

УДК 577.24

Генетическая вариабельность основной помпы множественной лекарственной устойчивости AcrAB-TolC определяет резистентность грамотрицательных бактерий к SkQ1

П. А. Назаров^{1,2*}, Е. А. Котова¹, В. П. Скулачев^{1,3}, Ю. Н. Антоненко¹¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992 Россия²Митотех, Москва, 119991 Россия³НИИ митоинженерии, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*E-mail: nazarovpa@gmail.com

Поступила в редакцию 16.10.2019

Принята к печати 18.11.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-4-93-98

РЕФЕРАТ Новый антибиотик SkQ1, действующий на бактериальную биоэнергетику, очень эффективен против грамположительных и грамотрицательных бактерий. Однако некоторые грамотрицательные бактерии, такие, как *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*, проявляют к нему высокую устойчивость, причем у различных грамотрицательных бактерий эта устойчивость определяется идентичностью аминокислотных последовательностей белка-транспортера AcrB и соответствующего белка из *E. coli*. SkQ1 откачивается из клеток *E. coli* с помощью основной помпы множественной лекарственной устойчивости AcrAB-TolC. Нами показано, что устойчивость *E. coli* к SkQ1, в отличие от устойчивости к хлорамфениколу, не зависит от малого вспомогательного белка помпы – AcrZ.

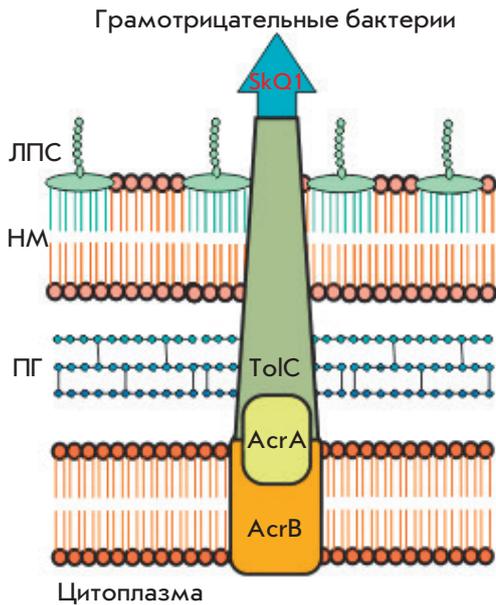
КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА SkQ1, AcrZ, помпа AcrAB-TolC, множественная лекарственная устойчивость.

ВВЕДЕНИЕ

SkQ1 – пластохинон, конъюгированный с децилтрифенилфосфонием, – является представителем нового класса антибиотиков, которые влияют непосредственно на бактериальную биоэнергетику. Благодаря способности подавлять рост широкого спектра грамотрицательных и грамположительных бактерий SkQ1 может найти применение в медицине и сельском хозяйстве, поэтому важным представляется изучение его влияния на микробные экосистемы и развитие устойчивости к нему. Нами показано [1, 2], что устойчивость бактерии *Escherichia coli* к SkQ1 обусловлена наличием специфической помпы множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) AcrAB-TolC (рис. 1), определяющей резистентность к широкому спектру антибиотиков, поверхностно-активных веществ, солей желчных кислот, красителей и малых органических молекул [3]. Однако в нашей работе [1] не были проанализированы все TolC-зависимые помпы, а именно предполагаемая TolC-зависимая помпа EmrKY-TolC и EntS, а также белок AcrZ. Известно,

что состоящий из 49 аминокислотных остатков небольшой вспомогательный белок внутренней мембраны AcrZ (он же YbhT) связывается с комплексом AcrAB-TolC, в состав которого входят белки AcrA, AcrB и TolC, и повышает способность помпы откачивать из клетки определенные классы субстратов, такие, как тетрациклин, пурамицин и хлорамфеникол [4].

Бактерии обладают генетической пластичностью, что позволяет им реагировать на широкий спектр экологических угроз, таких, как антибиотики. Бактерии используют две основные генетические стратегии выживания: (1) приобретение детерминант устойчивости посредством горизонтального переноса гена и (2) мутации, связанные с мишенями антибиотиков [5]. Аминокислотные последовательности белков AcrA, AcrB и TolC идентичны у лабораторных субштаммов В и К-12 *E. coli* [6]. Ранее мы показали, что удаление любого из белков AcrA, AcrB или TolC приводит к полной потере устойчивости к SkQ1 [1]. Расстояние между оперонами TolC и AcrB в хромо-



Грамположительные бактерии

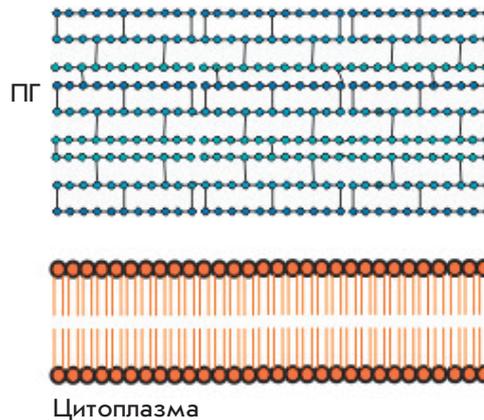


Рис. 1. Схема клеточной стенки бактерий (ЛПС – липополисахариды, НМ – наружная мембрана, ПГ – пептидогликановый слой) и антибактериальное действие SkQ1 в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Чувствительность грамотрицательных бактерий к SkQ1 зависит от структуры белков-компонентов помпы AcrAB-TolC

	МИК, мкг/мл
<i>Escherichia coli</i>	19
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	0.6–1.2
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	0.6–1.2

	МИК, мкг/мл
<i>Bacillus subtilis</i>	0.6–1.2
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.6–1.2

соем *E. coli* составляет около 175 т.п.н. [7], таким образом, вероятность приобретения устойчивости, опосредованной помпой AcrAB-TolC, через межвидовой горизонтальный перенос генов очень мала.

На сегодняшний день устойчивость, опосредованная помпой МЛУ, представляет собой единственный известный механизм резистентности к SkQ1, а AcrAB-TolC является единственным известным насосом, удаляющим SkQ1 из клетки. На основании данных о способности малого белка AcrZ регулировать устойчивость к таким антибиотикам, как тетрациклин, пурамицин и хлорамфеникол [4], можно предположить, что устойчивость к SkQ1 также модулируется AcrZ. С другой стороны, резистентность к SkQ1 могла бы модулироваться локальными и глобальными регуляторами транскрипции, а также посредством посттранскрипционной и посттрансляционной регуляции [8].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы стандартные лабораторные штаммы *E. coli*, штаммы MG1655 и W3110 (F-lambda-IN (rrnD-rrE) 1 rph-1). Штаммы *E. coli* MC1061, DH5α и BL21(DE3) предоставлены С.С. Соколовым (НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ), штамм *E. coli* JM109 – Л.А. Новиковой (НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ), штамм *E. coli*

GR70N получен от Ю.В. Берцовой (НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ), штамм *E. coli* XL1-Blue приобретен у компании «Евроген» (Москва, Россия).

Делеционные штаммы *E. coli* ЕСК0751 (лишенные гена *acrZ*), ЕСК0584 (лишенные гена *entS*), ЕСК2363 (лишенные гена *emrY*), ЕСК2364 (лишенные гена *emrK*) любезно предоставлены Н. Niki (National Institute of Genetics, Япония) [9].

Staphylococcus aureus получен из коллекции микроорганизмов МГУ им. М.В. Ломоносова (№ 144). *Photobacterium phosphoreum* предоставлен А.Д. Исмаиловым (НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ). *Rhodobacter sphaeroides* получен от G. Klug (Institute for Microbiology and Molecular Biology at Justus-Liebig-University of Giessen, Германия).

Бактериальные клетки выращивали при 37°C в среде LB или Мюллера–Хинтона при частоте встряхивания 140 об / мин как описано в [1].

Исследование устойчивости к SkQ1 осуществляли методом двойных разведений в жидкой питательной среде с использованием панелей собственного производства согласно рекомендациям Института клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI). Для исследования была использована жидкая среда Мюллера–Хинтона (HIMEDIA, Мумбай, Индия). Панель концентраций готовили в 96-луночном микротитро-

Таблица 1. Восприимчивость бактерий к SkQ1: измерения минимальной ингибирующей концентрации (МИК). Сравнение активности SkQ1 с различными антибиотиками по отношению к *Staphylococcus aureus* в одинаковых условиях

Бактерия	Антибиотик	МИК, мкг/мл	Источник
Штаммы <i>E. coli</i>			
W3110	SkQ1	19	[1]
MG1655	SkQ1	19	Данная работа
JM109	SkQ1	19	«
BL21(DE3)	SkQ1	19	«
XL1-Blue	SkQ1	19	«
DH5 α	SkQ1	19	«
MC1061	SkQ1	19	«
GR70N	SkQ1	19	«
<i>E. coli</i> MG1655 делеционные штаммы			
AcrD, AcrE, AcrF, MacA, MacB, MdtA, MdtB, MdtC, MdtE, MdtF, EmrA, EmrB	SkQ1	19	[1]
AcrZ, EmrK, EmrY, EntS	SkQ1	19	Данная работа
AcrA, AcrB, TolC	SkQ1	0.6–1.2	[1]
<i>R. sphaeroides</i>	SkQ1	0.6–1.2	Данная работа
<i>P. phosphoreum</i>	SkQ1	0.6–1.2	«
<i>K. pneumoniae</i>	SkQ1	>19	«
<i>S. aureus</i>	SkQ1	0.6–1.2	Данная работа, [1]
	Канамицин	2.5	Данная работа
	«	3.1	[10]
	Хлорамфеникол	5	Данная работа
	«	3.1	[10]
	Ампициллин	2.5	Данная работа
	«	1.6	[10]
	Стрептомицин	6.3	[10]
Полимиксин В	100	[10]	

вальном планшете в объеме 200 мкл. Бактериальную суспензию (50 мкл) в среде Мюллера–Хинтона добавляли к каждой лунке для получения 250 мкл суспензии (5×10^5 КОЕ/мл). Полученную суспензию инкубировали при 37°C в течение 20 ч [1].

Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) определяли как самую низкую концентрацию, которая полностью ингибировала рост бактерий. Рост бактерий наблюдали визуально наряду с измерениями OD₆₂₀ [1].

Для биоинформатического анализа мы использовали поисковый инструмент BLASTp (NCBI, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), базу данных STRING v.10.5 (EMBL, <http://string.embl.de/>) и базу данных BioCyc из коллекции баз данных Pathway/Genome (PGDBs, <https://biocyc.org/>) BioCyc.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы сравнили устойчивость различных лабораторных штаммов *E. coli* и выяснили, что все эти штаммы устойчивы к SkQ1 (табл. 1). Это объясняется, по-видимому, идентичностью первичной структуры белков AcrA, AcrB и TolC у всех изученных нами штаммов [6].

Ранее [1] нами было показано, что граммотрицательные бактерии *P. phosphoreum* и *R. sphaeroides*, в отличие от штаммов *E. coli*, не обладают устойчивостью к SkQ1. Из данных, приведенных в табл. 2, следует, что аминокислотная последовательность белков этих бактерий, аннотированных как AcrB, довольно сильно отличается от последовательности белка AcrB из *E. coli*. Уровень их идентичности с белком AcrB *E. coli* составляет 65 и 33% соответственно, что и определяет, по-видимому, чувствительность этих бактерий к SkQ1. Отметим, что белок AcrD, удаление которого не влияет на чувствительность к SkQ1, на 66% идентичен последовательности белка AcrB, что сравнимо с белками AcrB из *P. phosphoreum* и *R. sphaeroides*. Таким образом, для резистентности бактерий к SkQ1 требуется большее сходство аминокислотной последовательности их белка AcrB с последовательностью белка AcrB из *E. coli*. Чтобы проверить это заключение, мы проанализировали первичную структуру белка AcrB другой граммотрицательной бактерии *Klebsiella pneumoniae*, которая оказалась на 91.5% идентичной структуре белка AcrB из *E. coli*. Это дало нам основание предположить наличие резистентности к SkQ1 у *K. pneumoniae*, что и было подтверждено экспериментально (табл. 1 и 2).

Анализ антибактериальной активности SkQ1 по отношению к делеционным мутантам *E. coli* по белкам EmrK, EmrY и EntS (рис. 2) показал, что минимальные ингибирующие концентрации SkQ1 были такими же, как определенные нами для штамма дикого типа *E. coli* (табл. 1).

Чтобы проверить роль белка AcrZ в устойчивости *E. coli* к SkQ1, мы сравнили устойчивость штаммов дикого типа *E. coli* MG1655 и штаммов с делецией белков AcrZ и AcrB. Если белок AcrZ участвует в функционировании помпы МЛЮ AcrAB-TolC с формированием комплекса AcrABZ-TolC, то для удаления SkQ1 устойчивость делеционного мутанта по белку AcrZ должна быть выше устойчивости му-

Таблица 2. Сравнение последовательностей гена *acrB* из различных штаммов грамотрицательных бактерий с *acrB* из штамма *E. coli*

Бактерия	Идентификационный номер	Покрытие, %	Идентичность, %	Устойчивость к SkQ1
<i>E. coli</i> MG1655	NP_414995.1	100	100	ДА
<i>E. coli</i> W3110	BAE76241.1	100	100	ДА
<i>E. coli</i> AcrB*	NP_416965.1*	99	66	НЕТ
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	CAQ30935.1	100	100	ДА
<i>E. coli</i> DH5 α	KGA88788.1	100	100	ДА
<i>R. sphaeroides</i>	ANS33442.1	97	33	НЕТ
<i>P. phosphoreum</i>	CEO37741.1	98	65	НЕТ
<i>K. pneumoniae</i>	CDO13174.1	99	91.5	ДА

Примечание. В случае делеционного мутанта *E. coli* MG1655 по белку AcrB, обозначенного звездочкой, сравнение проводили с последовательностью белка AcrD. Идентичность аминокислотной последовательности определяли как процент идентичных аминокислотных остатков в соответствующих положениях в выровненных последовательностях. Покрытие определяли как процент выровненной последовательности белка AcrB. Отсутствие (НЕТ) и наличие (ДА) устойчивости к SkQ1 определяли по отношению к *E. coli*, где МИК SkQ1, сравнивая с МИК SkQ1 для *E. coli*, служила критерием устойчивости.

танта с делецией белка AcrB, но ниже, чем у белка дикого типа. Если белок AcrZ не участвует в функционировании помпы AcrAB-TolC, то устойчивость мутанта с делецией белка AcrZ должна быть такой же, как у штамма дикого типа, и выше, чем в случае делеции белка AcrB. В качестве положительного контроля в этих опытах использовали хлорамфеникол [10], удаление которого из клетки усиливается под действием белка AcrZ [4]. Влияние белка AcrZ на устойчивость к SkQ1 и хлорамфениколу определяли одновременно, чтобы исключить зависимость получаемых результатов от условий эксперимента.

В наших экспериментах делеционный мутант по белку AcrZ обладал такой же устойчивостью к SkQ1, как и штаммы дикого типа *E. coli* (*puc. 3*), тогда как три штамма *E. coli* (WT, Δ AcrZ и Δ AcrB) показали разные уровни устойчивости к хлорамфениколу (*puc. 3*) как описано ранее [4]. Согласно [4], связывание AcrZ с AcrB может вызывать конформационные изменения в его периплазматическом домене, что влияет на распознавание и захват субстратов с низкой гидрофобностью. Поскольку SkQ1 является высокогидрофобным соединением ($\log P = 4.11$) [11, 12], его распознавание помпой может не регулироваться связыванием AcrZ с AcrB.

Анализ делеционных мутантов показал, что помпа EmrKY-TolC не принимает участие в откачке SkQ1 из бактериальной клетки. Удаление гена *entS* также не влияло на откачку SkQ1 из бактериальной клетки. Таким образом, подтвердилось наше заключение о том, что AcrAB-TolC является единственной помпой, откачивающей SkQ1.

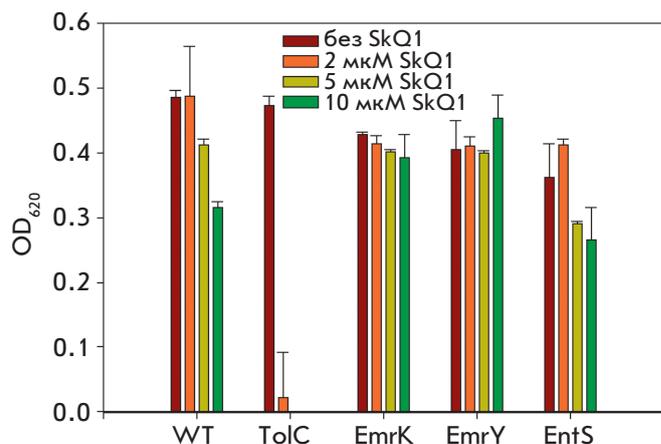


Рис. 2. Токсичность SkQ1 в отношении *E. coli* MG1655 и его делеционных мутантов Δ TolC (положительный контроль), Δ EmrK, Δ EmrY и Δ EntS. SkQ1 (2–10 мкМ) добавляли к бактериальным культурам ($1-5 \times 10^5$ клеток / мл), помещенным в 96-луночные планшеты. Плотность клеток определяли по поглощению при 620 нм. После этого бактерии растили в течение 20 ч при 37°C и снова измеряли плотность клеток. Данные представляют собой средние значения \pm стандартное отклонение, по меньшей мере, для трех экспериментов

Другим возможным модулятором устойчивости к SkQ1 могла бы быть 6S РНК, регулятор сигма-70-зависимой транскрипции генов [13]. Наши предварительные исследования не выявили различий в устойчивости к SkQ1 между делеционным мутан-

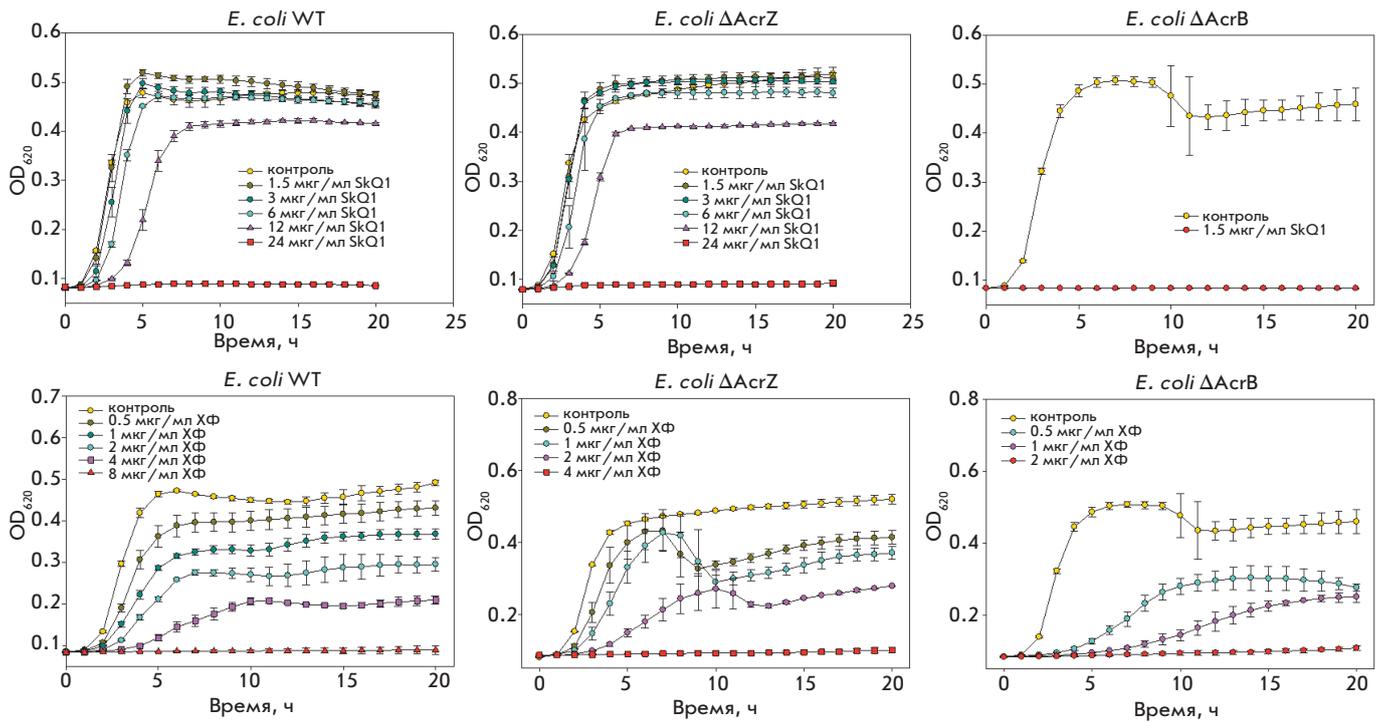


Рис. 3. Влияние SkQ1 (верхняя панель) и хлорамфеникола (ХФ) (нижняя панель) на рост бактерий *E. coli* (WT, ΔAcrB и ΔAcrZ). SkQ (1.5–24 мкг/мл) или хлорамфеникол (0.5–8 мкг/мл) добавляли к бактериальным культурам (5×10^5 клеток/мл), помещенным в 96-луночные планшеты. Рост оценивали по ежедневно измеряемой во время инкубации оптической плотности при 620 нм с помощью планшетного спектрофотометра Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США). Бактериям давали расти в течение 20 ч при 37°C. Точки данных представляют собой средние значения \pm стандартное отклонение, по меньшей мере, для трех экспериментов

том *E. coli* по белку SsrS и штаммом *E. coli* дикого типа. Нельзя исключить, что устойчивость к таким антибиотикам, нацеленным на биоэнергетику, как SkQ1, может быть повышена за счет тривиального увеличения уровня экспрессии. Недавно было показано [13], что экспрессию помп плеiotропной лекарственной устойчивости у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* можно индуцировать додецилтрифенилфосфонием, другим представителем этого класса антибиотиков, т.е. додецилтрифенилфосфоний может служить как активатором, так и ингибитором лекарственной устойчивости [14, 15]. Однако нет прямой взаимосвязи между временной активацией экспрессии и постоянным увеличением плеiotропной устойчивости к подобным веществам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные результаты показывают, что SkQ1 является эффективным антибиотиком, устойчивость к которому бактерий *E. coli* обусловлена лишь наличием помпы AcrAB-TolC. Существенный фактор, определяющий устойчивость других грамотрицательных бактерий к SkQ1, – идентичность их белков AcrB и AcrB из *E. coli*. Белок AcrZ не участвует в формировании устойчивости к SkQ1, иными словами, обычный способ регуляции устойчивости за счет влияния на помпу МЛЮ AcrAB-TolC через белок AcrZ не эффективен в случае SkQ1. ●

Работа поддержана грантом РНФ № 16-14-10025. Мы благодарны А.С. Корзиной за помощь на протяжении всего проекта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nazarov P.A., Osterman I.A., Tokarchuk A.V., Karakozova M.V., Korshunova G.A., Lyamzaev K.G., Skulachev M.V., Kotova E.A., Skulachev V.P., Antonenko Y.N. // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 1. P. 1394.
 2. Khailova L.S., Nazarov P.A., Sumbatyan N.V., Korshunova G.A., Rokitskaya T.I., Dedukhova V.I., Antonenko Y.N., Skulachev V.P. // Biochemistry (Mosc.) 2015. V. 80. № 12. P. 1589–1597.
 3. Pos K.M. // Biochim. Biophys. Acta. 2009. V. 1794. № 5. P. 782–793.

4. Hobbs E.C., Yin X., Paul B.J., Astarita J.L., Storz G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 41. P. 16696–16701.
5. Munita J.M., Arias C.A. // *Microbiol. Spectr.* 2016. V. 4. № 2. 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
6. Karakozova M.V., Nazarov P.A. // *Bull. RSMU*. 2018. V. 2. P. 32–36.
7. Keseler I.M., Mackie A., Peralta-Gil M., Santos-Zavaleta A., Gama-Castro S., Bonavides-Martínez C., Fulcher C., Huerta A.M., Kothari A., Krummenacker M., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41 (Database issue). P. D605–D612.
8. El Meouche I., Dunlop M.J. // *Science*. 2018. V. 362. № 6415. P. 686–690.
9. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., Mori H. // *Mol. Syst. Biol.* 2006. V. 2. 2006.0008. doi: 10.1038/msb4100050
10. Sabath L.D., Garner C., Wilcox C., Finland M. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1976. V. 9. № 6. P. 962–969.
11. Martyushin A.A., Tsarev D.A., Grigorenko M.A., Fedorov I.I., Ramenskaya G.V., Tashlitsky V.N., Skulachev V.P. // *Pharmacia*. 2008. V. 5. P. 23–29.
12. Antonenko Y.N., Avetisyan A.V., Bakeeva L.E., Chernyak B.V., Chertkov V.A., Domnina L.V., Ivanova O.Y., Izyumov D.S., Khailova L.S., Klishin S.S., et al. // *Biochemistry (Mosc.)*. 2008. V. 73. № 12. P. 1273–1287.
13. Wassarman K.M. // *Microbiol. Spectr.* 2018. V. 6. № 3. 10.1128/microbiolspec.RWR-0019-2018.
14. Galkina K.V., Besedina E.G., Zinovkin R.A., Severin F., Knorre D. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 8131. P. 1–11.
15. Knorre D.A., Markova O.V., Smirnova E.A., Karavaeva I.E., Sokolov S.S., Severin F.F. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014. V. 450. № 4. P. 1481–1484.