ГЕНЕТИКА, 2021, том 57, № 1, с. 108–111

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 579.873.21;577.21;616.24-002.5

# ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ *in vitro* СКРИНИНГА КАНДИДАТОВ В АНТИМИКОБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ, ОПОСРЕДОВАННУЮ MMPS5-MMPL5-ТРАНСПОРТЕРАМИ

**© 2021 г. К. В. Шур[1], С. Г. Фролова[1, 2], Н. И. Акимова[1], В. Н. Даниленко[1], Д. А. Маслов[1, *]**

[1]*Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119333 Россия*

[2]*Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Московская обл., Долгопрудный, 141701 Россия*

**e-mail: maslov_da@vigg.ru*

Поступила в редакцию 05.02.2020 г.
После доработки 11.03.2020 г.
Принята к публикации 19.03.2020 г.

Возникновение лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам является глобальным вызовом и требует разработки новых лекарств, активных в отношении устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis*. Одной из задач, возникающей при разработке, является определение механизмов возникновения или осуществления такой устойчивости к кандидату в лекарство. Система эффлюкса MmpS5-MmpL5 способна обеспечивать лекарственную устойчивость микобактерий к широкому спектру антибиотиков, в том числе к бедаквилину, клофазимину, тиацетазонам, азолам и имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинам. Нами сконструирован рекомбинантный штамм *M. smegmatis* Δ*mmp5*, делеционный по генам *mmpS5-mmpL5* оперона и являющийся гиперчувствительным к имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинам. Сравнение чувствительности пары штаммов *M. smegmatis mc2 155* и *M. smegmatis* Δ*mmp5* к кандидатам в антимикобактериальные соединения может быть использовано в качестве тест-системы для установления возможного участия системы эффлюкса MmpS5-MmpL5 в формировании устойчивости на ранних стадиях скрининга.

*Ключевые слова: Mycobacterium smegmatis*, тест-система, лекарственная устойчивость, противотуберкулезные препараты.

**DOI:** 10.31857/S001667582101015X

Туберкулез является одним из наиболее опасных социально-значимых заболеваний человека. В связи с постоянным ростом числа штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, устойчивых к существующим противотуберкулезным препаратам (**ПТП**), актуальным подходом в борьбе с туберкулезом является создание принципиально новых, высокоактивных в отношении возбудителя ПТП, способных преодолевать лекарственную устойчивость [1]. По последним данным в различных фазах клинических испытаний находится около 23 новых препаратов и схем терапии туберкулезной инфекции. Однако к последнему разработанному и внедренному в клиническую практику ПТП – бедаквилину (TMC 207) [2] – уже известны случаи возникновения лекарственной устойчивости [3, 4]. Таким образом, разработка новых кандидатных противотуберкулезных препаратов требует более внимательного подхода и должна включать в себя исследование механизмов возникновения устойчивости у бактерий как вызванной мутациями (приобретенная устойчивость), так и вследствие имеющихся у бактерии систем защиты (природная лекарственная устойчивость) [5].

Один из механизмов, обеспечивающих лекарственную устойчивость микобактерий к широкому спектру антибиотиков, обусловлен клеточными транспортерами, осуществляющими обратный транспорт (эффлюкс) антибиотиков из клетки. Белки эффлюкса подразделяются на пять семейств в зависимости от их структуры, используемой энергии и субстрат-специфичности: суперсемейство АТФ-связывающих кассет (ATP-binding cassette superfamily, ABC), суперсемейство основных помощников (major facilitator superfamily, MSF), семейство малых белков множественной лекарственной устойчивости (small multidrug resistance family, SMR), семейство экструзии лекарств и токсичных соединений (multidrug and toxic compound extrusion family, MATE) и семейство белков устойчивости-клубнеобразования-деления (resistance-nodulation-division family, RND). Системы эффлюкса могут обусловливать высокий уровень устойчивости микобактерий к рифампицину,

офлоксацину, этамбутолу, стрептомицину и другим антимикробным агентам [6].

Клеточные помпы микобактерий класса RND консервативны и отличаются от других транспортеров этого же класса у других бактерий. Им было присвоено отдельное название – Mmp (mycobacterial membrane proteins) [7]. Одним из представителей Mmp-транспортеров микобактерий является система MmpS5-MmpL5 [8]. Данная система кодируется генами *mmpS5-mmpL5* оперона, который присутствует в геноме микобактерий, как медленно- (*M. tuberculosis*, *M. marinum*, *M. bovis*, *M. ulcerans*, *M. africanum*), так и быстрорастущих (*M. aurum, M. smegmatis*, *M. intracellulare*, *M. abscessus*, *M. avium*). У медленнорастущих представителей рода экспрессию оперона регулирует транскрипционный фактор семейства MarR [9], в то время как у быстрорастущих – транскрипционный регулятор TetR [10]. Мутации в гене-репрессоре приводят к сверхэкспрессии *mmpS5-mmpL5* оперона, вызывая резистентность микобактерий к различным препаратам: азолам [11], клофазимину и бедаквилину у *M. tuberculosis* [3], производным тиоацетазона у *M. abscessus* [10] и имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинам у *M. smegmatis* [12].

Таким образом, исследование возможного участия системы MmpS5-MmpL5 в формировании лекарственной устойчивости микобактерий к разрабатываемым препаратам на ранних этапах скрининга позволит повысить качество создаваемых препаратов, активных как в отношении *M. tuberculosis*, так и других представителей микобактерий, обладающих опероном *mmpS5-mmpL5.*

В данной работе мы описываем создание диагностической пары: *M. smegmatis mc2 155* и *M. smegmatis* с делетированным опероном *mmpS5-mmpL5* (*M. smegmatis* Δ*mmp5*), а также работоспособность системы с использованием перспективных противотуберкулезных препаратов класса имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинов [13]. Выбор данного организма для создания тест-системы обусловлен тем, что *M. smegmatis mc2 155* является быстрорастущей непатогенной бактерией, несущей в составе своего генома (NC_008596.1) данный оперон (гены *MSMEG_1381-MSMEG_1382*).

*M. smegmatis* Δ*mmp5* получен методом гомологичной рекомбинации с использованием суицидной системы p2NIL/pGOAL19 [14]. Фрагмент генов *MSMEG_1381-MSMEG_1382,* содержащий плечи для гомологичной рекомбинации длинной 1253 и 2665 пн, был амплифицирован с использованием праймеров pN-1381-2-del-f1 5'-TTTTAAGCTTCGAAGAGAAGCGGACGTGTA-3' и pN-1381-2-d-r4 5'-TTTTGGATCCTCGGTCTCCGCATACTGTTG-3', при этом в него была внесена делеция в 2828 пн методом сайт-направленного мутагенеза по Р.М. Нельсону [15] с использованием праймеров pN-1381-2-del-r1 5'-ATGCGCGAGAACGACCTTCGGGTTGAAGTC-3' и pN-1381-2-del-f2 5'-CGAAGGTCGTTCTCGCGCATGAAAGAGGAA-3'. Амплифицированный фрагмент был клонирован в плазмиду p2NIL по сайтам рестрикции *Hin*dIII и *Bam*HI, после чего в полученную конструкцию по сайту рестрикции *Pac*I была лигирована кассета из плазмиды pGOAL19. Итоговой конструкцией электропорировали клетки *M. smegmatis mc2 155*, после чего проводили отбор единичных кроссоверов на триптон-соевом агаре (M290, Himedia, Индия), содержащем канамицин (50 мкг/мл), гигромицин (50 мкг/мл) и X-Gal (50 мкг/мл), отбирая синие колонии. Синие колонии выращивали ночь в жидкой среде Middlebrook 7H9 с добавлением ADC (Himedia, Индия), Tween-80 и глицерина, затем высевали серийные десятикратные разведения на триптон-соевый агар, содержащий X-Gal (50 мкг/мл) и 2%-ную сахарозу. Отбирали белые колонии двойных кроссоверов и тестировали их на чувствительность к канамицину. Для отбора мутантов, несущих желаемую делецию, проводили ПЦР-скрининг с фланкирующими делецию праймерами s-13812-f 5'-ACAAAGGTGCTCGGTCGAAT-3' и s-13812-r 5'-GGACGACCAGTGTGTCGAA-3'. Делецию подтверждали севенированием по Сэнгеру.

Затем определили уровень лекарственной чувствительности сконструированного делеционного мутанта *M. smegmatis* Δ*mmp5* в сравнении со штаммом дикого типа *M. smegmatis mc2 155.* Анализ лекарственной чувствительности был проведен с использованием метода определения минимальных ингибирующих концентраций (**МИК**). Для определения МИК культуры клеток исследуемых штаммов *M. smegmatis* культивировали в среде Middlebrook 7H9 ADC, содержащей полисорбат-80 и глицерин (Himedia, Индия) в течение суток при 37°C и периодическом помешивании (250 об./мин). Далее культуры уравнивали до $OD_{600}$ = 0.05 средой 7H9 и вносили в ячейки 96-луночного планшета, содержащие серийные двукратные разведения исследуемых соединений. Для проведения тестирования лекарственной чувствительности были использованы имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразины – **3a**, **3h**, **3n** и **3c**, описанные нами ранее [13], основной механизм устойчивости к которым обеспечен системой MmpS5-MmpL5 [12]. Оценку роста клеточных культур проводили визуально после двух суток инкубации при 37°C и периодического помешивания (290 об./мин), рис. 1.

Анализ результатов тестирования МИК у *M. smegmatis* Δ*mmp5* показал повышение лекарственной чувствительности к веществам класса имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразины: в два раза к соединению **3a**, более, чем в четыре раза – к **3c**, в четыре раза – к **3h** и в два раза – к **3n** (табл. 1).

Результаты определения МИК соединений класса имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинов подтвер-

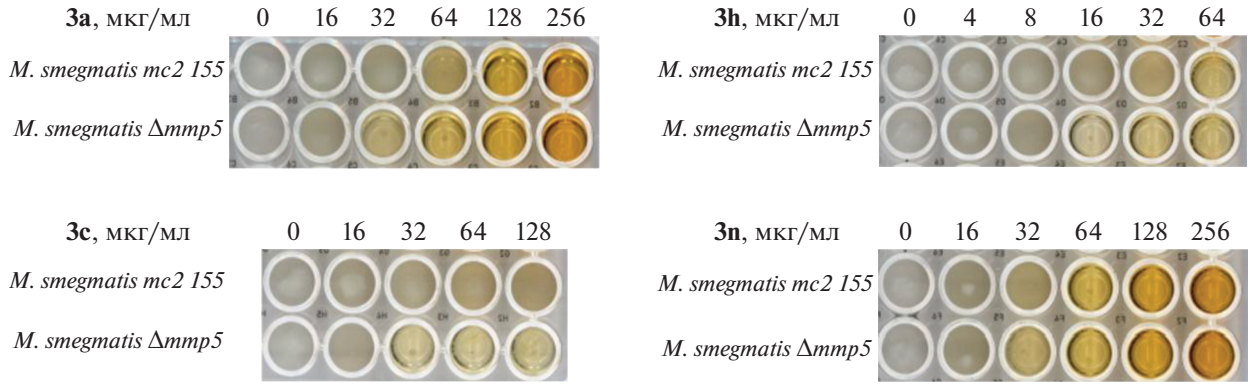


**Рис. 1.** Рост культур клеток *M. smegmatis mc2 155* и *M. smegmatis Δmmp5* в присутствии серийных двукратных разведений соединений **3a**, **3c**, **3h**, **3n**. Концентрации соединений указаны в мкг/мл, в каждой лунке 200 мкл: 196 мкл клеточной суспензии и 4 мкл соединений, растворенных в 2%-ном диметилсульфоксиде (ДМСО). Положительный контроль (0) содержит 2%-ный ДМСО.

дили возможность использования пары штаммов *M. smegmatis mc2 155* и *M. smegmatis Δmmp5* в качестве тест-системы для установления участия системы MmpS5-MmpL5 в формировании лекарственной устойчивости к разрабатываемым ПТП. Созданная и протестирована тест-система *in vitro*-скрининга перспективных антимикобактериальных агентов позволит проводить ранний скрининг разрабатываемых хит-соединений на предмет участия оперона *mmpS5-mmpL5* в реализации лекарственной устойчивости к ним. Ввиду того, что система эффлюкса MmpS5-MmpL5 может обеспечивать устойчивость микобактерий к соединениям совершенно различных химических классов, что осложняет *in silico* предсказание подверженности разрабатываемых соединений MmpS5-MmpL5-опосредованному эффлюксу, использование созданной *in vitro* тест-системы, можно рекомендовать при исследовании всех новых классов ПТП. Также штамм *M. smegmatis Δmmp5* может стать основой для выявления механизмов действия (получение спонтанных лекарственно-устойчивых мутантов) перспективных ПТП, устойчивость к которым обеспечивается данными транспортерами.

Авторы выражают благодарность В.Н. Чарушину и Г.Л. Русинову за предоставленные соединения класса имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинов.

**Таблица 1.** МИК соединений **3a**, **3c**, **3h** и **3n** у *M. smegmatis mc2 155* и *M. smegmatis Δmmp5*

| Соединение | МИК, мкг/мл | |
|---|---|---|
| | *M. smegmatis mc2 155* | *M. smegmatis Δmmp5* |
| **3a** | 128 | 64 |
| **3c** | >128 | 32 |
| **3h** | 64 | 16 |
| **3n** | 64 | 32 |

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект РНФ № 17-75-20060 “Поиск биомишеней потенциальных противотуберкулезных препаратов класса азоло [1,2,4,5]тетразинов”).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2019. Geneva: WHO, 2019. 297 p.
2. *Deoghare S.* Bedaquiline: A new drug approved for treatment of multidrug-resistant tuberculosis // Indian J. Pharmacol. 2013. V. 45. № 5. P. 536–537. https://doi.org/10.4103/0253-7613.117765
3. *Andries K., Villellas C., Coeck N. et al.* Acquired resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to bedaquiline // PLoS One. 2014. V. 9. № 7. P. e102135. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102135
4. *Pym A.S., Diacon A.H., Tang S.-J. et al.* Bedaquiline in the treatment of multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis // Eur. Respir. J. 2016. V. 47. № 2. P. 564–574. https://doi.org/10.1183/13993003.00724-2015
5. *Nguyen L.* Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis*: An update // Arch. Toxicol. 2016. V. 90. № 7. P. 1585–1604. https://doi.org/10.1007/s00204-016-1727-6
6. *Gygli S.M., Borrell S., Trauner A. et al.* Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Mechanistic and evolutionary perspectives // FEMS Microbiol. Rev. 2017. V. 41. № 3. P. 354–357. https://doi.org/10.1093/femsre/fux011

7. *Li X.Z., Zhang L., Nikaido H.* Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis* // Antimicrob. Agents Chemother. 2004. V. 48. № 7. P. 2415–2423. https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2415-2423.2004
8. *Briffotaux J., Huang W., Wang X. et al.* MmpS5/MmpL5 as an efflux pump in *Mycobacterium* species // Tuberculosis. 2017. V. 107. P. 13–19. https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.08.001
9. *Radhakrishnan A., Kumar N., Wright C.C. et al.* Crystal structure of the transcriptional regulator Rv0678 of *Mycobacterium tuberculosis* // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. № 23. P. 16526–16540. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.538959
10. *Halloum I., Viljoen A., Khanna V. et al.* Resistance to thiacetazone derivatives active against *Mycobacterium abscessus* involves mutations in the MmpL5 transcriptional repressor MAB-4384 // Antimicrob. Agents Chemother. 2017. V. 61. № 4. P. e02509–16. https://doi.org/10.1128/AAC.02509-16
11. *Milano A., Pasca M.R., Provvedi R. et al.* Azole resistance in *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by the MmpS5-MmpL5 efflux system // Tuberculosis (Edinb). 2009. V. 89. № 1. P. 84–90. https://doi.org/10.1016/j.tube.2008.08.003
12. *Maslov D.A., Shur K.V., Vatlin A.A. et al.* MmpS5-MmpL5 transporters provide *Mycobacterium smegmatis* resistance to imidazo[1,2-*b*][1,2,4,5]tetrazines // Pathogens 2020. V. 9. № 3. P. 166. https://doi.org/10.3390/pathogens9030166
13. *Maslov D.A., Korotina A.V., Shur K.V. et al.* Synthesis and antimycobacterial activity of imidazo[1,2-*b*][1,2,4,5]tetrazines // Eur. J. Med. Chem. 2019. V. 178. P. 39–47. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.05.081
14. *Parish T., Stoker N.G.* Use of a flexible cassette method to generate a double unmarked *Mycobacterium tuberculosis* tlyA plcABC mutant by gene replacement // Microbiology (Reading, Engl.). 2000. V. 146. № 8. P. 1969–1975. https://doi.org/10.1099/00221287-146-8-1969
15. *Nelson R.M., Long G.L.* A general method of site-specific mutagenesis using a modification of the *Thermus aquaticus* polymerase chain reaction // Anal. Biochem. 1989. V. 180. № 1. P. 147–151. https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90103-6

# A Test-System for *in vitro* Screening Antimycobacterial Drug Candidates for MmpS5-MmpL5 Mediated Drug Resistance

**K. V. Shur[a], S. G. Frolova[a, b], N. I. Akimova[a], V. N. Danilenko[a], and D. A. Maslov[a, *]**

[a]*Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, 119333 Russia*

[b]*Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow oblast, Dolgoprudny, 141701 Russia*

**e-mail: maslov_da@vigg.ru*

Emergence of drug-resistance to anti-tuberculosis agents is a global challenge that requires development of novel drugs, active against resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. One of the tasks of drug development is to determine the mechanism of resistance of the pathogen to the drug candidate. The mycobacterial MmpS5-MmpL5 efflux system can provide resistance to a wide range of antibiotics, including bedaquiline, clofazimine, thiacetazones, azoles and imidazo[1,2-*b*][1,2,4,5]tetrazines. We were able to construct a recombinant *M. smegmatis* Δ*mmp5* strain, which carries a deletion within the *mmpS5-mmpL5* operon, and is hypersensitive to imidazo[1,2-*b*][1,2,4,5]tetrazines. Comparing the sensitivity of *M. smegmatis mc2 155* and *M. smegmatis* Δ*mmp5* to candidate antimycobacterials can be used as a test-system for determining the possible role of the MmpS5-MmpL5 efflux system in developing drug resistance at early screening stages.

**Keywords:** *Mycobacterium smegmatis*, test-system, drug resistance, anti-tuberculous drug.