

МИГРАЦИЯ ОРЦИНОЛА ЧЕРЕЗ МОДЕЛЬНЫЕ МЕМБРАНЫ *Escherichia coli***Терешкин Э.В., Терешкина К.Б., Крупянский Ю.Ф.**ФГБУН ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семенова
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: ramm@mail.ru

Поступила в редакцию: 27.07.2020

Аннотация. В работе методами классической молекулярной динамики исследуется влияние орцинола (3,5-дигидрокситолуола; 5-метилрезорцина) на модельные мембраны граммотрицательной бактериальной клетки *Escherichia coli* и миграция молекул орцинола через модельные мембраны и через поры внешней мембраны, образованные поринами. Оба слоя внутренней мембраны и внутренний монослой внешней мембраны смоделированы как смешанные слои 75% POPE / 25% POPG. Наружный монослой внешней мембраны состоит из липополисахаридов. Исследована динамика модельных мембран в присутствии орцинола. С помощью потенциала средней силы определены профили свободной энергии миграции молекулы орцинола через канал порина внешней мембраны и плазматическую мембрану. Обнаружено, что основным механизмом миграции молекул орцинола через мембраны являются непосредственно бислои. Показано, что молекулы орцинола могут как проникать внутрь клетки через мембраны и взаимодействовать с внутриклеточными структурами, так и легко встраиваться в бислои, изменяя их физико-химические параметры.

Ключевые слова: 5-метилрезорцин, орцинол, мембрана *E. coli*, молекулярная динамика, миграция малых молекул через бактериальную мембрану.

Изучение миграции малых молекул через мембраны бактериальных клеток представляет собой актуальную биомедицинскую задачу. Легко проникающие через мембрану малые молекулы, могут связываться с внутриклеточными белками и ДНК, модулируя их активность, служить индикаторами и изменять активность бактериальной клетки в целом. В работе исследуются молекулярные механизмы миграции одной из малых молекул - орцинола - через мембраны *E. coli*. Орцинол – природное соединение, которое синтезируется многими видами лишайников и относится к алкилрезорцинолам (1,3-дигидроксibenзолам с алкильными заместителями в положениях 4 или 5), представляющим собой отдельный подкласс алкилированных гидроксibenзолов (фенолов), обладающих широким спектром биологических функций и действующих как на клетки биологических организмов в целом, так и на отдельные клеточные структуры [1, 2]. Орцинол и его производные используются в биотехнологии, химии, фармакологии и находят биологическое применение в составе веществ, обладающих антиоксидантной и антибактериальной активностью. В связи с этим исследование молекулярных механизмов миграции этих молекул внутрь бактериальной клетки и его влияния на мембранные структуры клетки является актуальным.

Для определения структурных и энергетических характеристик молекулы орцинола были проведены *ab initio* расчёты. Использовался универсальный пакет квантово-химических программ FIREFLY [3], частично основанный на исходном коде пакета GAMESS (US) [4]. Основные расчёты проводились неограниченным методом Хартри-Фока (НХФ, UHF) [5]. Для аппроксимации электростатического потенциала с целью нахождения парциальных атомных зарядов использовался расширенный базисный набор, содержащий поляризационные и диффузные функции, 6-311++G(d,p), был использован алгоритм поиска электростатического потенциала GEODESIC. Необходимые внутри- и межмолекулярные константы находились с использованием наборов базисных функций 6-311G(d,p), 6-31G+(d). Проводилась процедура усреднения зарядов для симметричных атомов и их параметризация для молекулярно-динамического силового поля.

Клеточная оболочка *E. coli* обладает сложным строением и состоит из плазматической мембраны и клеточной стенки из пептидогликана и наружной мембраны. Барьерами к проникновению молекул в клетку являются плазматическая мембрана и клеточная стенка, образованная периплазматическим пространством (содержащим пептидогликан) и внешней мембраной [6]. Основными путями проникновения малых молекул в клетку могут служить как свободная диффузия через бислои, так и использование каналов белка порина, тримеры которых находятся во внешней мембране. Для моделирования каналов, в мембраны в процессе сборки встраивался тримерный интегральный белок порин OmpF (PDB ID: 1OPF), обеспечивающий пассивный транспорт небольших гидрофильных молекул через внешнюю мембрану *E. coli*. Для ускорения расчётов нахождения свободной энергии использовался встроенный в мембрану порин в мономерной форме.

Были разработаны модели мембран, содержащие основные типы головок липидов внутренней (плазматической) мембраны *E. coli* [7] – фосфатидилглицеролы и фосфатидилэтанолламины. Для сборки бислоев был использован пакет для комплексного биологического моделирования мембран CHARMM-GUI [8]. Оба слоя внутренней мембраны и внутренний бислой внешней мембраны были смоделированы как смешанные слои 75% POPE (ПОФХ, 1-пальмитоил-2-олеил-фосфатидилхолин) / 25% POPG (ПОФГ, 1-пальмитоил-2-олеил -sn-глицерин-3-фосфоглицерин). Наружный монослой внешней мембраны состоял из 100% липополисахаридов. Такой состав липидов и их соотношение могут служить простейшими моделями ровных участков (не изгибов, где ещё обязательно содержится кардиолипин) бактериальных мембран и хорошо согласуются с имеющимися экспериментальными данными [6, 9-11].

Динамика систем рассчитывалась в программе Gromacs 2018 [12]. Комплекс DPS-ДНК был помещён в кубическую элементарную ячейку с ребром 24,23973 нм. Для нейтрализации заряда системы в ячейку были добавлены ионы Na^+ . Для сольватации систем использовалась модель воды SCE, также добавлялись ионы Na^+ , Cl^- в концентрации 150 мМ. Расчёты проводились в силовом поле AMBER99-PARMBS1 [13]. Проводилась минимизация энергии систем и последовательная релаксация в условиях постоянного объёма и затем давления длительностью по 100 пс. Вычисления динамики проводились в NPT ансамбле. Постоянная температура поддерживалась с помощью стохастического термостата; постоянное давление – с помощью термостата Парринелло-Рамана с постоянной времени 2 пс. Быстрые степени свободы ограничивались с помощью алгоритма LINCS. Радиусы обрезания для кулоновских и ван-дер-ваальсовых взаимодействий брались равными 1,5 нм. Температура системы составляла 373 К. Шаг интегрирования – 2фс, длина траекторий – от 10 до 100 нс в зависимости от типа расчёта.

Исследована динамика модельных мембран в присутствии разных концентраций орцинола при температурах 300К, 310К, 320К. Для сравнения проведены исследования мембран состава 50% ДПФЭ / 50% ДПФГ. При всех исследованных температурных режимах наблюдалось проникновение молекул орцинола внутрь бислоя и прохождение их через бислой. На рис. 1а показано положение молекул орцинола относительно мембраны 75% POPE / 25% POPG в расчётный момент времени 36 нс, молекулы воды и ионы опущены. Видно, что молекулы орцинола не собираются в большие агломераты, однако в системе постоянно присутствуют кластеры из 2-6 молекул. Орцинол легко переходит из кластеризованного в свободное состояние, а также легко проходит в мембрану, отрываясь от кластеров. Распределение плотности атомов относительно центра мембраны показывает, что предпочтительное положение молекул орцинола в мембране – в области перехода между липидными головками и хвостами липидов (рис. 2б). Расчёт площади, приходящейся на молекулу липида показывает, что средняя площадь на липид в присутствии орцинола увеличивается примерно на 5%; для 75% POPE / 25% POPG при 310К с 55Å^2 до $57,5\text{Å}^2$. Таким образом видно, что молекулы орцинола могут свободно диффундировать через бислой, проникая к внутренним структурам клетки.

Одной из задач исследования было определить, каким образом молекулы орцинола могут проникать через внешнюю мембрану *E. coli*. Расчёты проводились для систем 1) бислоя и 2) мономера порина, встроенного в тот же бислой. С помощью потенциала средней силы определены профили свободной энергии миграции молекулы орцинола в этих системах (рис. 2). В рамках метода зонтичной выборки к молекуле орцинола прикладывался дополнительный потенциал. Гармоническая силовая константа потенциала, воздействующего на молекулу орцинола, была равна $1000\text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{нм}^{-2}$, скорость изменения исходного положения молекулы – $0,01\text{ нм/пс}$. Проведены расчёты 10-наносекундных траекторий для 400 точек, выбранных вдоль координаты миграции орцинола - от $-3,5\text{ нм}$ до $3,5\text{ нм}$ вдоль оси, перпендикулярной плоскости бислоя. Профиль свободной энергии восстановлен методом взвешенных гистограмм. Расчёт свободной энергии миграции орцинола через порин (синяя кривая) показывает, что существует значительный энергетический барьер на пути миграции орцинола внутрь клетки через пориновые каналы. Несмотря на небольшой размер гидрофобного «хвоста» молекулы орцинола ($-\text{CH}_3$), этот участок молекулы способствует взаимодействию орцинола с петлёй L6 порина (P239 I T N K F T N T S G F250), ответственной за переход канала этого белка из открытого в закрытое состояние [14]. Связывание орцинола с петлёй L6 порина и конформационные переходы в этой области белка определяют видимые на графике колебания в области 0-3 нм, значительно замедляющие диффузию молекулы орцинола через канал порина. То есть, основным путём миграции орцинола является свободная диффузия через бислой (красная кривая). Энергетический барьер составляет 20-25 ккал/моль. Для ускорения расчётов в задаче поиска свободной

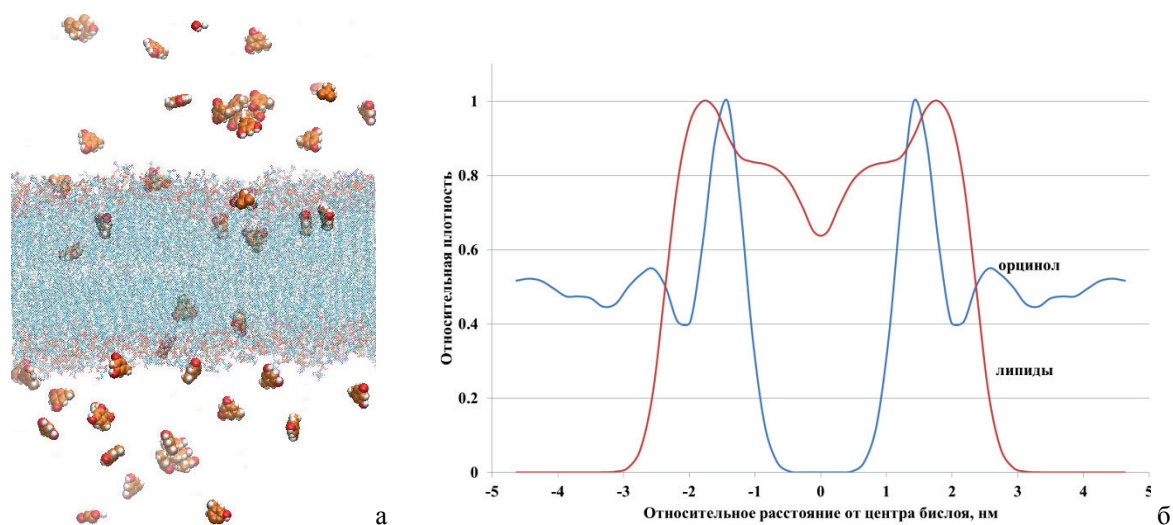


Рисунок 1. а – Положение молекул орцинола (атомы показаны ван-дер-ваальсовыми шариками) относительно внутренней мембраны *E. coli* на 36 нс расчёта. б – относительная плотность распределения атомов орцинола и липидов за 50 нс траектории. Расчёт мембраны 75% POPE / 25% POPG при 310 К

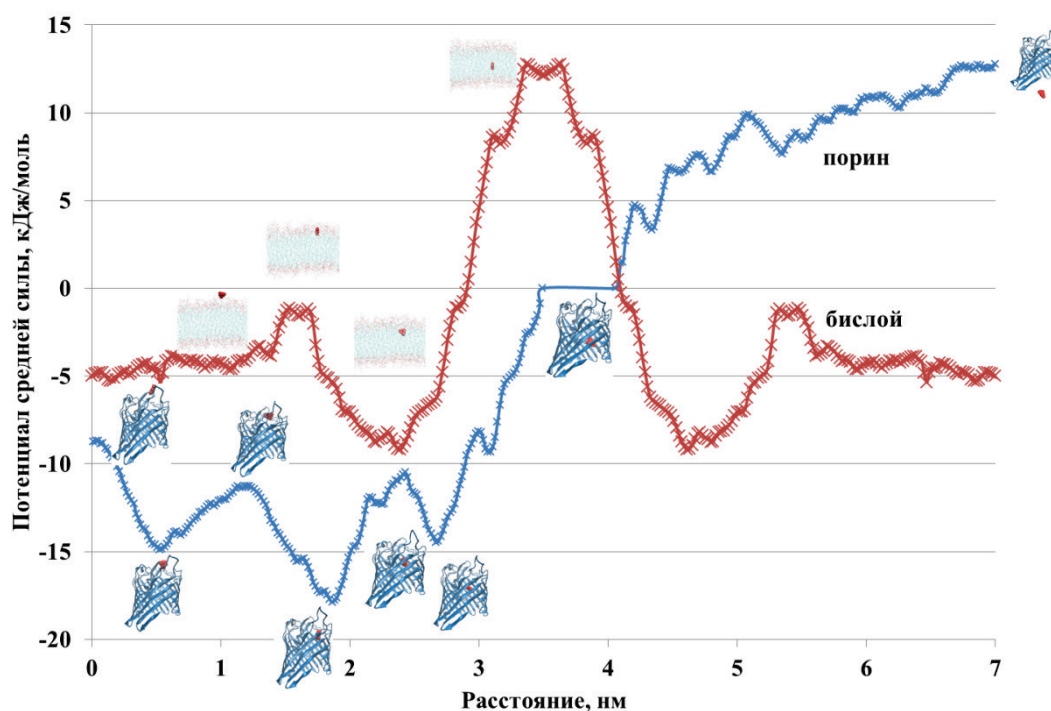


Рисунок 2. Профиль потенциала средней силы между молекулами орцинола и порина (синяя кривая); орцинола и бислоевой мембраной (красная кривая) в зависимости от расстояния между их центрами. На рисунках показаны уменьшенные изображения порина и мембраны, на которых красным выделено соответствующее положение орцинола

энергии в систему не были включены молекулы липополисахаридов, однако молекулярно-динамические исследования бислоев, содержащих этот тип молекул показывают, что полисахаридные слои не связывают орцинол и не препятствуют его проникновению к головкам липидов.

Таким образом, полученные в результате исследования данные показывают, что молекулы орцинола могут свободно диффундировать через бислои внутренней и внешней мембран *E. coli*, что позволяет им связываться с внутриклеточными структурами и оказывать влияние непосредственно на белки и ДНК внутри клетки *E. coli*. Орцинол также оказывает влияние непосредственно на мембраны, немного (примерно до 5%) увеличивая площадь на липид. По-видимому, каналы пориновых белков не являются основным путём миграции орцинола внутрь клетки из-за связывания метильной группы с петлёй L6 порина.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России (Тема 0082-2019-0015, № АААА-А20-120031490003-7, Тема 0104-2019-0005). Расчеты проводились на высокопроизводительной вычислительной системе МВС-10П в Межведомственном суперкомпьютерном центре Российской академии наук (МЦЦ РАН), проект СРН2.

Список литературы / References:

1. Крупянский Ю.Ф., Нокс П.П., Лойко Н.Г. и др. Влияние химических шаперонов на свойства лизоцима и белка реакционного центра бактерий *Rhodobacter sphaeroides*. *Биофизика*, 2011, т. 56, № 1, с. 13-30. [Krupyanskiy Yu.F., Noks P.P., Lojko N.G. et al. Vliyanie himicheskikh shaperonov na svojstva lizocima i belka reakcionnogo centra bakterij *Rhodobacter sphaeroides*. *Biofizika*, 2011, vol. 56, no. 1, pp. 13-30. (In Russ.)]
2. Терешкина К.Б., Степанов А.С., Сеницын Д.О., Крупянский Ю.Ф. Влияние малых лигандов и их комплексов на свойства белка лизоцима. *Химическая физика*, 2014, т. 33, № 7, с. 64-73. [Tereshkina K.B., Stepanov A.S., Sinicyn D.O., Krupyanskiy YU.F. Vliyanie malyh ligandov i ih kompleksov na svojstva belka lizocima. *Himicheskaya fizika*, 2014, vol. 33, no. 7, pp. 64-73. (In Russ.)]
3. Granovsky A.A. Firefly version 8. [www http://classic.chem.msu.ru/gran/firefly/index.html](http://classic.chem.msu.ru/gran/firefly/index.html)
4. Schmidt M.W., Baldrige K.K., Boatz J.A., Elbert S.T., Gordon M.S., Jensen J.H., Koseki S., Matsunaga N., Nguyen K.A., Su S., Windus T.L., Dupuis M., Montgomery J.A. General atomic and molecular electronic structure system. *J.Comput.Chem.*, 1993, vol. 14, pp. 1347-1363. DOI: 10.1002/jcc.540141112.
5. Foresman J.B., Frisch A. *Exploring chemistry with electronic structure methods* 2ed. Gaussian, Inc. Pittsburgh, PA, 1996, pp. 107-116.
6. Warren E. Levinson, *Review of Medical Microbiology and Immunology*, 11th Edition. Publisher: McGraw-Hill Medical, 2010, 640 p.
7. Sohlenkamp C., Geiger O. Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiology Reviews*, 2016, vol. 40, iss. 1, pp. 133-159. DOI: 10.1093/femsre/fuv008.

8. Lee J., Cheng X., Swails J.M., Yeom M.S., Eastman P.K., Lemkul J.A., Wei S., Buckner J., Jeong J.C., Qi Y., Jo S., Pande V.S., Case D.A., Brooks C.L. III, MacKerell A.D. Jr, Klauda J.B., Im W. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations using the CHARMM36 Additive Force Field. *J. Chem. Theory Comput.*, 2016, vol. 12, pp. 405-413. DOI: 10.1021/acs.jctc.5b00935.
9. Oursel D., Loutelier-Bourhis C., Orange N., Chevalier S., Norris V., Lange C.M. Lipid composition of membranes of *Escherichia coli* by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using negative electrospray ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2007, vol. 21, no. 20, pp. 1721-1728. DOI: 10.1002/rcm.3013.
10. Oursel D., Loutelier-Bourhis C., Orange N., Chevalier S., Norris V., Lange C.M. Identification and Relative Quantification of Fatty Acids in *Escherichia Coli* Membranes by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, vol. 21, no. 20, pp. 3229-3233. DOI: 10.1002/rcm.3177.
11. Frauenfeld J., Gumbart J., van der Sluis E.O., Funes S., Gartmann M., Beatrix B., Mielke T., Berninghausen O., Becker T., Schulten K., Beckmann R., Cryo E.M. structure of the ribosome-SecYE complex in the membrane environment. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2011, vol. 18, pp. 614-621.
12. Hess B., Kutzner C., van der Spoel D., Lindahl E. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *J. Chem. Theory Comput.*, 2008, vol. 4, pp. 435, DOI: 10.1021/ct700301q.
13. Ivani I., Dans P.D., Noy A. et al. Parmbsc1: a refined force field for DNA simulations. *Nat Methods*, 2015, vol. 13, no. 1, p. 55. DOI : 10.1038/nmeth.3658.
14. Yildiz O., Vinothkumar K.R., Goswami P., Kühlbrandt W. Structure of the monomeric outer-membrane porin OmpG in the open and closed conformation [published correction appears in *EMBO J.* 2006 Nov 1;25(21):5240]. *EMBO J.*, 2006, vol. 25, no. 15, pp. 3702-3713. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601237.

ORCINOL MIGRATION THROUGH MODEL MEMBRANES OF *Escherichia coli*

Tereshkin E.V., Tereshkina K.B., Krupyanskii Y.F.

Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences
Kosygina str., 33, Moscow, 119991, Russia; e-mail: ramm@mail.ru

Abstract. In this work, the influence of orcinol (3,5-dihydroxytoluene; 5-methylresorcinol) on model membranes of a gram-negative bacterial cell of *Escherichia coli* and the migration of orcinol molecules through model membranes and through the pores of the outer membrane formed by porins were investigated using the methods of classical molecular dynamics. Both the inner membrane leaflets and the inner leaflet of the outer membrane were modeled as mixed layers of 75% POPE / 25% POPG lipids. The outer leaflet of the outer membrane was composed of lipopolysaccharides. The dynamics of model membranes in the presence of orcinol was studied. Using the potential of mean force, the free energy profiles of migration of the orcinol molecule through the porin channel and the membrane were determined. It was found that the main mechanism of migration of orcinol molecules into the cell is diffusion through bilayers. It has been shown that orcinol molecules can both penetrate into the cell through membranes for interaction with intracellular structures, and can easily integrate into bilayers, changing their physicochemical parameters.

Key words: 5-methylresorcinol, orcinol, *E. coli* membrane, molecular dynamics, migration of small molecules through the bacterial membrane.