

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КАНАЛА OMPF ПОРИНА *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* С НОРФЛОКСАЦИНОМ

Чистюлин Д.К., Зелепуга Е.А., Хоменко В.А., Баланева Н.Н., Чингизова Е.А., Новикова О.Д.

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН  
просп. 100 лет Владивостоку, 159, г. Владивосток, 690022, РФ; e-mail: cdk27@mail.ru  
Поступила в редакцию 22.07.2022. DOI: 10.20930/tusjbpс.2022.0535

**Аннотация** Данная работа посвящена исследованию взаимодействия OmpF порина *Yersinia pseudotuberculosis* с гидрохлоридом норфлоксацина, (Nf·HCl), производным антибиотика фторхинолонового ряда. С помощью метода бислойных липидных мембран (БЛМ) было обнаружено, что молекулы водорастворимого Nf·HCl диссоциируют на ионы и, связываясь на короткое время с участками внутри канала, блокируют ионный ток через пору OmpF порина. Исследование кинетических характеристик этого процесса совместно с использованием метода молекулярного докинга позволило построить модель, объясняющую картину данного взаимодействия. Предполагается, что внутри поринового канала с разных сторон от зоны сужения, находятся два сайта связывания с ионом Nf·H<sup>+</sup>, стабилизированные преимущественно электростатическими взаимодействиями. При этом связывание с сайтом, расположенным внутри канала вблизи вестибуля, образуемого наружными петлями порина, приводит к блокировке тока, вследствие создания пространственных затруднений для движения K<sup>+</sup> и Cl<sup>-</sup> ионов, в то время как связывание с сайтом, расположенным на выходе из канала, не препятствует прохождению тока.

**Ключевые слова:** порины грамотрицательных бактерий, норфлоксацин, бислойные липидные мембраны, антимикробная активность, молекулярный докинг.

Белки наружной мембраны (НМ) грамотрицательных бактерий играют важную роль в антибактериальной устойчивости, бактериальной вирулентности и, таким образом, влияют на патогенные свойства бактерии. В ходе эволюции бактерии, в том числе патогенные, разработали несколько стратегий для выживания во множестве вредных условий, как в окружающей среде, так и в организме хозяев. Реакция грамотрицательных бактерий на ограничение питательных веществ, окислительный стресс, повреждение оболочки, воздействие антимикробных препаратов и другие ограничивающие их рост изменения условий привели к развитию у бактерий антибиотикорезистентности. Общие (неспецифические) поры и селективные каналы, формируемые в НМ бактерий трансмембранными β-структурированными белками (поринами) обеспечивают транспорт низкомолекулярных веществ через мембрану. Этому фундаментальному процессу в биологии посвящено огромное число исследований. Значительная доля этих работ принадлежит изучению пассивной диффузии через каналы неспецифических поринов НМ бактерий (OmpF и OmpC типа), поскольку они представляют собой эффективную модель электростатически регулируемого наносита.

Основным путём проникновения молекул антибиотиков внутрь грамотрицательной бактерии являются водонаполненные каналы, образованные порообразующими белками. В результате обширного ряда исследований поринов наружной мембраны дикого типа и их мутантных форм было показано, что резистентность грамотрицательных бактерий зависит как от уровня экспрессии того или иного типа поринов, так и от особенностей структуры их внешних петель и интерьера канала. В связи с распространением антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов, в том числе госпитальных, исследование взаимодействия поринов с антибиотиками способствует не только пониманию молекулярных механизмов антибиотикорезистентности, но и необходимо для конструирования более эффективных антибиотиков с высоким уровнем проникновения в клетку-мишень.

В данной работе методами бислойных липидных мембран (БЛМ) и молекулярного докинга исследовано взаимодействие неспецифического порина OmpF, выделенного из *Yersinia pseudotuberculosis* (штамм 598, серовар 1В), с гидрохлоридом норфлоксацина (Nf·HCl), производным норфлоксацина, антибиотика фторхинолонового ряда.

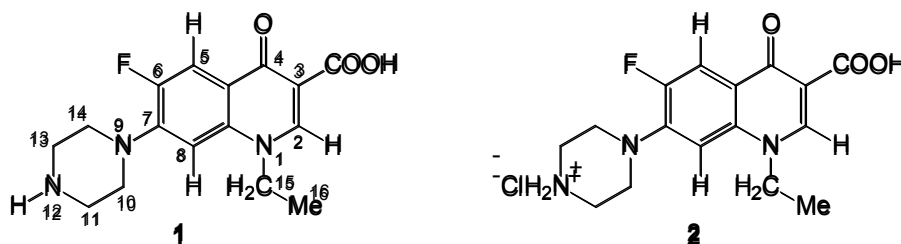


Таблица 1. Антимикробная активность моногидрохлорида норфлоксацина

Штаммы <i>Y. pseudotuberculosis</i>	ИК <sub>50</sub> , мкМ	ИК <sub>100</sub> , мкМ
Моногидрохлорид норфлоксацина	0,13±0,01	0,30±0,02
Гентамицин	6±0,12	10,5±0,04

Норфлоксацин (1) – синтетический антимикробный препарат широкого спектра действия. Как известно штаммы *Y. enterocolitica/Y. pseudotuberculosis* высоко чувствительны к фторсодержащим хинолонам (норфлоксацин, цiproфлоксацин, пефлоксацин).

Поскольку само основание (1) в воде нерастворимо, его использовали в виде хорошо растворимого моногидрохлорида. Последний получали путем обработки (1) раствором газообразного HCl в сухом метаноле (MeOH). Газообразный HCl генерировали реакцией MeOH с расчётным количеством хлористого ацетила. Молекула основания (1) имеет 3 центра связывания молекулы HCl: два третичных атома N в положениях 1 и 9 и один вторичный в положении 12. В случае норфлоксацина молекула HCl связывается, прежде всего, с вторичным атомом азота, образуя соль (2). Это было установлено через сравнение спектров ЯМР<sup>1</sup>H соединений (1) и (2). Наибольшие изменения значений химических сдвигов протонов наблюдались в спектре гидрохлорида (2) для метиленовых групп пиперазинового цикла.

Полученный Nf·HCL был протестирован на антимикробную активность в отношении культуры клеток *Y. pseudotuberculosis* (штамм 598, серovar IB) в 96-луночных микропланшетах в жидкой питательной среде Мюллера-Хинтона. 90 мкл бактериальной суспензии *Y. pseudotuberculosis* (10<sup>9</sup> КОЕ в 1 мл в среды) добавляли в каждую лунку микропланшета, инкубировали в термостатируемом шейкере при 37 °C в течение 24 ч. Ингибирование роста микроорганизмов оценивали путем измерения оптической плотности при 620 нм с помощью считывающего устройства для микропланшетов (BioTek, США) после предварительного встряхивания в течение 10 мин [1,2]. Эксперимент проводили дважды в трех повторах. В качестве положительного контроля использовали гентамицин, в качестве отрицательного контроля — 1% раствор диметилсульфоксида в солевом фосфатном буфере. Nf·HCL. Как следует из данных таблицы, Nf·HCL обладает высокой антимикробной активностью, значительно превосходящей таковую стандартного антибиотика.

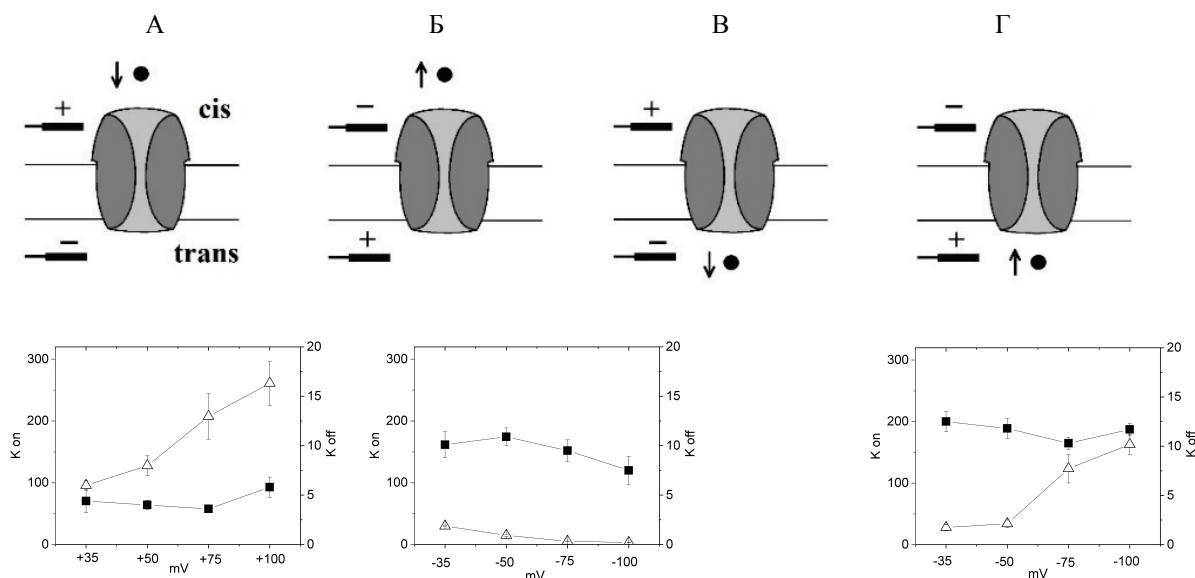
Проведенные электрофизиологические исследования показали следующее. Добавление Nf·HCL в ячейку, со встроенным в липидный бислой OmpF порином *Y. pseudotuberculosis*, вызывало появление многочисленных событий блокировки пориновых каналов. Вероятно, молекулы водорастворимого Nf·HCL диссоциируют на ионы и на короткое время, связываясь с участками внутри канала, блокируют ионный ток. В ходе эксперимента на одиночных каналах (20 нг/мл белка) были выявлены особенности взаимодействия антибиотика с порином. Потенциал на мембране варьировали в пределах от -100 до +100 мВ, антибиотик добавляли с разных сторон от мембраны, а порин — с *cis*-стороны.

Если рассматривать процесс блокировки канала как одноступенчатый, то можно рассчитать его кинетические параметры, а именно, константу ассоциации пропорциональную частоте возникновения событий блокировки и константу диссоциации обратно пропорциональную времени блокировки. В ходе эксперимента выяснилось, что на кинетические параметры влияет изначальное положение иона NfH<sup>+</sup> по отношению к порину, а также направление и величина потенциала на мембране. Схемы четырех принципиально различных положений ионов NfH<sup>+</sup> по отношению к молекуле порина, при разных направлениях приложенного к мембране потенциала и соответствующие кинетические характеристики приведены на рисунке 1 А-Г. Максимальные значения констант ассоциации (K<sub>on</sub>) и минимальные константы диссоциации (K<sub>off</sub>) наблюдались при добавлении NfH<sup>+</sup> с *cis* стороны мембраны, соответствующей области наружных петель порина (рис. 1А). Это свидетельствует о максимальном времени и максимальном количестве событий блокировки поринового канала. При этом увеличение потенциала приводит к увеличению значения K<sub>on</sub>, но не влияет на значение K<sub>off</sub>.

При противоположном по знаку потенциале (рис. 1Б), количество событий блокировки резко уменьшается, падая до очень низких значений при максимальных потенциалах (75, 100 мВ), время блокировки при этом уменьшается в среднем в два раза. Возможно, это происходит из-за того, что электрическое поле, действуя на ион NfH<sup>+</sup> в противоположном направлении, препятствует продвижению молекулы антибиотика вдоль канала.

В случае добавления NfH<sup>+</sup> с транс-стороны мембраны (рис. 1В) события блокировки не регистрируются. Однако смена направления потенциала (рис. 1Г) приводит к появлению событий блокировки канала, хотя в меньшем количестве и с меньшим временем по сравнению с условиями эксперимента, приведенными на рисунке 1А. Интересно отметить, что при достаточно высоких значениях потенциала (1Г, +75, +100мВ) происходит резкое возрастание константы ассоциации.

Для объяснения результатов электрофизиологических исследований привлечено молекулярное моделирование. *In silico* анализ взаимодействия Nf·HCL с поверхностью бислойной липидной мембраны из DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), выполненный при помощи удаленного ресурса PerMM [3] показал, что связанное с мембраной состояние является наиболее энергетически благоприятным. Оценка его



**Рисунок 1.** А – NfH<sup>+</sup> с *cis*-стороны и потенциал на *cis*-электроде положительный; Б – NfH<sup>+</sup> с *cis*-стороны и потенциал на *cis*-электроде отрицательный; В – NfH<sup>+</sup> с *trans*-стороны и потенциал на *cis*-электроде положительный; Г – NfH<sup>+</sup> с *trans*-стороны и потенциал на *cis*-электроде отрицательный. Графики зависимости кинетических констант  $K_{on}$  (белые треугольники)  $K_{off}$  (чёрные квадраты) от приложенного к мембране потенциала приведены под каждой соответствующей схемой

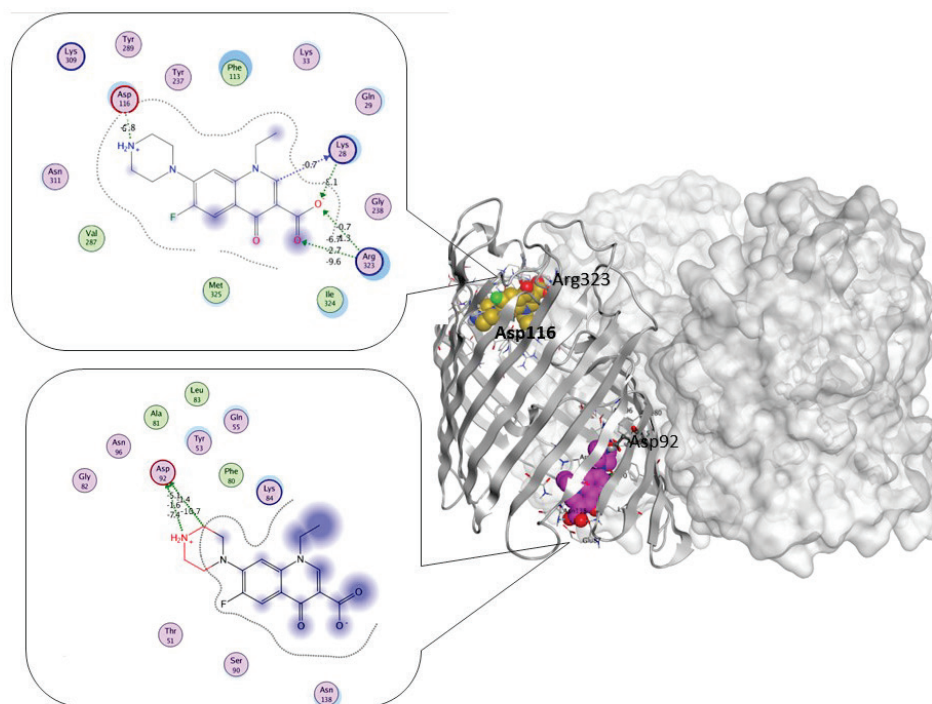
пассивной проницаемости через модельную мембрану указывает на наличие потенциального барьера величиной более  $\Delta G$  7,6 ккал/моль. Эти данные свидетельствуют о том, что транспорт антибиотика в бактериальную клетку осуществляется, по-видимому, через пориновый канал.

Для предсказания вероятных взаимодействий порина с NfH<sup>+</sup> с внутренней областью канала YrOmpF была применена методология слепого белок-лигандного докинга в программе MOE2020.0109 CCG [4]. При этом молекула антибиотика рассматривалась как гибкая, в то время как рецептор оставался жестким. В качестве рецептора.] использовали 3D-модель YrOmpF порина, которая была построена методом гомологичного моделирования с помощью программы MOE2019.01 CCG [8] на основании кристаллической структуры порина OmpF из *Escherichia coli* (PDB ID 2OMF), как это было описано ранее [5].

Вычислительные эксперименты позволили обнаружить существование двух наиболее энергетически выгодных кластеров, что указывает на наличие двух сайтов связывания NfH<sup>+</sup> на внутренней поверхности поры YrOmpF. Сайт связывания, характеризующийся минимальным значением оценочной функции (-6,50) локализован на транс-стороне канала YrOmpF (trans-минимум), в то время как второй сайт связывания (-5,56) расположен выше зоны констрикции на внеклеточной стороне канала (cis-минимум) (рис. 2). Очевидно, при поглощении антибиотика бактериальными клетками из внешней среды движение NfH<sup>+</sup> происходит от *cis*- к *trans*-стороне мембраны. Обратное движение возможно, и оно значительно усиливается при приложении потенциала ниже -50 мВ, при этом NfH<sup>+</sup> может достигнуть сайта блокировки через потенциальный барьер. Полученные нами данные согласуются с результатами исследования взаимодействия энрофлоксацина (EF) с OmpF порином *Escherichia coli* (EcOmpF) [6], для которого было показано наличие двух сайтов связывания лиганда выше и ниже зоны констрикции. Однако K.R. Mahendran и соавторы полагают, что EF стабилизирован в центрах связывания преимущественно благодаря гидрофобным взаимодействиям с остатками Met38 и консервативным Phe118, а также водородными связями с Arg132, Arg 82 и Tyr32.

Для детальной характеристики данных сайтов связывания были отобраны наиболее энергетически выбранные решения, которые подвергались процедуре минимизации энергии, в силовом поле Amber 14: ЕНТ для оптимизации полученных структур, позволяющей учесть гибкость боковых цепей рецептора. В случае YrOmpF оценка энергетического вклада межмолекулярных взаимодействий в стабилизацию комплекса белка с Nf-HCL, выполненная с помощью соответствующего приложения программы MOE CCG [7], позволяет предполагать, что в данном случае основной движущей силой взаимодействия являются электростатические силы. При этом роль «горячих точек» взаимодействия принадлежит Arg323 и Asp116 в cis-минимуме и Asp92 в trans-минимуме.

Действительно, несмотря на то что EcOmpF и YrOmpF характеризуются высокой степенью гомологии аминокислотной последовательности (более 50%), они имеют некоторые различия, в частности в длине и пространственной организации внешних петель, а также в распределении заряженных аминокислотных остатков во внутренней области их каналов. Так, EcOmpF характеризуется наличием гидрофобного кармана в области Met38 и Phe118 и наличием объемного ароматического остатка Tyr32 на более длинной, чем у YrOmpF петле L1, тогда как YrOmpF, вместо Met38 и Gly325 (петля L8) имеет соответственно основные остатки Lys33 и Arg 323, которые совместно формируют область положительного заряда. Именно этот кластер основных остатков



**Рисунок 2. Пространственная организация вероятных комплексов YrOmpF с Nf-HCL.** 3D структура гомотримера порина YrOmpF, две субъединицы представлены в виде молекулярной поверхности, одна в виде ленточной диаграммы. Молекулы Nf-HCL в двух сайтах связывания приведены в шаровом представлении, в *trans* положении – розовым, в *cis* положении – желтым, окружающие их аминокислотные остатки приведены в стержневом представлении. В выносках приведены 2D диаграммы межмолекулярных взаимодействий Nf-HCL в обоих сайтах связывания

определяет ориентацию карбоксильной группы молекулы антибиотика, в то время как его пиперазиновый цикл взаимодействует с Asp116 внутри сайта связывания в области устья внешнего вестибуля поры YrOmpF. Суммарный вклад солевых мостиков в энергию связывания составляет -23,63 ккал/моль.

Таким образом, показано, что электростатические взаимодействия вносят основной вклад при связывании антибиотика с обоими сайтами. При этом с *cis*-стороны ключевым остатком является Arg323 (-9,60 ккал/моль), с *trans*-стороны — Asp92 (-14,03 ккал/моль). Очевидно, при поглощении антибиотика бактериальными клетками из внешней среды движение NfH<sup>+</sup> происходит от *cis*-к *trans*-стороне мембраны. Обратное движение возможно, и оно значительно усиливается при приложении потенциала ниже -50 мВ, при этом NfH<sup>+</sup> может достигнуть сайта блокировки через потенциальный барьер.

Результаты исследования взаимодействия YrOmpF, выделенного из грамотрицательной бактерии *Y. pseudotuberculosis* (штамм 598, серовар IB) с моногидрохлоридом норфлоксацина, проявляющего высокую антимикробную активность в отношении данного штамма, расширяют представления о механизме проницаемости антибиотиков в каналы грамотрицательных патогенов, что способствует разработке эффективных антибиотиков против иерсиний, вызывающих широко распространенное и социально-значимое кишечное заболевание.

#### Список литературы / References:

- Wayne P.A. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard—Tenth edition. CLSI Document M07-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, 2015. *Studies in mycology*, Baarn, 1974, vol. 6, p. 119.
- Lomize A.L., Hage J.M., Schnitzer K., Golobokov K., LaFaive M.B., Forsyth A.C. Pogozeva I.D. PerMM: A WebTool and Database for Analysis of Passive Membrane Permeability and Translocation Pathways of Bioactive Molecules. *J. Chem. Inf. Model.*, 2019, vol. 59, no. 7, pp. 3094-3099.
- MolecularOperatingEnvironment (MOE), 2019.01. *Chemical Computing Group ULC*, 1010 Sherbooke St. West, Suite no. 910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2021.
- Likhatskaya G.N., Solov'eva T.F., Novikova O.D., Issaeva M.P., Gusev K.V., Kryzhko I.B., Trifonov E.V., Nurminski E.A. Homology models of the *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* general porins and comparative analysis of their functional and antigenic regions. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2005, vol. 23, no. 2, pp. 163-174, doi: 10.1080/07391102.2005.10507056.
- Mahendran K.R., Hajjar E., Mach T., Lovelle M., Kumar A., Sousa I., Spiga E., Weingart H., Gameiro P., Winterhalter M., Ceccarelli M. Molecular Basis of Enrofloxacin Translocation through OmpF, an Outer Membrane

Channel of *Escherichia coli* – When Binding Does Not Imply Translocation. *J. Phys. Chem. B*, 2010, vol. 114, pp. 5170-5179.

7. Clark A.M., Labute P. 2D depiction of protein–ligand complexes. *J. Chem. Inf. Model.*, 2007, no. 47, pp. 1933-1944.

#### INTERACTION OF THE *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* OMPF PORIN CHANNEL WITH NORFLOXACIN

Chistyulin D.K., Zelepuga E.A., Khomenko V.A., Balaneva N.N., Chingizova E.A., Novikova O.D.

*G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS,  
prosp. 100 let Vladivostoku, Vladivostok, 690022, Russia; e-mail: cdk27@mail.ru*

Received 22.07.2022. DOI: 10.20930/rusjbpс.2022.0535

**Abstract.** This work is devoted to the study of the interaction of *Yersinia pseudotuberculosis* OmpF porin with norfloxacin hydrochloride (Nf•HCL), a derivative of a fluoroquinolone antibiotic. Using the bilayer lipid membrane (BLM) method, it was found that water-soluble Nf•HCL molecules dissociate into ions and, binding for a short time to sites inside the channel, block the ion current through the OmpF porin pore. The study of the kinetic characteristics of this process, together with the use of the molecular docking method, made it possible to construct a model that explains the pattern of this interaction. It is proposed that inside the porin channel, on opposite sides of the constriction zone, there are two binding sites with the Nf•H<sup>+</sup> ion, stabilized mainly by electrostatic interactions. At the same time, binding to the site located inside the channel near the vestibule formed by the outer loops of the porin leads to blocking of the current, due to the creation of spatial difficulties for the movement of K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions, while binding to the site located at the exit from the channel does not prevent the passage of current.

**Key words:** porins of gram-negative bacteria, norfloxacin, lipid bilayer membranes, antimicrobial activity, molecular docking.