

УДК 34.15.27; 31.27.17; 76.29.53; 31.27.19

Original Article

NUCS И ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ *Mycobacterium tuberculosis*: ПОТЕНЦИАЛ ДЛЯ НОВЫХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МИШЕНЕЙЯкупов Б.Ш.<sup>1</sup>, Зейн Ү.Ө.<sup>1</sup>, Тургимбаева А.М.<sup>2</sup>, Абельденов С.К.<sup>2\*</sup><sup>1</sup> Евразийский университет имени Л.Н. Гумилева, ул. К. Сатпаева 2, г. Астана, 010000, Республика Казахстан.<sup>2</sup> ТОО «Национальный центр биотехнологии», Кургальжинское шоссе 13/5, г. Астана, 010000, Республика Казахстан.

\* abeldenov@biocenter.kz

## АННОТАЦИЯ

Антибиотикорезистентность *Mycobacterium tuberculosis* представляет серьёзную угрозу для глобального здравоохранения. Казахстан входит в топ-30 стран с самым высоким уровнем туберкулёза с множественной лекарственной устойчивостью / туберкулез устойчивостью к рифампицину. Существующие антибиотики теряют эффективность из-за стремительного роста лекарственной устойчивости, поэтому ферменты репарации ДНК патогена рассматриваются как перспективные мишени для новых антибиотиков. В отличие от многих других бактерий, у *M. tuberculosis* нет классической репарации ошибочно спаренных нуклеотидов, вместо этого функционирует альтернативный путь, опосредованный эндонуклеазой NucS. В данной статье рассматривается роль NucS в обеспечении геномной стабильности *M. tuberculosis* и его участие в формировании антибиотикорезистентности. Обзор экспериментальных данных показывает, что инактивация NucS приводит к гипермутационному фенотипу, что повышает вероятность появления устойчивых к препаратам штаммов. Эти свойства делают NucS перспективной мишенью для антибактериальной терапии. Исследование NucS, как критически важного белка в патогенезе и устойчивости *M. tuberculosis*, открывает новые направления в разработке таргетных препаратов и стратегий подавления развития устойчивости.

**Ключевые слова:** туберкулез, *Mycobacterium tuberculosis*, NucS, репарация ДНК, антибиотикорезистентность, терапевтические мишени.

## ВВЕДЕНИЕ

Туберкулез вызывается бактериальным патогеном *Mycobacterium tuberculosis*, который распространяется по воздуху от больного человека к другому. Оседая в легких, патоген может перемещаться через кровь в другие части тела (почки, позвоночник, мозг) [1].

Согласно статистике Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в 2023 году зарегистрировано 1 250 000 смертей от туберкулеза, 10 800 000 людей заболело данным заболеванием. Туберкулез присутствует во всех странах и возрастных группах. [2].

Лечение туберкулеза основано на шестимесячном применении комбинированной терапии с несколькими антибиотиками: изониазид, рифампицин и пиперазид. Данная антибиотикотерапия может быть продлена до девяти месяцев в случае обширного заболевания. Несмотря на активность перечисленных антибиотиков Reviewирующихся микобактерий, сосуществование латентных бактерий влияет на эффективность лечения. Таким образом, требуется длительное применение препаратов, что может привести к развитию туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью [3].

Согласно данным ВОЗ за период с 2021 по 2024 годы, Казахстан входит в топ-30 стран с самым высоким уровнем туберкулёза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ) / туберкулез устойчивостью к рифампицину (РУ-ТБ) [4]. В Казахстане общая заболеваемость туберкулезом в 2023 составила 14 000 случаев (70 на 100 000 населения), 5 600 случаев (28 на 100 000 населения) заболеваемости МЛУ-ТБ / РУ-ТБ [5].

МЛУ-ТБ остается угрозой общественного здравоохранения, только около 2 из 5 человек с МЛУ-ТБ получили доступ к лечению в 2023 году. Окончание эпидемии ту-

беркулеза к 2030 году является одной из задач в области здравоохранения Целей устойчивого развития Организации Объединенных Наций [2]. Проблема антибиотикорезистентности *M. tuberculosis* актуальна во всем мире и требует дополнительных исследований для борьбы с патогеном.

Бактериальные патогены обладают значительным потенциалом для развития устойчивости к антимикробным агентам, используя различные механизмы, такие как модификация мишени для действия препарата, инактивация препарата и его выведение препаратов с помощью эффлюксных насосов [6]. Изучение механизмов физиологии бактериальных клеток необходимо для разработки новых стратегий борьбы с устойчивостью к антимикробным препаратам. Репарация ДНК представляет собой механизм восстановления ДНК и сохранения геномной информации, которая играет важную роль в биологических процессах бактерий, в том числе связанных с устойчивостью к антибиотикам. Механизмы репарации ДНК повышают устойчивость и толерантность бактерий к стрессу и, как следствие, к антимикробным агентам. Ферменты репарации ДНК могут быть потенциальными мишенями для разработки новых антимикробных препаратов. В данном обзоре мы сосредотачиваемся на центральной роли репарации ДНК *M. tuberculosis* в механизмах бактериальной устойчивости и его потенциале, как нового целевого механизма для контроля устойчивых штаммов патогена.

**Механизмы лекарственной устойчивости *M. tuberculosis***

Устойчивость *M. tuberculosis* к антибиотикам обычно обусловлена такими механизмами, как модификация мишени для действия препарата, инактивация препарата и его выведение препаратов с помощью эффлюксных насосов [7].

Кроме перечисленных механизмов, решающее значение для выживания и вирулентности возбудителя туберкулеза имеют миколовые кислоты в клеточной стенке. Миколовые кислоты представляют собой воскоподобные жирные кислоты, составляющие основную часть архитектуры клеточной стенки *M. tuberculosis*. Благодаря своей гидрофобной природе, миколовые кислоты обеспечивают защиту от обезвоживания, химических повреждающих бактерицидных агентов и антибиотиков [8, 9].

Клеточная стенка *M. tuberculosis* становится непреодолимым барьером для проникновения антибиотиков за счет активации откачивающих насосов и образования биопленок [3]. Эффлюксные насосы вытесняют молекулы антибиотиков, снижая внутримикобактериальные концентрации препарата до субингибирующих уровней, что способствует резистентности *M. tuberculosis*. Повышенная активность эффлюксного насоса может обуславливать внутреннюю резистентность, приобретенную множественную лекарственную устойчивость и толерантность к антибиотикам. При субоптимальном воздействии антибиотиков и повышенной экспрессии эффлюксных насосов, микобактерии имеют больше шансов приобрести и накопить мутации, приводящих к более высокому уровню лекарственной устойчивости. Эффлюксные насосы, индуцированные противомикобактериальными препаратами, могут иметь перекрывающуюся субстратную специфичность с другими противотуберкулезными препаратами, что объясняет перекрестную резистентность к нескольким лекарствам [10].

Биопленки с матриксом, состоящим из внеклеточной ДНК, углеводов, липидов и белков, защищают *M. tuberculosis* от антибиотиков и физико-химических стрессов. Следует отметить, что патогенные и непатогенные виды микобактерий способны образовывать биопленки, и эта способность не является механизмом вирулентности. Однако, биопленки могут защитить патогенные виды микобактерий от иммунной системы хозяина и помочь бактериям сохраняться во время лечения антибиотиками. [11]. Изучение микобактериальных биопленок занимает отдельную нишу исследований. Бактерии, живущие в биопленках, очень гетерогенны, и понимание их физиологии является сложной задачей. Учитывая физиологическую гетерогенность, резидентные бактерии биопленок демонстрируют фенотипическую толерантность к лекарственным средствам. Резидентные бактерии биопленки демонстрируют в 100-1000 раз более высокую минимальную ингибирующую концентрацию по сравнению с планктонными бактериями, что делает их лечение сложной задачей [12].

Используемые в настоящее время антибактериальные методы лечения в основном нацелены на ключевые клеточные процессы, такие как биосинтез клеточной стенки, ДНК репликация, транскрипция РНК, синтез белка, дыхание и топология ДНК. Множественная лекарственная устойчивость возбудителя туберкулеза делает его трудным для лечения при существующей антибиотикотерапии. Следовательно, существует острая необходимость в открытии новых клеточных путей и молекулярных мишеней, которые могут быть ингибированы новыми молекулами для контроля роста бактерий. Учитывая важную

роль механизмов репарации бактериальной ДНК в становлении инфекции, механизмы репарации ДНК также представляют собой уязвимые места, которые можно использовать для развития новых противомикробных препаратов [13].

В настоящее время проводятся исследования, посвященные роли ферментов репарации ДНК в защите от действия антибиотиков. Было показано, что нарушение бактериального механизма репарации двойных разрывов ДНК (double-strand break repair, DSBR) вызывает сенсibiliзирующий эффект против множества бактерицидных антибиотиков с различными механизмами действия. Удаление генов *recA* и *recB*, участвующих в DSBR, гиперсенсibilizировало клетки *E. coli* к ципрофлоксацину и нитрофурантоину, усилило чувствительность к канамицину и триметоприму, а также снизило толерантность к ампициллину. Что наиболее важно, сенсibilizующие эффекты были обнаружены в резистентных штаммах, что открывает возможность для разработки новых препаратов, направленных на нарушение DSBR, для преодоления устойчивости. Кроме того, было установлено, что активация высоко мутагенной реакции SOS зависит от DSBR, что дает основания полагать, что нарушение DSBR ограничит способность бактериальных популяций развивать дальнейшие мутации устойчивости к антибиотикам. То есть белки DSBR можно рассматривать, как перспективную мишень для разработки препаратов, которые значительно повысят эффективность существующих бактерицидных антибиотиков и подавят развитие антибиотикорезистентности [14].

Активация SOS-системы у бактерий связана не только с процессом восстановления поврежденной ДНК, но и представляет собой жизненно важный механизм в нескольких физиологических процессах бактерий, таких как детоксикация активных форм кислорода, горизонтальный перенос генов, состояние гипермутации, образование биопленки, персистенция и формирование малых вариантов колоний. SOS-система теоретически может быть ингибирована либо инактивацией RecA, либо ингибированием активности саморасщепления LexA [15, 16]. Инактивация LexA/RecA может привести к значительному снижению мутагенеза, вызванного антибиотиками. Несколько ингибиторов SOS-системы, в частности ингибиторы RecA, были описаны и могут использоваться для контроля развития устойчивости бактерий к антибиотикам, тем самым усиливая активность антибиотиков [17].

Таким образом, ферменты репарации ДНК патогенов уже рассматриваются в качестве потенциальных мишеней для разработки новых методов лечения инфекционных заболеваний. Антибиотики, направленные на традиционные мишени, становятся неэффективными из-за быстро развивающейся лекарственной устойчивости. Ферменты репарации ДНК могут обеспечить множество уязвимых мишеней для новых антибактериальных препаратов [13, 17, 18].

### Системы репарации *M. tuberculosis*

Геномная целостность *M. tuberculosis* в организме человека постоянно находится под угрозой из-за воздействия макрофагов хозяина и антибиотиков. Для выживания патогена в стрессовых условиях организма хозяина необходимо обеспечить поддержание и восстановление

генома с помощью механизмов репарации ДНК, которые играют важную роль в патогенезе [17, 19]. Исследование генома *M. tuberculosis* выявило гомологи почти всех основных систем репарации ДНК: эксцизионная репарация нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER), эксцизионная репарация оснований (base excision repair, BER), гомологичная рекомбинация (homologous recombination, HR) и негомологичное соединение концов (non-homologous end joining, NHEJ). Рибонуклеотиды, включенные во время репликации, удаляются путем эксцизионной репарации рибонуклеотидов (ribonucleotide excision repair, RER). При этом не было обнаружено гомологов классических участников репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (mismatch repair, MMR) [20].

**Эксцизионная репарация оснований.** Huffman J. L. и соавт. [21] доказали, что ряд поврежденных нуклеотидов, образовавшиеся в результате алкилирования, деаминации или окисления, восстанавливаются с помощью механизма BER.

Механизм BER начинается с распознавания и расщепления поврежденного основания специфической ДНК-гликозилазой. В результате чего образуется цитоксичный АП(апуриновый/апириимидиновый)-сайт в сахар-фосфатном остове. АП-сайты расщепляются АП-лиазами (например, EhoIII), которые гидролизуют сахарофосфатные связи, оставляя 3'-гидроксил и 5'-дезоксирибозу фосфат (dRP). Эти сайты дополнительно обрабатываются дезоксирибозо-фосфодиэстеразами (dRPаза, например Fpg, RecJ), с последующим действием ДНК-полимеразы для заполнения разрыва и ДНК-лигазы для лигирования разрывов [22].

**Гомологичная рекомбинация** обеспечивает высокоточное восстановление ДНК при двухцепочечных разрывах – одном из самых опасных типов повреждений, что важно в поддержании геномной стабильности *M. tuberculosis*. В условиях внутрифагосомного стресса, вызванного реактивными формами кислорода и азота, а также под действием антибиотиков, таких как фторхинолоны, гомологичная рекомбинация становится критически важной для выживания бактерии. Основными участниками этого пути у *M. tuberculosis* являются белки RecA, RecBCD, RuvABC и RecG, которые координируют распознавание разрыва, поиск гомологичной последовательности, обмен цепями и разрешение голидейных структур. RecA, в частности, катализирует центральный этап – гомологичный обмен ДНК, и одновременно регулирует SOS-ответ на повреждение генома, что может способствовать развитию лекарственной устойчивости [15, 20, 23]. Нарушение компонентов гомологичной рекомбинации снижает жизнеспособность бактерии в стрессовых условиях и повышает чувствительность к антибиотикам, что делает элементы этой системы потенциальными терапевтическими мишенями. Однако высокая степень консервативности некоторых белков, таких как RecA, между прокариотами и эукариотами ограничивает их прямую лекарственную нацеленность без риска побочных эффектов у хозяина [17].

**Эксцизионная репарация нуклеотидов.** Эксцизионная репарация нуклеотидов (NER) – это низкоспецифичная система репарации, в которой удаляется весь повре-

жденный нуклеотид, а не только основание. Huffman J. L. и соавт. Показали, что данный механизм служит альтернативным путем для более широкого круга субстратов [20]. У большинства бактерий репарация инициируется действием эксинуклеазы UvrABC. Распознавание повреждения происходит троичным комплексом (UvrA)<sub>2</sub>UvrB, после чего привлекается эндонуклеаза UvrC. Эндонуклеаза UvrC расщепляет седьмой или восьмой нуклеотид выше и четвертый или пятый нуклеотид ниже повреждения, что приводит к удалению около 12-13 нуклеотидов [24, 25]. ДНК-хеликаза UvrD устраняет вырезанную ДНК, а ДНК-полимераза Pol I заполняет пробел, за которым следует действие ДНК-лигазы. Кроме того, фактор сопряжения транскрипции и репарации Mfd, который распознает поврежденную ДНК в остановившейся единице транскрипции, рекрутирует троичный комплекс UvrA<sub>2</sub>B для инициирования сопряженной с транскрипцией репарацию ДНК [26].

**Эксцизионная репарация рибонуклеотидов.** Рибонуклеотиды вставляются в ДНК из-за ошибок, происходящих в процессе репликации. Низкоточные полимеразы повышают вероятность их включения в ДНК. Также возникает необходимость удалять участки РНК, образующиеся при действии праймазы во время формирования фрагмента Оказаки, что может стать проблемой. Согласно данным Oivanen M. и соавт. [27], фосфатные связи, содержащие rNTP, легко гидролизуются, что приводит к образованию разрывов и остановке репликационной вилки. Рибонуклеотиды удаляются с помощью ферментов РНКазы H, которые разрушают РНК в гибриде ДНК/РНК. Механизм RER осуществляется благодаря скоординированному взаимодействию РНКазы H2 и ДНК-полимеразы I (Pol I). В *E. coli* рибонуклеотиды также могут быть вырезаны белками механизма NER в случае потери активности РНКазы H, однако, это предстоит подтвердить у микобактерий. РНКазы H2 разрывает 3'-гидроксильный и 5'-фосфатный концы, которые затем «транслируются по разрыву» с помощью Pol I по классическому механизму [28]. *M. tuberculosis* RnhB (РНКазы H2) и *M. smegmatis* RnhB не были охарактеризованы биохимически. Установление четких ролей ферментов РНКазы в *M. tuberculosis* может обеспечить возможное понимание регуляции использования нуклеотидов множественными ферментами репарации во время стационарной фазы [20].

**Репарация двойных разрывов ДНК.** Двойные разрывы ДНК могут быть летальными для делящихся клеток, и поэтому их репарация крайне важна. Gupta R. и соавт. [23] показали, что микобактерии используют три различных механизма для репарации двойных разрывов ДНК: гомологичная рекомбинация (HR), негомологичное соединение концов (NHEJ) и аннелирование одноцепочечных участков (single-strand annealing, SSA), в то время как у *E. coli* существует только один механизм. Singh A. [20] утверждает, что HR является наиболее точным механизмом репарации двойных разрывов ДНК среди трёх, необходимость второй неповрежденной копии ДНК в качестве матрицы ограничивает его применение только на пострепликационных стадиях клеточного цикла. NHEJ может быть либо безошибочным (если концы соединяются напрямую), либо мутагенным (если концы модифицируются

нуклеазами или полимеразами). Поскольку NHEJ является основным путём в нереплицирующихся клетках, он может играть значительную роль в персистенции и патогенезе *M. tuberculosis*. Механизм SSA включается в действие, когда двойные разрывы ДНК окружены повторяющимися участками с обеих сторон.

**Репарация ошибочно спаренных нуклеотидов.** Репарация ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR) – это практически повсеместно встречающийся механизм, играющий ключевую роль в поддержании стабильности генома. Белки семейств MutS и MutL выполняют основные функции в процессе коррекции несоответствий. Данный механизм направлен на обнаружение и удаление ошибочно спаренных нуклеотидов, которые возникают в результате репликационных ошибок, когда ДНК-полимераза встраивает неверные основания. Iyer, R. R. и соавт. [29] утверждают, что для их исправления система способна распознать неправильно сочетающиеся, хоть и химически нормальные, нуклеотиды и отличить вновь синтезированную цепь от родительской. Несмотря на важность этого механизма, белки MutS и MutL отсутствуют почти у всех представителей *Actinobacteria* и у многих *Archaea*. Однако, Castañeda-García A. и соавт. [30] показали, что эти организмы демонстрируют скорость и спектр спонтанных мутаций, схожие с видами, обладающими системой MMR, что указывает на существование альтернативного, неклассического механизма репарации (не каноническая репарация ошибочно спаренных нуклеотидов), не основанного на MutS-MutL.

Исследование мисматч репарации ДНК открывает новое направление в понимании гипермутабельных штаммов *M. tuberculosis*. Остается неизвестным, имеют ли эти гипермутабельные варианты сниженную активность NucS из-за полиморфизмов в генах *nucS*, как это наблюдается у других белков репарации ДНК.

**Неканоническая репарация ошибочно спаренных нуклеотидов.** Одним из участников неканонической репарации ошибочно спаренных нуклеотидов является эндонуклеаза NucS, которая была обнаружена в *Pyrococcus abyssi* [31]. Ren B. и соавт. [32] изучали эндонуклеазу NucS в качестве партнера скользящего зажима, который увеличивает ее процессивность. В последствии эндонуклеазу NucS стали обнаруживать среди других организмов, не имеющих канонической MMR системы, включая актинобактерии [33].

Филогенетический анализ полной последовательности белка указывает на то, что NucS возник после дивергенции архей, в результате перестройки его доменов. Позднее NucS, по-видимому, был передан отдельным видам из группы *Deinococcus-Thermus* в ходе как минимум одного случая горизонтального переноса. Затем последовал горизонтальный перенос гена *nucS* от архей к актинобактериям, сопровождавшийся утратой системы MutS-MutL у последнего общего предка актинобактерий, так как большинство современных видов, содержащих NucS, не имеют этих компонентов. Это подтверждается тем, что за пределами актинобактерий и группы *Deinococcus-Thermus* не было обнаружено ни одного бактериального вида, содержащего NucS или схожие белки. Предложенная модель объясняет сложное распределение белка NucS и его

отсутствие у эукариот, большинства бактерий и некоторых архей [30].

Системы NucS и MutS-MutL, как правило, присутствуют в разных организмах по отдельности, и лишь в редких случаях – одновременно. У актинобактерий, возможно, приобретение гена *nucS* способствовало последующей утрате *mutS-mutL*, несмотря на то что эти канонические белки чрезвычайно широко распространены среди бактерий.

С другой стороны, существуют две группы организмов (*Halobacteria* и некоторые представители *Deinococcus-Thermus*), у которых системы NucS и MutS-MutL сосуществуют. У представителя *Halobacterium salinarum* инактивация генов *mutS* или *mutL* не приводила к гипермутабельности [34]. Поэтому можно предположить, что белки MutS и MutL являются избыточными по отношению к альтернативной системе, контролирующей спонтанные мутации. Это указывает на то, что эволюция данных конкретных видов могла выбрать сохранение обеих систем. Возможное взаимодействие между этими путями еще предстоит выяснить. Системы NucS и MutS-MutL, по всей видимости, отсутствуют у некоторых видов, поэтому не исключено существование дополнительных альтернативных механизмов MMR, которые еще предстоит идентифицировать [30].

*E. coli* имеет классическую MMR-систему, основанную на комплексе MutS-MutL-MutH, тогда как *M. tuberculosis* лишена этих генов. MMR-система *Escherichia coli* включает следующие белки: MutS, MutL и MutH. MutS сканирует ДНК и распознаёт несоответствующие пары оснований. MutL физически взаимодействует с MutS, усиливает распознавание ошибочно спаренных нуклеотидов и рекрутирует MutH, активируя его. MutH узнаёт полуметилированные участки dGATC и делает разрез строго в неметилированной (дочерней) цепи. Хеликаза II (UvrD) загружается в месте разрыва и раскручивает ДНК в направлении ошибочно спаренных нуклеотидов, создавая одноцепочечный участок. Удалённый участок восполняется с помощью ДНК-полимеразы III и лигируется ДНК-лигазой. На рисунке 1 показаны различия в MMR-системе *E. coli* и *M. tuberculosis*.

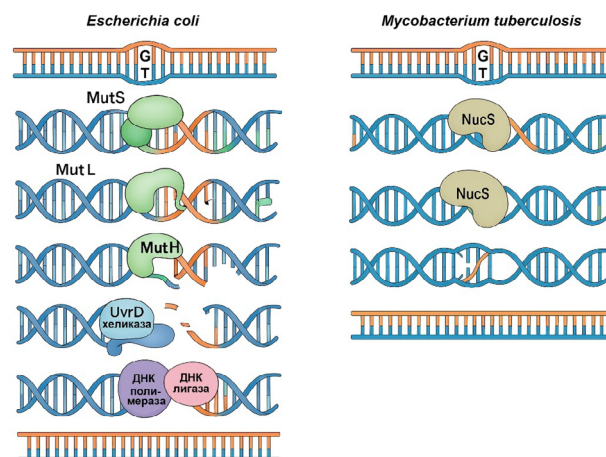


Рисунок 1 – Различия в репарации ошибочно спаренных нуклеотидов у *E. coli* и *M. tuberculosis*

У микобактерий отсутствует классическая система MutS–MutL–MutH. Вместо неё используется альтернативный путь с участием белка NucS. После репликации в ДНК может появиться пара ошибочно спаренных нуклеотидов. NucS специфически распознаёт ошибочно спаренные нуклеотиды и связывается с двуцепочечной ДНК в области ошибки. NucS осуществляет разрез в цепях, возможно в комплексе с дополнительными белками. После удаления повреждённого участка восстановление может происходить по механизму, аналогичному гомологичной рекомбинации, с участием репарационных полимераз и лигаз.

В заключение, репарация ошибочно спаренных нуклеотидов – это механизм, который может быть осуществлен как через путь MutS-L, так и через путь NucS. Понимание механизмов и путей, влияющих на стабильность генома, может открыть новые стратегии для борьбы с развитием антибиотикорезистентности. Кроме того, генетически модифицированные штаммы *Mycobacterium*, лишённые этого пути предотвращения мутаций, могут стать ценными инструментами для оценки лечения туберкулеза, включая новые препараты, комбинации препаратов и режимы, не основанные на антибиотиках.

#### Потенциальные терапевтические мишени репарации ДНК у *M. tuberculosis*

Разработка новых антимикробных препаратов требует выявления специфических мишеней, вмешательство в которые нарушает жизненно важные функции бактериаль-

ной клетки без вреда для организма-хозяина. Одним из таких направлений является подавление механизмов репарации ДНК у *M. tuberculosis*, поскольку именно эти механизмы обеспечивают бактерии устойчивость к мутагенным факторам, действию антибиотиков и внутриклеточному стрессу.

Наиболее активно изучаемые белки, такие как RecA (механизм HR), MutM, FpgG2, XthA (механизм BER), безусловно играют важную роль в репарации и клеточной выживаемости. Однако их широкая консервативность и наличие гомологов у человека ограничивают возможность их фармакологического ингибирования без риска перекрёстной токсичности.

На этом фоне особый интерес представляет NucS, эндонуклеаза неканонического пути исправления ошибок спаривания, отсутствующая у человека. Эта уникальность делает NucS высокоспецифичной мишенью: её ингибирование не затрагивает клетки хозяина, но может дестабилизировать бактериальный геном и снизить адаптационный потенциал. Более того, исследования показали, что NucS контролирует уровень спонтанного мутагенеза у микобактерий [35], что напрямую связано с формированием лекарственной устойчивости.

В таблице 1 представлен сравнительный анализ NucS и других потенциальных терапевтических мишеней в системах репарации ДНК у *M. tuberculosis*, включая их функции, степень изученности, преимущества и ограничения для антимикробной терапии.

Таблица 1 - Потенциальные терапевтические мишени репарации ДНК у *M. tuberculosis*

| Белок     | Функция   | Путь репарации  | Преимущества как мишени                                     | Ограничения                    | Ссылки   |
|-----------|---|---|---|--------------------------------|----------|
| NucS      | Распознавание и разрезание ошибочно спаренных пар нуклеотидов | Неканоническая репарация ошибочно спаренных нуклеотидов | Уникальность пути, нет у человека                           | Неясен механизм <i>in vivo</i> | [30, 32] |
| RecA      | Инициация SOS-ответа, участие в рекомбинации                  | Гомологичная рекомбинация                               | Важная роль в устойчивости                                  | Есть гомологи у человека       | [15, 17] |
| MutM      | Удаление 8-охоG   | Экцизионная репарация оснований                         | Устойчивость к окислительному стрессу                       | Есть гомолог у человека        | [13]     |
| XthA      | Расщепление АП-сайтов   | Экцизионная репарация оснований                         | Взаимодействие с ферментами экцизионной репарации оснований | Недостаточно охарактеризован   | [22]     |
| Ku / LigD | Репарация двухцепочечных разрывов                             | Негомологичное соединение концов ДНК                    | LigD бактериоспецифичен                                     | У человека есть гомологи Ku    | [23]     |

|                |   |                                   |  |  |          |
|----------------|---|-----------------------------------|--|--|----------|
| UvrA/B/<br>C/D | Удаление объёмных повреждений ДНК                         | Экцизионная репарация нуклеотидов | Роль в устойчивости к стрессу (окислительный стресс, воздействие химических и физических мутагенов). | Есть гомологи у человека   | [36, 37] |
| MutT           | Гидролиз мутагенных окисленных форм гуанозина             | Экцизионная репарация оснований   | Связь с гипермутацией  | Есть гомологи у человека   | [38]     |
| FpgG2          | Удаление окисленных пуриновых оснований (особенно 8-охоG) | Экцизионная репарация оснований   | Важен при окислительном стрессе, может работать совместно с MutM                                     | Имеет гомологи у эукариот; биохимическая характеристика ограничена | [13, 20] |
| Ung            | Урацил-ДНК-гликозилаза                                    | Экцизионная репарация оснований   | Ассоциирован с устойчивыми штаммами  | Мало данных  | [20]     |
| RuvABC         | Разрешение голиидейных структур                           | Гомологичная рекомбинация         | Уникальная структура у бактерий  | Трудно ингибировать  | [20]     |

На основании сравнительной таблицы 1, можно сделать вывод, что NucS представляет собой наиболее перспективного кандидата для разработки новых антимикробных препаратов. Это обусловлено несколькими ключевыми факторами. Во-первых, NucS является частью неканонического пути репарации ошибочно спаренных оснований, который отсутствует у человека, что снижает риск перекрёстной токсичности и делает мишень более специфичной для бактерий. Во-вторых, белок участвует в контроле мутагенеза, влияя на скорость возникновения устойчивости к антибиотикам. Следовательно, ингибирование NucS может не только ослаблять жизнеспособность микобактерий, но и препятствовать их адаптации к терапии. Кроме того, в отличие от других мишеней (например, RecA, MutM, UvrA), NucS не имеет высококонсервативных эукариотических гомологов, что делает его привлекательным для селективного фармакологического воздействия. Несмотря на то, что уровень функциональной изученности NucS пока ниже, чем у некоторых других компонентов систем репарации, именно его бактериоспецифичность, влияние на геномную стабильность и отсутствие аналогов у человека делают его приоритетной мишенью для дальнейших исследований и разработки ингибиторов с потенциальным терапевтическим применением.

#### Структурно-функциональная характеристика NucS

Анализ обширной библиотеки мутантов *M. smegmatis* выявил, что NucS играет ключевую роль в предотвращении мутаций у представителей *Actinobacteria*. Генетический анализ показал, что отсутствие гена NucS у *M. smegmatis* приводит к фенотипам, практически идентичным тем, что характерны для бактерий с нарушенной системой MMR: резко повышенная частота мутаций, преобладание переходов в спектре мутаций и увеличение

уровня гомологичной рекомбинации. Антимутационная функция NucS также была подтверждена у другого представителя *Actinobacteria* – *Streptomyces coelicolor*. Всё это указывает на то, что NucS представляет собой важный элемент системы репарации ДНК. В комплексе с высокоточной ДНК-полимеразой DnaE1 и её корректирующим доменом РНР NucS обеспечивает чрезвычайно низкую частоту мутаций ( $10^{-10}$  на нуклеотид за одно поколение), поддерживая стабильность генома и точность репликации у микобактерий и других актинобактерий [30].

Ранее Rock J.M. и соавт. [39] предполагали, что однонуклеотидные полиморфизмы в генах, отвечающих за репарацию и репликацию ДНК, могут быть источником гипермутаций у *M. tuberculosis*. Однако, Castañeda-García A. и соавт. [30] зафиксировали лишь незначительное повышение уровня мутаций, связанное с полиморфизмами (например, в экзонуклеазном домене РНР ДНК-полимеразы DnaE1). При этом имеются данные о гипермутабельных вариантах *M. tuberculosis* с пониженной активностью белка NucS [30], насколько это связано с вирулентностью и адаптацией к антибиотикам предстоит выяснить.

Было выявлено, что в отличие от архейных белков NucS очищенный микобактериальный гомолог связывается с одноцепочечной ДНК, но не с двухцепочечной ДНК. Значимой специфической активности по разрезанию несоответствующих участков выявлено не было [32, 40]. Вероятно, что для активации белка NucS в *M. smegmatis* необходимо взаимодействие с другими партнёрами и/или модификации, например, посттрансляционные. Также нельзя исключать функциональные различия между бактериальными и архейными белками NucS. Поэтому необходимы дополнительные исследования, чтобы определить, совпадают ли функциональные особенности NucS у микобактерий и архей [30].

Повреждение гена эндонуклеазы NucS у *M. smegmatis* увеличивает частоту мутаций в 100 раз [41]. Кроме того, нокаут гена *nucS* увеличивает скорость мутации примерно в 86-280 раз в зависимости от организма и антибиотика. При внедрении дикого гена *nucS* в штамм, уровень мутаций восстанавливается. Схожие результаты выявляются при отключении генов *mutS* или *mutL*, но скорость образования мутации увеличивается 100-1000 раз [33].

Кристаллографический анализ показал, что ферментативная активность NucS основана на гантелеобразной двухдоменной структуре. N- и C-концевые домены расположены на расстоянии около 28 Å друг от друга и соединены длинным полипептидным линкером, состоящим из 115-125 аминокислотных остатков [32]. NucS, также известный как EndoMS, функционирует как димер: два субъединичных домена А и Б взаимодействуют между собой, образуя симметричный комплекс. Каждый мономер NucS разрезает одну из цепей ДНК вблизи пары ошибочно спаренных нуклеотидов. На рисунке 2 представлена кристаллическая структура белка EndoMS *Thermococcus kodakarensis* (PDB ID: 5GKE) в комплексе с ДНК, содержащей пару ошибочно спаренных нуклеотидов.

При сравнении с NucS из *Streptomyces ambofaciens* и NucS из *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* и *C. glutamicum*, идентичность составляет 75%, 78% и 72%, соответ-

ственно, что подчёркивает значительную консервативность этого белка среди актинобактерий. Согласно структурному анализу, N-конец NucS является ДНК-связывающим участком, а C-конец - RecB-подобным, нуклеазным доменом, выполняющим каталитическую (нуклеазную) активность [42].

Подробный анализ структуры архейного NucS определил, что N-концевой ДНК-связывающий домен имеет структуру полузакрытой β-бочки, состоящую из двух слоев антипараллельных β-листов (восемь β-цепей и дополнительная α-спираль). Данный фрагмент участвует в димеризации фермента, что необходимо для правильной конформации белка. Структурные сравнения показывают, что N-концевой домен NucS имеет складку схожей с белками, связывающих одноцепочечную ДНК. C-концевой каталитический домен имеет α/β-структуру с ядром из пяти центральных β-листов и четырех фланкирующих α-спиралей. Этот домен состоит из короткой эндонуклеазной складки с активным сайтом, содержащим последовательные мотивы, характерные для RecB-подобных нуклеаз [33].

На рисунке 3 представлено структурное выравнивание мономеров NucS из *Thermococcus kodakarensis* и *Mycobacterium tuberculosis*, полученных с помощью программного обеспечения AlphaFold3. Структурное выравнивание проводили с помощью программного обеспечения PyMol.

На рисунке 3 видна высокая степень идентичности гомологичных белков из *Thermococcus kodakarensis* и *Mycobacterium tuberculosis*, что свидетельствует о их функциональной и эволюционной значимости, а также о сохранении их роли в клетке несмотря на видовые различия.

Нуклеазную активность NucS улучшает скользящий зажим у архей и бактерий. У архей скользящим зажимом является PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Связывание между PCNA и NucS происходит через PIP-мотив (PCNA-interacting peptide motif), короткую аминокислотную последовательность, которая встречается во многих PCNA-связывающих белках [43].

На активность белка NucS влияет концентрация соли,

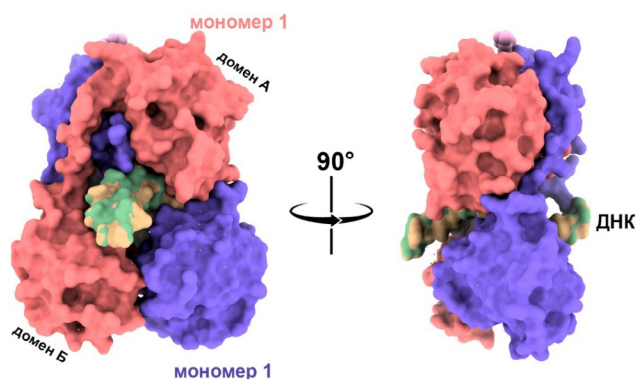


Рисунок 2 - Кристаллическая структура белка EndoMS *Thermococcus kodakarensis* (PDB ID: 5GKE)

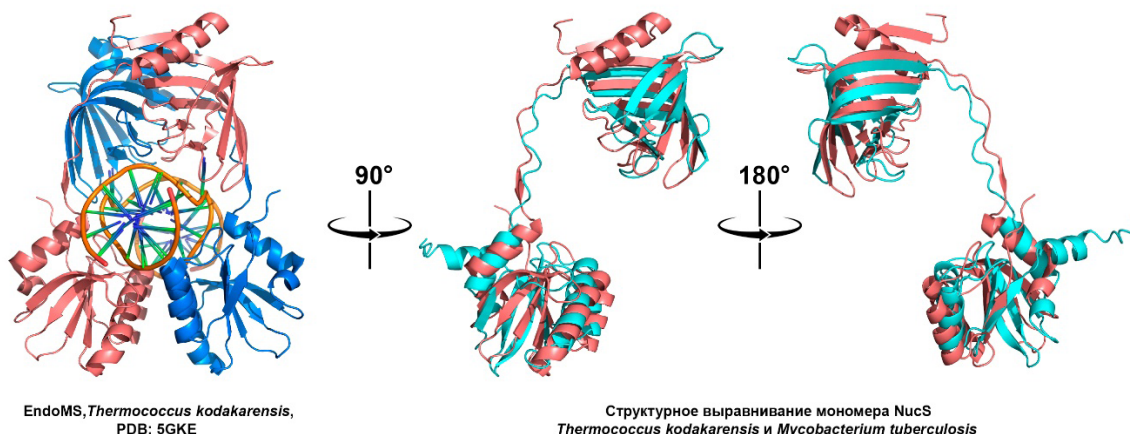


Рисунок 3 – Структурное выравнивание мономеров NucS из *Thermococcus kodakarensis* (розовый) и *Mycobacterium tuberculosis* (бирюзовый)

вязкость среды. Исследования показали, что при повышенной концентрации NaCl (150 mM) снижается каталитическая и ДНК-связывающая активность NucS. Предполагается, что ДНК-связывающая активность NucS ухудшается, при увеличении вязкости среды, что приводит к уменьшению коэффициента диффузии NucS [31]. Помимо этого, активность NucS зависит от двухвалентных металлов, таких как  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  и  $Ni^{2+}$ , среди которых предпочтительными ионами являются  $Mg^{2+}$  и  $Mn^{2+}$  (процент расщепления  $\approx 98\%$ ) [44].

Перспективы применения NucS в качестве терапевтической мишени: критический анализ и направления будущих исследований

Несмотря на перспективность белка NucS как новой мишени для антимикробной терапии, требуется осторожный подход к интерпретации имеющихся данных. В существующих публикациях отсутствуют убедительные *in vivo* модели с чётким клиническим доказательством того, что ингибирование или активация NucS приводит к предсказуемому снижению вирулентности или повышению чувствительности *M. tuberculosis* к антибиотикам. На текущем этапе ни один из известных препаратов не направлен напрямую на NucS, и все имеющиеся данные о его роли в гипермутационезе основаны преимущественно на лабораторных мутантах (например, *M. smegmatis*).

Оценка текущих данных показывает, что нет ясности, вызывает ли инактивация NucS устойчивость в клинических изолятах; не проведены исследования, демонстрирующие возможность фармакологической модуляции активности NucS. Отсутствуют данные о потенциальной токсичности вмешательства в репарационные механизмы бактерии с точки зрения микробиома и возможной перекрестной активности на гомологичные белки человека. Предполагается, что потенциальный препарат, нацеленный на NucS, не должен усиливать его активность, поскольку повышение репарационной способности бактерии может наоборот повысить её устойчивость. Напротив, интерес представляют подходы, направленные на подавление активности NucS или создание условий для синтетической летальности, при которой одновременное ингибирование NucS и других путей приведёт к гибели бактерии.

В качестве приоритетных направлений для будущих исследований предлагается проведение *in vitro* скрининга малых молекул, способных нарушить активность NucS, с использованием модельных бактериальных систем. Также необходимо создать дефицитные по NucS штаммы *M. tuberculosis* для изучения последствий частичной инактивации фермента в условиях, имитирующих физиологические. Перспективным направлением являются доклинические испытания на животных моделях с комбинированным применением ингибиторов NucS и существующих антибиотиков для оценки синергетического эффекта. Дополнительно важно исследовать потенциальные мишени-синергисты, включая белки, участвующие в системах HR и BER, с целью их совместной блокировки и индукции мутационного коллапса. Завершающим элементом исследовательской стратегии может стать разработка биоинформатических моделей, позволяющих прогнозировать устойчивость у штаммов с ослабленной активно-

стью NucS, а также анализировать корреляцию таких изменений с клиническими исходами.

Понимание тонких механизмов регуляции и действия NucS в контексте общей устойчивости бактерии может позволить перейти от фундаментальных исследований к разработке реальных терапевтических препаратов – ингибиторов или модуляторов, направленных на белки репарации ДНК. Это также позволит расширить арсенал лекарственных средств, эффективных против МЛУ-ТБ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В свете усиливающейся глобальной проблемы лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* поиск новых мишеней для противотуберкулёзной терапии приобретает особую актуальность. Белок NucS, участвующий в системе исправления ошибок ДНК, представляет собой перспективное направление для исследований, учитывая его роль в поддержании геномной стабильности и потенциальное участие в механизмах адаптации и устойчивости бактерий к лекарствам. Нарушение функции NucS может способствовать повышенной мутагенности, что, в свою очередь, ускоряет развитие устойчивости к противотуберкулёзным препаратам. Таким образом, углублённое изучение структуры, регуляции и функций NucS может не только расширить понимание молекулярных механизмов устойчивости *M. tuberculosis*, но и открыть новые подходы к созданию терапевтических стратегий, направленных на снижение скорости приобретения лекарственной устойчивости.

## 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*».

## ЛИТЕРАТУРА

1. U.S. centers for disease control and prevention. Tuberculosis: Causes and How It Spreads. – 2025. – URL: <https://www.cdc.gov/tb/causes/index.html>.
2. World Health Organization. Tuberculosis. – 2025. – URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>.
3. Arrigoni R., Ballini A., Topi S., Bottalico L., Jirillo E., Santacroce L. Antibiotic resistance to *Mycobacterium tuberculosis* and potential use of natural and biological products as alternative anti-mycobacterial agents // Antibiotics. – 2022. – Vol. 11, №. 10. – P.1 – 15. doi: 10.3390/antibiotics11101431.
4. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2024. – 2024. – URL: <https://www.who.int/teams/global-programme-on-tuberculosis-and-lung-health/tb-reports/global-tuberculosis-report-2024>.
5. World Health Organization. Tuberculosis profile: Kazakhstan. – 2023. – URL: <https://data.who.int/countries/398>.

6. Darby E.M., Trampari E., Siasat P., Gaya M.S., Alav I., Webber M.A., Blair J.M. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited // *Nature Reviews Microbiology*. – 2023. – Vol. 21. – P. 280–295. doi: 10.1038/s41579-022-00820-y.
7. Datta D., Jamwal S., Jyoti N., Patnaik S., Kumar D. Actionable mechanisms of drug tolerance and resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // *The FEBS Journal*. – 2024. – Vol. 291. – № 20. – P. 4433 – 4452. doi: 10.1111/febs.17142.
8. Vander Beken S., Al Dulayymi J.R., Naessens T., Koza G., Maza-Iglesias M., Rowles R., Theunissen C., De Medts J., Lanckacker E., Baird MS., Grooten J. Molecular structure of the *Mycobacterium tuberculosis* virulence factor, mycolic acid, determines the elicited inflammatory pattern // *European Journal of Immunology*. – 2011. – Vol. 41. – № 2. – P. 450 – 460. doi: 10.1002/eji.201040719.
9. Bailo R., Radhakrishnan A., Singh A., Nakaya M., Fujiwara N., Bhatt A. The mycobacterial desaturase DesA2 is associated with mycolic acid biosynthesis // *Sci Rep*. – 2022. – Vol. 12. – №1. – Article No. 6943. doi: 10.1038/s41598-022-10589-y.
10. te Brake L.H.M., de Knecht G.J., de Steenwinkel J.E., van Dam T.J.P., Burger D.M., Russel F.G.M., van Crevel R., Koenderink J.B., Aarnoutse R.E. The role of efflux pumps in tuberculosis treatment and their promise as a target in drug development: unraveling the black box // *Annual Reviews. Pharmacol. Toxicol*. – 2018. – Vol. 58. – P. 271–291. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010617-052438.
11. Chakraborty P., Kumar A. The extracellular matrix of mycobacterial biofilms: could we shorten the treatment of mycobacterial infections? // *Microbial Cell*. – 2019. – Vol. 6. – № 2. – P. 105 – 122. doi: 10.15698/mic2019.02.667.
12. Sharma S., Mohler J., Mahajan S.D., Schwartz S.A., Bruggemann L., Aalinkel R. Microbial biofilm: a review on formation, infection, antibiotic resistance, control measures, and innovative treatment // *Microorganisms*. – 2023. – Vol. 11. – № 6. – Article No. 1614. doi: 10.3390/microorganisms11061614.
13. Kurthkoti K., Kumar P., Sang P.B., Varshney U. Base excision repair pathways of bacteria: new promise for an old problem // *Future Medicinal Chemistry*. – 2020. – Vol. 12. – № 4. – P. 339-355. doi: 10.4155/fmc-2019-0267.
14. Revitt-Mills S.A., Wright E.K., Vereker M., O'Flaherty C., McPherson F., Dawson C., van Oijen A.M., Robinson A. Defects in DNA double-strand break repair resensitize antibiotic-resistant *Escherichia coli* to multiple bactericidal antibiotics // *Microbiology Open*. – 2022. – Vol. 11. – № 5. – P. 31. doi: 10.1002/mbo3.1316.
15. Mo C, Y., Manning S. A., Roggiani M., Culyba M. J., Samuels A. N., Sniegowski P. D., Goulian M., Kohli R. M. Systematically altering bacterial SOS activity under stress reveals therapeutic strategies for potentiating antibiotics // *mSphere*. – 2016. – Vol. 1. – № 4. – P. 1-15. doi: 10.1128/mSphere.00163-16.
16. Bellio P., Mancini A., Di Pietro L., Cracchiolo S., Franceschini N., Reale S., de Angelis F., Perilli M., Amicosante G., Spyarakis F., Tondi D., Cendron L., Celenza G. Inhibition of the transcriptional repressor LexA: Withstanding drug resistance by inhibiting the bacterial mechanisms of adaptation to antimicrobials // *Life Sciences*. – 2020. – Vol. 241. – P. 1-19. doi: 10.1016/j.lfs.2019.117116.
17. 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 Sciences*. – 2020. – Vol. 262. – P. 1-11. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118562.
18. Reiche M. A., Warner D.F., Mizrahi V. Targeting DNA replication and repair for the development of novel therapeutics against tuberculosis // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2017. – Vol. 4. – P 1-18. doi: 10.3389/fmolb.2017.00075.
19. van der Veen S, Tang C. M. The BER necessities: the repair of DNA damage in human-adapted bacterial pathogens // *Nature Reviews Microbiology*. – 2015. – Vol. 13. – № 2. – P. 1-12. doi: 10.1038/nrmicro3391.
20. Singh A. Guardians of the mycobacterial genome: a review on DNA repair systems in *Mycobacterium tuberculosis* // *Microbiology society*. – 2017. – Vol. 163. – № 12. – P. 1740-1758. doi: 10.1099/mic.0.000578.
21. Huffman J. L., Sundheim O., Tainer J. A. DNA base damage recognition and removal: new twists and grooves // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 2005. – Vol. 577. – №2. – P. 55–76. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2005.03.012.
22. Dianov G., Lindahl T. Reconstitution of the DNA base excision repair pathway // *Current Biology*. – 1994. – Vol. 4. – №12. – P. 1069–1076. doi: 10.1016/s0960-9822(00)00245-1.
23. Gupta R., Barkan D., Redelman-Sidi G., Shuman S., Glickman M. S. Mycobacteria exploit three genetically distinct DNA doublestrand break repair pathways // *Molecular Microbiology*. – 2011. – Vol. 79. – №2. – P. 316–330. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07463.x.
24. Sancar A., Rupp W.D. A novel repair enzyme: UVRABC excision nuclease of *Escherichia coli* cuts a DNA strand on both sides of the damaged region // *Cell*. – 1983. Vol. 33. – №1. – P. 249–260. doi: 10.1016/0092-8674(83)90354-9.
25. Verhoeven E.A., Wyman C., Moolenaar G.F., Goosen N. The presence of two UvrB subunits in the UvrAB complex ensures damage detection in both DNA strands // *The Embo Journal*. – 2002. – Vol. 21. – P.4196–4205. doi: https://doi.org/10.1093/emboj/cdf396.
26. Reardon J. T, Sancar A. Nucleotide excision repair // *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. – 2005. – Vol. 79. – P. 183–235. doi: 10.1016/S0079-6603(04)79004-2.
27. Oivanen M., Kuusela S., Lönnberg H. Kinetics and mechanisms for the cleavage and isomerization of the phosphodiester bonds of RNA by brønsted acids and bases // *Chemical Reviews*. – 1998. – Vol. 98. – № 3. – P. 961– 990. doi: 10.1021/cr960425x.
28. Vaisman A., Woodgate R. Redundancy in ribonucleotide excision repair: competition, compensation, and cooperation // *DNA Repair*. – 2015. – Vol. 29. – P. 74–82. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.02.008.
29. Iyer, R. R., Pluciennik, A., Burdett, V., Modrich

P. L. DNA mismatch repair: functions and mechanisms // *Chemical Reviews*. – 2005. – Vol. 106. – № 2. – P. 302–323. doi: 10.1021/cr0404794.

30. Castañeda-García A., Prieto A. I., Rodríguez-Beltrán J., Alonso N., Cantillon D., Costas C., Pérez-Lago L., Zegeye E.D., Herranz M., Plociński 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 // *Nature Communications*. – 2017. – Vol. 8. – Article No. 14246. – P. 1–10. doi: 10.1038/ncomms14246.

31. Rezgui R., Lestini R., Kühn J., Fave X., McLeod L., Myllykallio H., Alexandrou A., Bouzigues C. Differential interaction kinetics of a bipolar structure-specific endonuclease with DNA flaps revealed by single-molecule imaging // *PLOS One*. – 2014. – Vol. 9. – № 11. – Article No. e113493. doi: 10.1371/journal.pone.0113493.

32. Ren B., Kühn J., Meslet-Cladiere L., Briffotoux J., Norais C., Lavigne R., Flament D., Ladenstein R., Myllykallio H. Structure and function of a novel endonuclease acting on branched DNA substrates // *The EMBO Journal*. – 2009. – Vol. 28. – № 16. – P. 2479–2489. doi: 10.1038/emboj.2009.192.

33. 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. – Vol. 10. – No 6. – P. 13–15. doi: 10.3390/cells10061314.

34. Busch, C. R., DiRuggiero J. MutS and MutL are dispensable for maintenance of the genomic mutation rate in the halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* NRC-1 // *PLOS One*. – 2010. – Vol. 5. – №2. – Article No. e9045. doi: 10.1371/journal.pone.0009045.

35. Fressatti C.R., Martín-Blecua I., Pietrowski B.V., Meneguello J.E., Valverde J.R., Blázquez J., Castañeda-García A. Noncanonical Mismatch Repair Protein NucS Modulates the Emergence of Antibiotic Resistance in *Mycobacterium abscessus* // *Microbiol Spectr*. – 2022. – Vol. 10. – № 6. – P. e0222822. doi: 10.1128/spectrum.02228-22.

36. Darwin K.H., Nathan C.F. Role for nucleotide excision repair in virulence of *Mycobacterium tuberculosis* // *Infect Immun*. – 2005. – Vol. 73. – № 8. – P. 4581–4587. doi: 10.1128/IAI.73.8.4581-4587.2005.

37. Spivak G. Nucleotide excision repair in humans // *DNA Repair*. – 2015. – Vol. 36. – P. 13–18. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.09.003.

38. Zhou Y., van den Hof S., Wang S., Pang Y., Zhao B., Xia H., Anthony R., Ou X., Li Q., Zheng Y., Song Y., Zhao Y., van Soolingen D. Association between genotype and drug resistance profiles of *Mycobacterium tuberculosis* strains circulating in China in a national drug resistance survey // *PLoS One*. – 2017. – Vol. 12. – № 3. – P. e0174197. doi: 10.1371/journal.pone.0174197.

39. 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 // *Nature Genetics*. – 2015. – Vol. 47. – № 6. – P. 1–5. doi: 10.1038/ng.3269.

40. 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 Research*. – 2016. – Vol. 44. – № 7. – P. 2977–2986. doi: 10.1093/nar/gkw153.

41. Zhang L., Jiang D., Wu M., Yang Z., Oger P. M. New Insights Into DNA Repair Revealed by NucS Endonucleases From Hyperthermophilic Archaea // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – Vol. 11. – Article No. 1263. doi: 10.3389/fmicb.2020.01263.

42. 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 Research*. – 2024. – Vol. 52. – № 9. – P. 5033–5047. doi: 10.1093/nar/gkae132.

43. Nakae S., Hijikata A., Tsuji T., Yonezawa K., Kouyama KI., Mayanagi K., Ishino S., Ishino Y., Shirai T. Structure of the EndoMS-DNA Complex as Mismatch Restriction Endonuclease // *Structure*. – 2016. – Vol. 24. – №11. – P. 1960–1971. doi: 10.1016/j.str.2016.09.005.

44. Zhang L., Shi H., Gan Q., Wang Y., Wu M., Yang Z., Oger P., Zheng J. An alternative pathway for repair of deaminated bases in DNA triggered by archaeal NucS endonuclease // *DNA Repair*. – 2020. – Vol 85. – P. 1–32. doi: 10.1016/j.dnarep.2019.102734.

## REFERENCES

1. U.S. centers for disease control and prevention. Tuberculosis: Causes and How It Spreads. – 2025. – URL: <https://www.cdc.gov/tb/causes/index.html>.

2. World Health Organization. Tuberculosis. – 2025. – URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>.

3. Arrigoni R., Ballini A., Topi S., Bottalico L., Jirillo E., Santacroce L. Antibiotic resistance to *Mycobacterium tuberculosis* and potential use of natural and biological products as alternative anti-mycobacterial agents // *Antibiotics*. – 2022. – Vol. 11, № 10. – P.1–15. doi: 10.3390/antibiotics11101431.

4. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2024. – 2024. – URL: <https://www.who.int/teams/global-programme-on-tuberculosis-and-lung-health/tb-reports/global-tuberculosis-report-2024>.

5. World Health Organization. Tuberculosis profile: Kazakhstan. – 2023. – URL: <https://data.who.int/countries/398>.

6. Darby E.M., Trampari E., Siasat P., Gaya M.S., Alav I., Webber M.A., Blair J.M. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited // *Nature Reviews Microbiology*. – 2023. – Vol. 21. – P. 280–295. doi: 10.1038/s41579-022-00820-y.

7. Datta D., Jamwal S., Jyoti N., Patnaik S., Kumar D. Actionable mechanisms of drug tolerance and resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // *The FEBS Journal*. – 2024. – Vol. 291. – № 20. – P. 4433–4452. doi: 10.1111/febs.17142.

8. Vander Beken S., Al Dulayymi J.R., Naessens T., Koza G., Maza-Iglesias M., Rowles R., Theunissen C., De

- Medts J., Lanckacker E., Baird MS., Grooten J. Molecular structure of the *Mycobacterium tuberculosis* virulence factor, mycolic acid, determines the elicited inflammatory pattern // *European Journal of Immunology*. – 2011. – Vol. 41. – № 2. – P. 450 – 460. doi: 10.1002/eji.201040719.
9. Bailo R., Radhakrishnan A., Singh A., Nakaya M., Fujiwara N., Bhatt A. The mycobacterial desaturase DesA2 is associated with mycolic acid biosynthesis // *Sci Rep*. – 2022. – Vol. 12. – №1. – Article No. 6943. doi: 10.1038/s41598-022-10589-y.
10. te Brake L.H.M., de Knegt G.J., de Steenwinkel J.E., van Dam T.J.P., Burger D.M., Russel F.G.M., van Crevel R., Koenderink J.B., Aarnoutse R.E. The role of efflux pumps in tuberculosis treatment and their promise as a target in drug development: unraveling the black box // *Annual Reviews. Pharmacol. Toxicol*. – 2018. – Vol. 58. – P. 271–291. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010617-052438.
11. Chakraborty P., Kumar A. The extracellular matrix of mycobacterial biofilms: could we shorten the treatment of mycobacterial infections? // *Microbial Cell*. – 2019. – Vol. 6. – № 2. – P. 105 – 122. doi: 10.15698/mic2019.02.667.
12. Sharma S., Mohler J., Mahajan SD., Schwartz SA., Bruggemann L., Aalinkeel R. Microbial biofilm: a review on formation, infection, antibiotic resistance, control measures, and innovative treatment // *Microorganisms*. – 2023. – Vol. 11. – № 6. – Article No. 1614. doi: 10.3390/microorganisms11061614.
13. Kurthkoti K., Kumar P., Sang PB., Varshney U. Base excision repair pathways of bacteria: new promise for an old problem // *Future Medicinal Chemistry*. – 2020. – Vol. 12. – № 4. – P. 339-355. doi: 10.4155/fmc-2019-0267.
14. Revitt-Mills S.A., Wright EK., Vereker M., O’Flaherty C., McPherson F., Dawson C., van Oijen AM., Robinson A. Defects in DNA double-strand break repair resensitize antibiotic-resistant *Escherichia coli* to multiple bactericidal antibiotics // *Microbiology Open*. – 2022. – Vol. 11. – № 5. – P. 31. doi: 10.1002/mbo3.1316.
15. Mo C, Y., Manning S. A., Roggiani M., Culyba M. J., Samuels A. N., Sniegowski P. D., Goulian M., Kohli R. M. Systematically altering bacterial SOS activity under stress reveals therapeutic strategies for potentiating antibiotics // *mSphere*. – 2016. – Vol. 1. – № 4. – P. 1-15. doi: 10.1128/mSphere.00163-16.
16. Bellio P., Mancini A., Di Pietro L., Cracchiolo S., Franceschini N., Reale S., de Angelis F., Perilli M., Amicosante G., Spyraakis F., Tondi D., Cendron L., Celenza G. Inhibition of the transcriptional repressor LexA: Withstanding drug resistance by inhibiting the bacterial mechanisms of adaptation to antimicrobials // *Life Sciences*. – 2020. – Vol. 241. – P. 1-19. doi: 10.1016/j.lfs.2019.117116.
17. 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 Sciences*. – 2020. – Vol. 262. – P. 1-11. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118562.
18. Reiche M. A., Warner D.F., Mizrahi V. Targeting DNA replication and repair for the development of novel therapeutics against tuberculosis // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2017. – Vol. 4. – P 1-18. doi: 10.3389/fmolb.2017.00075.
19. van der Veen S, Tang C. M. The BER necessities: the repair of DNA damage in human-adapted bacterial pathogens // *Nature Reviews Microbiology*. – 2015. – Vol. 13. – № 2. – P. 1-12. doi: 10.1038/nrmicro3391.
20. Singh A. Guardians of the mycobacterial genome: a review on DNA repair systems in *Mycobacterium tuberculosis* // *Microbiology society*. – 2017. – Vol. 163. – № 12. – P. 1740-1758. doi: 10.1099/mic.0.000578.
21. Huffman J. L., Sundheim O., Tainer J. A. DNA base damage recognition and removal: new twists and grooves // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 2005. – Vol. 577. – №2. – P. 55–76. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2005.03.012.
22. Dianov G., Lindahl T. Reconstitution of the DNA base excision repair pathway // *Current Biology*. – 1994. – Vol. 4. – №12. – P. 1069–1076. doi: 10.1016/s0960-9822(00)00245-1.
23. Gupta R., Barkan D., Redelman-Sidi G., Shuman S., Glickman M. S. Mycobacteria exploit three genetically distinct DNA doublestrand break repair pathways // *Molecular Microbiology*. – 2011. – Vol. 79. – №2. – P. 316–330. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07463.x.
24. Sancar A., Rupp W.D. A novel repair enzyme: UVRABC excision nuclease of *Escherichia coli* cuts a DNA strand on both sides of the damaged region // *Cell*. – 1983. Vol. 33. – №1. – P. 249–260. doi: 10.1016/0092-8674(83)90354-9.
25. Verhoeven E.A., Wyman C., Moolenaar G.F., Goosen N. The presence of two UvrB subunits in the UvrAB complex ensures damage detection in both DNA strands // *The Embo Journal*. – 2002. – Vol. 21. – P.4196–4205. doi: https://doi.org/10.1093/emboj/cdf396.
26. Reardon J. T, Sancar A. Nucleotide excision repair // *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. – 2005. – Vol. 79. – P. 183–235. doi: 10.1016/S0079-6603(04)79004-2.
27. Oivanen M., Kuusela S., Lönnberg H. Kinetics and mechanisms for the cleavage and isomerization of the phosphodiester bonds of RNA by brønsted acids and bases // *Chemical Reviews*. – 1998. – Vol. 98. – № 3. – P. 961– 990. doi: 10.1021/cr960425x.
28. Vaisman A., Woodgate R. Redundancy in ribonucleotide excision repair: competition, compensation, and cooperation // *DNA Repair*. – 2015. – Vol. 29. – P. 74–82. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.02.008.
29. Iyer, R. R., Pluciennik, A., Burdett, V., Modrich P. L. DNA mismatch repair: functions and mechanisms // *Chemical Reviews*. – 2005. – Vol. 106. – № 2. – P. 302–323. doi: 10.1021/cr0404794.
30. 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 // *Nature Communications*. – 2017. – Vol. 8. – Article No. 14246. – P. 1-10. doi: 10.1038/ncomms14246.
31. Rezgui R., Lestini R., Kühn J., Fave X., McLeod

- L., Myllykallio H., Alexandrou A., Bouzigues C. Differential interaction kinetics of a bipolar structure-specific endonuclease with DNA flaps revealed by single-molecule imaging // PLOS One. – 2014. – Vol. 9. – № 11. – Article No. e113493. doi: 10.1371/journal.pone.0113493.
32. Ren B., Kühn J., Meslet-Cladiere L., Briffotiaux J., Norais C., Lavigne R., Flament D., Ladenstein R., Myllykallio H. Structure and function of a novel endonuclease acting on branched DNA substrates // The EMBO Journal. – 2009. – Vol. 28. – № 16. – P. 2479–2489. doi: 10.1038/emboj.2009.192.
33. 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. – Vol. 10. – No 6. – P. 13–15. doi: 10.3390/cells10061314.
34. Busch, C. R., DiRuggiero J. MutS and MutL are dispensable for maintenance of the genomic mutation rate in the halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* NRC-1 // PLOS One. – 2010. – Vol. 5. – №2. – Article No. e9045. doi: 10.1371/journal.pone.0009045.
35. Fressatti C.R, Martín-Blecua I., Pietrowski B.V., Meneguello J.E., Valverde J.R., Blázquez J., Castañeda-García A. Noncanonical Mismatch Repair Protein NucS Modulates the Emergence of Antibiotic Resistance in *Mycobacterium abscessus* // Microbiol Spectr. – 2022. – Vol. 10. – № 6. – P. e0222822. doi: 10.1128/spectrum.02228-22.
36. Darwin K.H., Nathan C.F. Role for nucleotide excision repair in virulence of *Mycobacterium tuberculosis* // Infect Immun. – 2005. – Vol. 73. – № 8. – P. 4581–4587. doi: 10.1128/IAI.73.8.4581-4587.2005.
37. Spivak G. Nucleotide excision repair in humans // DNA Repair. – 2015. – Vol. 36. – P. 13–18. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.09.003.
38. Zhou Y., van den Hof S., Wang S., Pang Y., Zhao B., Xia H., Anthony R., Ou X., Li Q., Zheng Y., Song Y., Zhao Y., van Soolingen D. Association between genotype and drug resistance profiles of *Mycobacterium tuberculosis* strains circulating in China in a national drug resistance survey // PLoS One. – 2017. – Vol. 12. – № 3. – P. e0174197. doi: 10.1371/journal.pone.0174197.
39. 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 // Nature Genetics. – 2015. – Vol. 47. – № 6. – P. 1–5. doi: 10.1038/ng.3269.
40. 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 Research. – 2016. – Vol. 44. – № 7. – P. 2977–2986. doi: 10.1093/nar/gkw153.
41. Zhang L., Jiang D., Wu M., Yang Z., Oger P. M. New Insights Into DNA Repair Revealed by NucS Endonucleases From Hyperthermophilic Archaea // Frontiers in Microbiology. – 2020. – Vol. 11. – Article No. 1263. doi: 10.3389/fmicb.2020.01263.
42. 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 Researh. – 2024. – Vol. 52. – № 9. – P. 5033–5047. doi: 10.1093/nar/gkae132.
43. Nakae S., Hijikata A., Tsuji T., Yonezawa K., Kouyama KI., Mayanagi K, Ishino S., Ishino Y., Shirai T. Structure of the EndoMS-DNA Complex as Mismatch Restriction Endonuclease // Structure. – 2016. – Vol. 24. – №11. – P. 1960–1971. doi: 10.1016/j.str.2016.09.005.
44. Zhang L., Shi H., Gan Q., Wang Y., Wu M., Yang Z., Oger P., Zheng J. An alternative pathway for repair of deaminated bases in DNA triggered by archaeal NucS endonuclease // DNA Repair. – 2020. – Vol 85. – P. 1–32. doi: 10.1016/j.dnarep.2019.102734.

UDC 34.15.27; 31.27.17; 76.29.53; 31.27.19

NUCS AND DRUG RESISTANCE IN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*: POTENTIAL FOR NOVEL THERAPEUTIC TARGETSYakupov B.Sh. <sup>1</sup>, Zein U.O. <sup>1</sup>, Turgimbayeva A.M. <sup>2</sup>, Abeldenov S.K. <sup>2</sup><sup>1</sup> L.N. Gumilyov Eurasian National University, 2 Satbayev street, Astana, 010000, The Republic of Kazakhstan.<sup>2</sup> LLP «National Center of Biotechnology», 13/5 Kurgalzhynskoye road, Astana, 010000, The Republic of Kazakhstan.

\* abeldenov@biocenter.kz

## ABSTRACT

Antibiotic resistance of *Mycobacterium tuberculosis* poses a serious threat to global health. Kazakhstan is among the top 30 countries with the highest levels of multidrug-resistant tuberculosis and rifampicin-resistant tuberculosis. Existing antibiotics are losing effectiveness due to the rapid growth of drug resistance, which is why DNA repair enzymes of the pathogen are being considered as promising targets for new antibiotics. Unlike many other bacteria, *M. tuberculosis* lacks the classical mismatch repair system; instead, it employs an alternative pathway mediated by the endonuclease NucS. This article discusses the role of NucS in maintaining genomic stability in *M. tuberculosis* and its involvement in the development of antibiotic resistance. A review of experimental data shows that inactivation of NucS leads to a hypermutator phenotype, increasing the likelihood of the emergence of drug-resistant strains. These properties make NucS a promising target for antibacterial therapy. The study of NucS as a critically important protein in the pathogenesis and resistance of *M. tuberculosis* opens new avenues for the development of targeted drugs and strategies to suppress the development of resistance.

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

ӨОК 34.15.27; 31.27.17; 76.29.53; 31.27.19

NUCS ЖӘНЕ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*-ТЫҢ ДӘРІГЕ ТӨЗІМДІЛІГІ: ЖАҢА ТЕРАПЕВТИК МАҚСАТТАР ҮШІН ПОТЕНЦИАЛЯкупов Б.Ш. <sup>1</sup>, Зейн Ұ.Ө. <sup>1</sup>, Тұрғымбаева Ә.М. <sup>2</sup>, Абельденов С.К. <sup>2\*</sup><sup>1</sup> Л.Н.Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Қ. Сәтбаев көшесі, 2, Астана қ., 010000, Қазақстан Республикасы.<sup>2</sup> ЖШС «Ұлттық биотехнология орталығы», Қорғалжын тас жолы, 13/5, Астана қ., 010000, Қазақстан Республикасы.

\* abeldenov@biocenter.kz

## ТҮЙІН

*Mycobacterium tuberculosis*-тің антибиотиктерге төзімділігі жаһандық денсаулық сақтау үшін елеулі қауіп төндіреді. Қазақстан туберкулездің көптеген дәрілерге төзімді /рифампицинге төзімді түрлері ең жоғары деңгейде тіркелген топ-30 елдің қатарына кіреді. Қазіргі антибиотиктер дәріге төзімділіктің тез өсуіне байланысты тиімділігін жоғалтып жатыр, сондықтан патогеннің ДНҚ-ны қалпына келтіретін ферменттері жаңа антибиотиктер үшін болашағы бар нысана ретінде қарастырылуда. Көптеген басқа бактериялардан айырмашылығы, *M. tuberculosis*-те қате жұптасқан нуклеотидтерді классикалық қалпына келтіру жүйесі жоқ, оның орнына NucS эндонуклеазасы арқылы жүретін балама механизмі бар. Осы мақалада NucS-тің *M. tuberculosis*-тің геномдық тұрақтылығын қамтамасыз етудегі рөлі және антибиотиктерге төзімділіктің қалыптасуына қатысуы қарастырылады. Эксперименттік деректерге шолу жасау NucS-тің белсенділігінің жоғалуы мутация жылдамдығы жоғары фенотипке әкелетінін және бұл дәріге төзімді штамдардың пайда болу ықтималдығын арттыратынын көрсетеді. Бұл қасиеттер NucS-ті бактерияға қарсы терапия үшін келешегі зор нысана етеді. *M. tuberculosis*-тің патогенезі мен төзімділігінде аса маңызды ақуыз ретінде NucS-ті зерттеу бағытталған препараттар мен төзімділікті дамытуды тежеу стратегияларын әзірлеуде жаңа бағыттар ашады.

**Түйінді сөздер:** туберкулез, *Mycobacterium tuberculosis*, NucS, ДНҚ репарациясы, антибиотиктерге төзімділік, терапевтік нысаналар.