenza G., Poortahmasebi V., Naghili B., Bellio P., Baghi H. B. The central role of the SOS DNA repair system in antibiotics resistance: A new target for a new infectious treatment strategy // *Life Sci.* – 2020. – T. 262. – C. 118562. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118562>
5. van der Veen S., Tang C. M. The BER necessities: the repair of DNA damage in human-adapted bacterial pathogens // *Nat Rev Microbiol.* – 2015. – T. 13, № 2. – C. 83-94. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3391>
6. Singh A. Guardians of the mycobacterial genome: A review on DNA repair systems in *Mycobacterium tuberculosis* // *Microbiology (Reading).* – 2017. – T. 163, № 12. – C. 1740-1758. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000578>
7. Castañeda-García A., Prieto A. I., Rodríguez-Beltrán J., Alonso N., Cantillon D., Costas C., Pérez-Lago L., Zegeye E. D., Herranz M., Płociński P., Tonjum T., García de Viedma D., Paget M., Waddell S. J., Rojas A. M., Doherty A. J., Blázquez J. A non-canonical mismatch repair pathway in prokaryotes // *Nat Commun.* – 2017. – T. 8. – C. 14246. <https://doi.org/10.1038/ncomms14246>
8. Rock J. M., Lang U. F., Chase M. R., Ford C. B., Gerrick E. R., Gawande R., Coscolla M., Gagneux S., Fortune S. M., Lamers M. H. DNA replication fidelity in *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by an ancestral prokaryotic proofreader // *Nat Genet.* – 2015. – T. 47, № 6. – C. 677-81. <https://doi.org/10.1038/ng.3269>
9. Zhang L., Jiang D., Wu M., Yang Z., Oger P. M. New Insights Into DNA Repair Revealed by NucS Endonucleases From Hyperthermophilic Archaea // *Front Microbiol.* – 2020. – T. 11. – C. 1263. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01263>
10. Cebrián-Sastre E., Martín-Blecua I., Gullón S., Blázquez J., Castañeda-García A. Control of Genome Stability by EndoMS/NucS-Mediated Non-Canonical Mismatch Repair // *Cells.* – 2021. – T. 10, № 6. <https://doi.org/10.3390/cells10061314>
11. Dagva O., Thibessard A., Lorenzi J. N., Labat V., Piotrowski E., Rouhier N., Myllykallio H., Leblond P., Bertrand C. Correction of non-random mutational biases along a linear bacterial chromosome by the mismatch repair endonuclease NucS // *Nucleic Acids Res.* – 2024. – T. 52, № 9. – C. 5033-5047. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae132>
12. Nakae S., Hijikata A., Tsuji T., Yonezawa K., Kouyama K. I., Mayanagi K., Ishino S., Ishino Y., Shirai T. Structure of the EndoMS-DNA Complex as Mismatch Restriction Endonuclease // *Structure.* – 2016. – T. 24, № 11. – C. 1960-1971. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.09.005>
13. Reiche M. A., Warner D. F., Mizrahi V. Targeting DNA Replication and Repair for the Development of Novel Therapeutics against Tuberculosis // *Front Mol Biosci.* – 2017. – T. 4. – C. 75. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00075>
14. Mulye M., Singh M. I., Jain V. From Processivity to Genome Maintenance: The Many Roles of Sliding Clamps // *Genes (Basel).* – 2022. – T. 13, № 11. <https://doi.org/10.3390/genes13112058>
15. Lata K., Vishwakarma J., Kumar S., Khanam T., Ramachandran R. *Mycobacterium tuberculosis* Endonuclease VIII 2 (Nei2) forms a prereplicative BER complex with DnaN: Identification, characterization, and disruption of complex formation // *Mol Microbiol.* – 2022. – T. 117, № 2. – C. 320-333. <https://doi.org/10.1111/mmi.14848>
16. Cebrián-Sastre E., Ruiz-Enamorado Á., Castañeda-García A. et al. Regulation of the expression of nucS, a key component of mismatch repair system in mycobacteria // *Antibiotics (Basel).* – 2025. – T. 14, № 11. – C. 1065. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14111065>
17. Takemoto N., Numata I., Su'etsugu M., Miyoshi-Akiyama T. Bacterial EndoMS/NucS acts as a clamp-mediated mismatch endonuclease to prevent asymmetric accumulation of replication errors // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – T. 46, № 12. – C. 6152-6165. <https://doi.org/10.1093/nar/gky481>

18. Rivera-Flores I. V., Wang E. X., Murphy K. C. *Mycobacterium smegmatis* NucS-promoted DNA mismatch repair involves limited resection by a 5'-3' exonuclease and is independent of homologous recombination and NHEJ // *Nucleic Acids Res.* – 2024. – Т. 52, № 20. – С. 12308-12323. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae895>

19. Ishino S., Nishi Y., Oda S., Uemori T., Sagara T., Takatsu N., Yamagami T., Shirai T., Ishino Y. Identification of a mismatch-specific endonuclease in hyperthermophilic Archaea // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – Т. 44, № 7. – С. 2977-86. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw153>

***Mycobacterium tuberculosis* алынған NucS эндонуклеазасының биохимиялық және функционалдық сипаттамасы**

**Ұ. Ө. Зейн¹, Б. Ш. Якупов², С. А. Тимощук³, А. М. Тургимбаева⁴,
Р. И. Берсимбай⁵, С. К. Абельденов^{6*}**

^{1,3,5} Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Астана, Қазақстан

^{2,4,6} Ұлттық биотехнология орталығы, Астана, Қазақстан

Аңдатпа. *M. tuberculosis*-тің дәріге төзімділігінің артуы жаңа молекулалық нысандарды іздестіруді қажет етеді. Бұл тұрғыдан перспективті объект болып микобактерияларда жоқ канондық MutS–MutL–MutH сәйкессіз негіздерді жөндеу жүйесінің функционалдық аналогы NucS эндонуклеазасы табылады.

Осы жұмыста *M. tuberculosis*-тен алынған NucS-тің биохимиялық және функционалдық сипаттамасы жүргізілді. MtbNucS және MtbDnaN рекомбинантты белоктары *E. coli Arctic Express* (DE3) жүйесінде алынды. MtbNucS G•T және U•G сәйкессіздіктері бар субстраттарға қатысты таңдамалы нуклеазалық белсенділік көрсететіні дәлелденді; катализдің оңтайлы жағдайлары — 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 40 mM MgCl₂ және 2,5 mM MnCl₂. MtbDnaN сырғымалы қысқышы ферменттің белсенділігіне екі фазалы дозаға тәуелді әсер етеді. Сайтқа бағытталған мутагенез W52 және D137 қалдықтарының NucS белсенді орталығының қалыптасуындағы маңызды рөлін растады. Алынған мәліметтер MtbNucS-ті жаңа туберкулезге қарсы препараттар әзірлеудің нысаны ретіндегі перспективтілігін негіздейді.

Түйін сөздер: туберкулез, *Mycobacterium tuberculosis*, NucS, ДНҚ репарациясы, қате жұпталған негіздерді жөндеу, антибиотикке төзімділік.

Biochemical and functional characterization of NucS endonuclease from *Mycobacterium tuberculosis*

**U.O. Zein¹, B.S. Yakupov², S.A. Timoshchuk³, A.M. Turgimbayeva⁴,
R.I. Bersimbay⁵, S.K. Abeldenov^{6*}**

^{1,3,5} L.N. Gumilyov Eurasian National University, Astana, Kazakhstan

^{2,4,6} National Center for Biotechnology, Astana, Kazakhstan

Abstract. The growing drug resistance of *M. tuberculosis* necessitates the search for new molecular targets. A promising candidate in this regard is the NucS endonuclease — a functional analog of the canonical MutS–MutL–MutH mismatch repair system, which is absent in mycobacteria.

In the present study, the biochemical and functional characterization of NucS from *M. tuberculosis* was performed. Recombinant proteins MtbNucS and MtbDnaN were expressed in the *E. coli* Arctic Express (DE3) system. MtbNucS was shown to exhibit selective nuclease activity toward substrates containing G•T and U•G mismatches; optimal catalytic conditions were 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 40 mM MgCl₂, and 2.5 mM MnCl₂. The sliding clamp MtbDnaN exerts a biphasic, dose-dependent effect on enzyme activity. Site-directed mutagenesis confirmed the critical role of residues W52 and D137 in the formation of the NucS active site. The data obtained support the potential of MtbNucS as a target for the development of novel antituberculosis drugs.

Keywords: tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, NucS, DNA repair, mismatch repair, antibiotic resistance.

References

1. World Health Organization. Report: Global Tuberculosis Report 2024 / World Health Organization, 2024. – URL: <https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/7292c91e-ffb0-4cef-ac39-0200f06961ea/content>. (дата обращения 2025-23-10)
2. World Health Organization. Fact sheet: Tuberculosis profile: Kazakhstan/ World Health Organization, 2025. – URL: <https://data.who.int/countries/398>. (дата обращения 2025-23-10)
3. Kurthkoti K., Kumar P., Sang P. B., Varshney U. Base excision repair pathways of bacteria: new promise for an old problem // *Future Med Chem.* – 2020. – Т. 12, № 4. – С. 339-355. <https://doi.org/10.4155/fmc-2019-0267>
4. Memar M. Y., Yekani M., Celenza G., Poortahmasebi V., Naghili B., Bellio P., Baghi H. B. The central role of the SOS DNA repair system in antibiotics resistance: A new target for a new infectious treatment strategy // *Life Sci.* – 2020. – Т. 262. – С. 118562. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118562>
5. van der Veen S., Tang C. M. The BER necessities: the repair of DNA damage in human-adapted bacterial pathogens // *Nat Rev Microbiol.* – 2015. – Т. 13, № 2. – С. 83-94. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3391>
6. Singh A. Guardians of the mycobacterial genome: A review on DNA repair systems in *Mycobacterium tuberculosis* // *Microbiology (Reading)*. – 2017. – Т. 163, № 12. – С. 1740-1758. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000578>
7. Castañeda-García A., Prieto A. I., Rodríguez-Beltrán J., Alonso N., Cantillon D., Costas C., Pérez-Lago L., Zegeye E. D., Herranz M., Płociński P., Tonjum T., García de Viedma D., Paget M., Waddell S. J., Rojas A. M., Doherty A. J., Blázquez J. A non-canonical mismatch repair pathway in prokaryotes // *Nat Commun.* – 2017. – Т. 8. – С. 14246. <https://doi.org/10.1038/ncomms14246>
8. Rock J. M., Lang U. F., Chase M. R., Ford C. B., Gerrick E. R., Gawande R., Coscolla M., Gagneux S., Fortune S. M., Lamers M. H. DNA replication fidelity in *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by an ancestral prokaryotic proofreader // *Nat Genet.* – 2015. – Т. 47, № 6. – С. 677-81. <https://doi.org/10.1038/ng.3269>
9. Zhang L., Jiang D., Wu M., Yang Z., Oger P. M. New Insights Into DNA Repair Revealed by NucS Endonucleases From Hyperthermophilic Archaea // *Front Microbiol.* – 2020. – Т. 11. – С. 1263. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01263>
10. Cebrián-Sastre E., Martín-Blecua I., Gullón S., Blázquez J., Castañeda-García A. Control of Genome Stability by EndoMS/NucS-Mediated Non-Canonical Mismatch Repair // *Cells.* – 2021. – Т. 10, № 6. <https://doi.org/10.3390/cells10061314>
11. Dagva O., Thibessard A., Lorenzi J. N., Labat V., Piotrowski E., Rouhier N., Myllykallio H., Leblond P., Bertrand C. Correction of non-random mutational biases along a linear bacterial

chromosome by the mismatch repair endonuclease NucS // *Nucleic Acids Res.* – 2024. – Т. 52, № 9. – С. 5033-5047. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae132>

12. Nakae S., Hijikata A., Tsuji T., Yonezawa K., Kouyama K. I., Mayanagi K., Ishino S., Ishino Y., Shirai T. Structure of the EndoMS-DNA Complex as Mismatch Restriction Endonuclease // *Structure.* – 2016. – Т. 24, № 11. – С. 1960-1971. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.09.005>

13. Reiche M. A., Warner D. F., Mizrahi V. Targeting DNA Replication and Repair for the Development of Novel Therapeutics against Tuberculosis // *Front Mol Biosci.* – 2017. – Т. 4. – С. 75. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00075>

14. Mulye M., Singh M. I., Jain V. From Processivity to Genome Maintenance: The Many Roles of Sliding Clamps // *Genes (Basel).* – 2022. – Т. 13, № 11. <https://doi.org/10.3390/genes13112058>

15. Lata K., Vishwakarma J., Kumar S., Khanam T., Ramachandran R. *Mycobacterium tuberculosis* Endonuclease VIII 2 (Nei2) forms a prereplicative BER complex with DnaN: Identification, characterization, and disruption of complex formation // *Mol Microbiol.* – 2022. – Т. 117, № 2. – С. 320-333. <https://doi.org/10.1111/mmi.14848>

16. Cebrián-Sastre E., Ruiz-Enamorado Á., Castañeda-García A. et al. Regulation of the expression of nucS, a key component of mismatch repair system in mycobacteria // *Antibiotics (Basel).* – 2025. – Т. 14, № 11. – С. 1065. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14111065>

17. Takemoto N., Numata I., Su'etsugu M., Miyoshi-Akiyama T. Bacterial EndoMS/NucS acts as a clamp-mediated mismatch endonuclease to prevent asymmetric accumulation of replication errors // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – Т. 46, № 12. – С. 6152-6165. <https://doi.org/10.1093/nar/gky481>

18. Rivera-Flores I. V., Wang E. X., Murphy K. C. *Mycobacterium smegmatis* NucS-promoted DNA mismatch repair involves limited resection by a 5'-3' exonuclease and is independent of homologous recombination and NHEJ // *Nucleic Acids Res.* – 2024. – Т. 52, № 20. – С. 12308-12323. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae895>

19. Ishino S., Nishi Y., Oda S., Uemori T., Sagara T., Takatsu N., Yamagami T., Shirai T., Ishino Y. Identification of a mismatch-specific endonuclease in hyperthermophilic Archaea // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – Т. 44, № 7. – С. 2977-86. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw153>

Сведения об авторах:

Зейн Ұлан Өтеғалиұлы – автор для корреспонденции, студент докторантуры по специальности «Биология», Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, Сатпаева, 2, 010000, Астана, Казахстан.

Якупов Бахтияр Шаттыкович – младший научный сотрудник ТОО «Национальный центр биотехнологии», шоссе Коргалжын, 13/5, 010000 Астана, Казахстан.

Тимощук Савва Александрович – студент магистратуры по специальности «Биология», Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, Сатпаева, 2, 010000, Астана, Казахстан.

Тургимбаева Айгерим Макашкызы – старший научный сотрудник ТОО «Национальный центр биотехнологии», шоссе Коргалжын, 13/5, 010000 Астана, Казахстан.

Берсимбай Рахметкажы Искендринович – академик НАН РК, доктор биологических наук, профессор. Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, Сатпаева, 2, 010000, Астана, Казахстан.

Абельдинов Сайлау Касенович – заведующий лабораторией молекулярной биотехнологии, ТОО «Национальный центр биотехнологии», шоссе Коргалжын, 13/5, 010000 Астана, Казахстан.

Авторлар туралы мәлімет:

Зейн Ұлан Өтеғалиұлы – хат-хабар авторы, «Биология» мамандығы бойынша докторантура студенті, Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Сәтпаев к., 2, 010000, Астана, Қазақстан.

Якупов Бахтияр Шаттыкович – «Ұлттық биотехнология орталығы» ЖШС кіші ғылыми қызметкері, Қорғалжын тас жолы, 13/5, 010000, Астана, Қазақстан.

Тимощук Савва Александрович – «Биология» мамандығы бойынша магистратура студенті, Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Сәтпаев к., 2, 010000, Астана, Қазақстан.

Тургимбаева Айгерим Макашкызы – «Ұлттық биотехнология орталығы» ЖШС аға ғылыми қызметкері, Қорғалжын тас жолы, 13/5, 010000, Астана, Қазақстан.

Берсімбай Рахметқажы Искендірович – ҚР ҰҒА академигі, биология ғылымдарының докторы, профессор. Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Сәтпаев к., 2, 010000, Астана, Қазақстан.

Абельдинов Сайлау Касенович – молекулалық биотехнология зертханасының меңгерушісі, «Ұлттық биотехнология орталығы» ЖШС, Қорғалжын тас жолы, 13/5, 010000, Астана, Қазақстан.

Authors' information:

Zein Ulan Utegalyuly – corresponding author, PhD student in Biology, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Satpayev St. 2, 010000, Astana, Kazakhstan.

Yakupov Bakhtiyar Shattykovich – Junior Researcher, National Center for Biotechnology LLP, Korgalzhyn Highway 13/5, 010000, Astana, Kazakhstan.

Timoshchuk Savva Alexandrovich – Master's student in Biology, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Satpayev St. 2, 010000, Astana, Kazakhstan.

Turgimbayeva Aigerim Makashkyzy – Senior Researcher, National Center for Biotechnology LLP, Korgalzhyn Highway 13/5, 010000, Astana, Kazakhstan.

Bersimbay Rakhmetkazhy Iskendiroyich – Academician of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, Doctor of Biological Sciences, Professor. L.N. Gumilyov Eurasian National University, Satpayev St. 2, 010000, Astana, Kazakhstan.

Abeldinov Sailau Kasenovich – Head of the Laboratory of Molecular Biotechnology, National Center for Biotechnology LLP, Korgalzhyn road 13/5, 010000, Astana, Kazakhstan.