

ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МУТАНТОВ *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS*, УСТОЙЧИВЫХ К СОЕДИНЕНИЯМ КЛАССА ЗАМЕЩЕННЫХ ИМИДАЗО[1,2-*b*][1,2,4,5] ТЕТРАЗИНОВ – КАНДИДАТОВ В ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫЕ ПРЕПАРАТЫ

Д. А. Маслов¹✉, О. Б. Беккер¹, К. В. Шур¹, А. А. Ватлин¹, А. В. Коротина², В. Н. Даниленко¹

¹ Лаборатория генетики микроорганизмов, Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова, Москва

² Лаборатория гетероциклических соединений, Институт органического синтеза имени И. Я. Пастовского, Екатеринбург

Распространение штаммов *Mycobacterium tuberculosis* с множественной и широкой лекарственной устойчивостью требует разработки новых противотуберкулезных препаратов. Ранее нами были исследованы соединения класса замещенных имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинов, показавшие способность ингибировать серин-треониновые протеинкиназы в оригинальной тест-системе *M. smegmatis* *aphVIII+*. Для определения механизма действия кандидатов в лекарственные препараты необходимо исследование мутаций в геноме микобактерий, приводящих к устойчивости к этим препаратам. Целью работы было найти и охарактеризовать мутации, определяющие устойчивость штаммов *M. smegmatis*. Проводили полногеномное секвенирование девяти мутантов, устойчивых к трем соединениям класса замещенных имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинов. В семи из девяти мутантных штаммов обнаружена мутация (Y52H) в гене *MSMEG_1601*, кодирующем белок с неизвестной функцией и являющемся консервативным для микобактерий, причем в трех штаммах дополнительно обнаружены две мутации в гене *MSMEG_1380*, кодирующем транскрипционный регулятор. В двух оставшихся мутантных штаммах обнаружены мутации в генах *MSMEG_0641* и *MSMEG_2087*, кодирующих белки-транспортеры. Мутаций в генах, кодирующих СТПК, обнаружено не было. Вероятно, они не являются основными мишенями исследуемых соединений. Дальнейшее изучение функции белка *MSMEG_1601* представляет интерес в случае, если этот белок является новой биомшенью, либо частью нового механизма реализации устойчивости к потенциальным противотуберкулезным препаратам.

Ключевые слова: *Mycobacterium smegmatis*, лекарственная устойчивость, мутации устойчивости, полногеномное секвенирование, замещенные имидазотетразины, туберкулез

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №17-75-20060).

Благодарности: авторы выражают благодарность Наталье Михеечевой за ценные советы и методические наработки.

✉ **Для корреспонденции:** Дмитрий Антонович Маслов
ул. Губкина, д. 3, г. Москва, 119333; d.masssik@gmail.com

Статья получена: 30.05.2018 **Статья принята к печати:** 12.07.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.039

WHOLE-GENOME SEQUENCING AND COMPARATIVE GENOMIC ANALYSIS OF *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS* MUTANTS RESISTANT TO IMIDAZO[1,2-*b*][1,2,4,5]TETRAZINES, ANTITUBERCULOSIS DRUG CANDIDATES

Maslov DA¹✉, Bekker OB¹, Shur KV¹, Vatlin AA¹, Korotina AV², Danilenko VN¹

¹ Laboratory of Bacterial Genetics, Vavilov Institute of General Genetics, Moscow

² Laboratory of Heterocyclic Compounds, Postovsky Institute of Organic Synthesis, Ekaterinburg, Russia

The spread of multidrug and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* urges the development of novel antituberculosis drugs. Previously, we studied the compounds representing the class of substituted imidazo[1,2-*b*][1,2,4,5] tetrazines capable of inhibiting serine/threonine protein kinases (STPK) in the original *M. smegmatis* *aphVIII+* test-system. To unveil the mechanism of action of drug candidates, it is necessary to search for mutations in the mycobacterial genome that confer resistance to these compounds. The aim of our work was to find and describe such mutations in *M. smegmatis* strains. We carried out the whole-genome sequencing of 9 mutants resistant to 3 imidazo[1,2-*b*][1,2,4,5]tetrazines. Seven of 9 mutant strains were found to have the Y52H mutation in the highly conserved mycobacterial gene *MSMEG_1601* encoding a protein with an unknown function. Additionally, three of those 7 strains were shown to have two mutations in the *MSMEG_1380* encoding a transcriptional regulator. The remaining 2 mutant strains had mutations in *MSMEG_0641* and *MSMEG_2087* genes encoding transporter-proteins. No mutations were found in STPK genes, meaning that they might be not the primary targets of the studied compounds. Further investigation of *MSMEG_1601* function may be of interest as this protein might be the biological target or a part of a new mechanism underlying resistance to antituberculosis drug candidates.

Keywords: *Mycobacterium smegmatis*, drug resistance, resistance mutations, whole-genome sequencing, substituted imidazotetrazines, tuberculosis

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation (Grant 17-75-20060).

Acknowledgement: the authors wish to thank Natalya Mikhecheva of the Laboratory of Bacterial Genetics, Vavilov Institute of General Genetics, for her valuable comments and methodological know-how.

✉ **Correspondence should be addressed:** Dmitry A. Maslov
Gubkina 3, Moscow, 119333; d.masssik@gmail.com

Received: 30.05.2018 **Accepted:** 12.07.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.039

Туберкулез — одно из наиболее опасных инфекционных заболеваний: по оценкам Всемирной организации здравоохранения более 2 млрд человек в мире являются носителями его возбудителя — *Mycobacterium tuberculosis*. Ежегодно от туберкулеза умирает около 10,8 млн человек [1]. Основной проблемой контроля за заболеванием на сегодняшний день является возникновение и повсеместное распространение штаммов *M. tuberculosis* с множественной и широкой лекарственной устойчивостью (МЛУ — устойчивость к рифампицину и изониазиду; ШЛУ — дополнительная к МЛУ устойчивость к препаратам ряда фторхинолонов и одному из инъекционных препаратов второго ряда противотуберкулезной терапии) [2, 3]. Таким образом, одной из главных задач в борьбе с туберкулезом является разработка противотуберкулезных препаратов с новым механизмом действия.

Ранее нами была исследована антимикобактериальная активность соединений класса замещенных имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинов [4], которые также проявили активность в оригинальной тест-системе *M. smegmatis* *aphVIII+*, валидированной для поиска ингибиторов микобактериальных серин-треониновых протеинкиназ (СТПК) [5]. Однако для окончательного подтверждения механизма действия замещенных имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинов, а также механизма возникновения устойчивости к данным соединениям требовалось обнаружить мутации, приводящие к устойчивости микобактерий к этим веществам с использованием *M. smegmatis* в качестве модельного организма [6].

Целью данного исследования было секвенирование и сравнительный геномный анализ мутантов *M. smegmatis*, устойчивых к трем соединениям класса замещенных имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинов: TSV-395, TSV-402 и NIK-1283.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы микобактерий и условия культивирования

В работе использованы следующие штаммы микобактерий: 1) *M. smegmatis* *mc2* 155 (штамм дикого типа); 2) штаммы *M. smegmatis* *at^R8*, *at^R9*, *at^R10*, отобранные как устойчивые к соединению TSV-395; 3) штаммы *M. smegmatis* *at^R1*, *at^R2*, *at^R11*, отобранные как устойчивые к соединению TSV-402; 4) штаммы *M. smegmatis* *at^R14*, *at^R17*, *at^R19*, отобранные как устойчивые к соединению NIK-1283. Используемые мутантные штаммы имели перекрестную лекарственную устойчивость ко всем трем соединениям.

Культуры микобактерий выращивали в жидкой среде Middlebrook 7H9 (Himedia, Индия) с добавлением OADC (Himedia, Индия), 0,1% Tween-80 и 0,1% глицерина при 37 °C и 250 об./мин.

Выделение ДНК микобактерий и полногеномное секвенирование

ДНК микобактерий очищали из 15 мл жидкой культуры по методике, описанной в [7]. После предварительной очистки ДНК обрабатывали РНКазой А (ThermoFischerScientific, США) и проводили экстракцию смесью из фенола, хлороформа и изоамилового спирта в соотношении 25 : 24 : 1 по объему.

Очищенную ДНК использовали для приготовления библиотек с набором реагентов Nextera (Illumina, США)

и дальнейшего секвенирования на платформе Illumina MiSeq с набором реагентов MiSeq Reagent Kit v3 2x315 bp (Illumina, США). ДНК штамма дикого типа секвенировали с набором реагентов MiSeq Reagent Kit v2 2x150 bp (Illumina, США). Полученные данные были добавлены в базу данных Sequence Read Archive (SRA) NCBI, номер записи: SRP145443.

Обработка данных полногеномного секвенирования и сравнительный геномный анализ

Полученные прочтения выравнивали при помощи программы BWA-MEM [8] на референсный геном (NC_008596.1, PRJNA57701), затем создавали файл multiple pileup при помощи команды mpileup программы SAMtools [9] с опциями (-B -f). Определение однонуклеотидных замен выполняли командой mpileup2snp программы VarScan 2.3.9 [10] с опциями (--min-avg-qual 30 --min-var-freq 0.80 --p-value 0.01 --output-vcf 1). Для аннотации использовали скрипт vcf_annotate.pl, любезно предоставленный сотрудницей лаборатории генетики микроорганизмов Института общей генетики им. Н. И. Вавилова Натальей Михеевской. Затем отбирали однонуклеотидные замены, не присутствующие в штамме дикого типа и находящиеся внутри открытых рамок считывания. Поиск гомологов проводили в программе BLAST NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнительный геномный анализ

После сборки геномов был проведен сравнительный геномный анализ мутантных штаммов и штамма дикого типа, который выявил следующие уникальные однонуклеотидные замены:

1) замену CGT>AGT в кодоне 233 (R>S) гена *MSMEG_0641* (binding-protein-dependent transporters inner membrane component) у мутанта *at^R10*;

2) замену ACG>GTG в кодоне 52 (T>V) гена *MSMEG_1380* (transcriptional regulator) у мутантного штамма *at^R19*;

3) инсерции аминокислот VG в позиции 51 гена *MSMEG_1380* (transcriptional regulator) у мутантных штаммов *at^R11*, *at^R17*;

4) замену TAC>CAC в кодоне 52 (Y>H) гена *MSMEG_1601* (hypothetical protein) у мутантных штаммов *at^R1*, *at^R2*, *at^R8*, *at^R11*, *at^R14*, *at^R17* и *at^R19*;

5) замену TAC>TGC в кодоне 188 (Y>C) гена *MSMEG_2087* (transporter small conductance mechanosensitive ion channel (MscS) family protein) у мутантного штамма *at^R9*.

Гены, в которых найдены перечисленные мутации, не являются псевдогенами, однако функции кодируемых ими белков экспериментально не подтверждены.

Идентификация генов-гомологов в геноме *M. tuberculosis*

При помощи BLAST удалось выявить гомологи белков *M. tuberculosis*, несущих обнаруженные мутации (табл.).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучение механизма действия препарата является важнейшим этапом в разработке любого современного антибактериального лекарства. Получение мутантов, устойчивых к разрабатываемому соединению и выявление определяющих устойчивость мутаций — классический

Таблица. Характеристики ближайших гомологов для белков *M. tuberculosis*, в которых были обнаружены мутации, предположительно определяющие лекарственную устойчивость

Белок	Семейство	Функция	Ближайший гомолог у <i>M. tuberculosis</i> (продукт гена)	Сходство по аминокислотной последовательности (%)	Покрытие аминокислотной последовательности (%)
MSMEG_0641	DppC ABC-транспортеры	Транспорт аминокислот и неорганических соединений	<i>dppB</i> (<i>rv3665c</i>)	35	98
MSMEG_1380	AcrR/TetR_N	Транскрипционные регуляторы	<i>rv0067c</i>	33	71
MSMEG_1601	Неизвестно	Неизвестно	<i>rv3412c</i>	87	100
MSMEG_2087	MscS	Механочувствительные ионные каналы	<i>rv3104c</i>	69	89

подход к установлению наиболее вероятных мишеней воздействия антибиотика. Нами проведен сравнительный геномный анализ девяти мутантов, устойчивых к соединениям класса замещенных имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинов (полученных на трех различных соединениях, но имеющих к ним перекрестную устойчивость). Анализ генома мутантов позволил выбрать в качестве наиболее вероятных драйверов лекарственной устойчивости пять мутаций в четырех генах.

Две мутации обнаружены в генах, кодирующих трансмембранный транспортер (MSMEG_0641) и механочувствительный канал (MSMEG_2087), и могут влиять на транспорт соединений внутрь клетки и из нее. Две мутации обнаружены в гене белка MSMEG_1380, являющемся транскрипционным регулятором семейства TetR. Белки этого семейства могут участвовать в регуляции лекарственной устойчивости путем контроля экспрессии различных мембранных транспортеров. Так, у *M. abscessus* регулятор TetR-семейства активирует экспрессию клеточных транспортеров MmpS5/MmpL5, связанных с реализацией лекарственной устойчивости к производным тиацетазона [11].

Из обнаруженных мутаций наиболее интересной для дальнейших исследований представляется мутация в гене MSMEG_1601; она встречается у семи из девяти мутантов. Данный ген крайне консервативен для рода *Mycobacterium*: он присутствует в геномах всех

микобактерий (и ряда других актинобактерий), включая сильно редуцированный геном *M. leprae*, и относится к так называемым core hypotheticals — высококонсервативным белкам с неопределенной функцией [12] (хотя не является жизненно-необходимым для роста микобактерий *in vitro* [13]). Протеомный анализ штаммов *M. tuberculosis* различных линий показал, что белок Rv3412 (гомолог MSMEG_1601) присутствует в увеличенном количестве в вирулентных штаммах, в частности в штамме линии LAM, в сравнении с аттенуированным штаммом *M. bovis* BCG. Это позволило авторам сделать предположение о возможном участии данного белка в инфекционном процессе [14].

Выводы

Нами обнаружено пять мутаций в четырех генах, вероятно приводящих к устойчивости микобактерий к соединениям класса замещенных имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинов. Участие каждой из мутаций еще предстоит подтвердить методами обратной генетики, однако уже сейчас большой интерес представляет ген, кодирующий белок MSMEG_1601: в отличие от других выявленных мутантных генов он не связан с трансмембранным транспортом и может служить прямой биомишенью замещенных имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинов.

Литература

- World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2017. Geneva; 2017. p. 1–262.
- Gandhi NR, Nunn P, Dheda K, Schaaf HS, Zignol M, van Soolingen D, et al. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *The Lancet*. 2010 May; 375 (9728): 1830–43.
- Caminero JA, Sotgiu G, Zumla A, Migliori GB. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *Lancet Infect Dis*; 2010 Sep; 10 (9): 621–9.
- Maslov DA, Shur KV, Vattin AA, Bekker OB, Korotina AV, Rusinov GL, et al. Search for azolo[1,2,4,5]tetrazines biotargets in mycobacteria. 43rd FEBS Congress Proceedings. *FEBS OpenBio* 2018; 8: 263–263 Suppl. 1 Meeting Abstract: p. 09–172–M.
- Маслов Д. А., Беккер О. Б., Алексеева М. Г., Князева Л. М., Мавлетова Д. А., Афанасьев И. И. и др. Ингибиторы серин-треониновых протеинкиназ классов аминопиридинов и аминопиримидинов — кандидаты в препараты для лечения лекарственно устойчивых форм туберкулеза. *Вестник РГМУ*. 2017; (1): 42–7. DOI: 10.24075/brsmu.2017-01-04.
- Cooper CB. Development of *Mycobacterium tuberculosis* Whole Cell Screening Hits as Potential Antituberculosis Agents. *J Med Chem*. 2013 Oct 24;56 (20): 7755–60.
- Belisle JT, Mahaffey SB, Hill PJ. Isolation of *Mycobacterium* Species Genomic DNA. *Mycobacteria Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2010. p. 1–12.
- Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2010 Mar 1; 26 (5): 589–95. PMID: PMC2828108.
- Li H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*. 2011 Nov 1; 27 (21): 2987–93. PMID: PMC3198575.
- Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res*. 2012 Mar; 22 (3): 568–76. PMID: PMC3290792.
- Richard M, Gutiérrez AV, Viljoen AJ, Ghigo E, Blaise M, Kremer L. Mechanistic and Structural Insights Into the Unique TetR-Dependent Regulation of a Drug Efflux Pump in *Mycobacterium abscessus*. *Front Microbiol Frontiers*. 2018; 9: 649. PMID: PMC5895659.
- Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Gutierrez C, Simoes N, Vincent V, et al. Macro-array and bioinformatic analyses reveal mycobacterial “core” genes, variation in the ESAT-6 gene family and new phylogenetic markers for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology*. *Microbiol Society*; 2004 Feb; 150 (Pt 2): 483–96.
- Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Genes required for mycobacterial

growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol.* 2003 Apr; 48 (1): 77–84.

14. Peters JS, Calder B, Gonnelli G, Degroev S, Rajaonarifara E, Mulder N, et al. Identification of Quantitative Proteomic

Differences between *Mycobacterium tuberculosis* Lineages with Altered Virulence. *Front Microbiol.* 2016; 7 (139): 813. PMID: PMC4885829.

References

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2017. Geneva; 2017. p. 1–262.
2. Gandhi NR, Nunn P, Dheda K, Schaaf HS, Zignol M, van Soolingen D, et al. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *The Lancet.* 2010 May; 375 (9728): 1830–43.
3. Caminero JA, Sotgiu G, Zumla A, Migliori GB. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2010 Sep; 10 (9): 621–9.
4. Maslov DA, Shur KV, Vatlin AA, Bekker OB, Korotina AV, Rusinov GL, et al. Search for azolo[1,2,4,5]tetrazines biotargets in mycobacteria. 43rd FEBS Congress Proceedings. *FEBS OpenBio* 2018; 8: 263–263 Suppl. 1 Meeting Abstract: p. 09–172–M.
5. Maslov DA, Bekker OB, Alekseeva MG, Kniazeva LM, Mavletova DA, Afanasyev II, et al. Aminopyridine- and aminopyrimidine-based serine/threonine protein kinase inhibitors are drug candidates for treating drug-resistant tuberculosis. *Bulletin of RSMU.* 2017 Feb 28;(1):38–43. DOI: 10.24075/brsmu.2017-01-04.
6. Cooper CB. Development of *Mycobacterium tuberculosis* Whole Cell Screening Hits as Potential Antituberculosis Agents. *J Med Chem.* 2013 Oct 24;56 (20): 7755–60.
7. Belisle JT, Mahaffey SB, Hill PJ. Isolation of *Mycobacterium* Species Genomic DNA. *Mycobacteria Protocols.* Totowa, NJ: Humana Press; 2010. p. 1–12.
8. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2010 Mar 1; 26 (5): 589–95. PMID: PMC2828108.
9. Li H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics.* 2011 Nov 1; 27 (21): 2987–93. PMID: PMC3198575.
10. Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res.* 2012 Mar; 22 (3): 568–76. PMID: PMC3290792.
11. Richard M, Gutiérrez AV, Viljoen AJ, Ghigo E, Blaise M, Kremer L. Mechanistic and Structural Insights Into the Unique TetR-Dependent Regulation of a Drug Efflux Pump in *Mycobacterium abscessus*. *Front Microbiol Frontiers.* 2018; 9: 649. PMID: PMC5895659.
12. Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Gutierrez C, Simoes N, Vincent V, et al. Macro-array and bioinformatic analyses reveal mycobacterial “core” genes, variation in the ESAT-6 gene family and new phylogenetic markers for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology. Microbiol Society.* 2004 Feb; 150 (Pt 2): 483–96.
13. Sasseti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol.* 2003 Apr; 48 (1): 77–84.
14. Peters JS, Calder B, Gonnelli G, Degroev S, Rajaonarifara E, Mulder N, et al. Identification of Quantitative Proteomic Differences between *Mycobacterium tuberculosis* Lineages with Altered Virulence. *Front Microbiol.* 2016; 7 (139): 813. PMID: PMC4885829.