

# 革兰氏阴性菌 AcrAB-TolC 多药外排泵结构数据对抑制剂研发的启示

顾容兆<sup>1,2,3</sup>, 郑威<sup>1,2,3</sup>, 石小东<sup>\*1,2,3</sup>

1 徐州医科大学 江苏省麻醉学重点实验室, 江苏 徐州 221004

2 徐州医科大学 江苏省麻醉与镇痛应用技术重点实验室, 江苏 徐州 221004

3 国家药品监督管理局麻醉精神药物研究与评价重点实验室, 江苏 徐州 221004

顾容兆, 郑威, 石小东. 革兰氏阴性菌 AcrAB-TolC 多药外排泵结构数据对抑制剂研发的启示[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1863-1873

Gu Rongzhao, Zheng Wei, Shi Xiaodong. Structural insights into the AcrAB-TolC efflux pump of Gram-negative bacteria promote the development of pump inhibitors[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1863-1873

**摘要:** 革兰氏阴性菌的多重耐药性已成为全球广泛聚焦的问题。近年研究发现, 耐药结节细胞分化(resistance-nodulation-cell division, RND)家族外排泵的过表达, 与革兰氏阴性菌的多重耐药性密切相关。在 RND 家族中, 广泛存在于革兰氏阴性菌中的 AcrAB-TolC 外排泵被认为是导致多重耐药性的主要原因之一。为了开发有效的抑制剂, 需要对 AcrAB-TolC 外排泵的结构有一个清晰的认识。以往对该外排泵结构的研究主要局限于体外采用 X 射线晶体学技术或冷冻电镜单颗粒分析技术来解析其单个组分或全泵的结构。细胞冷冻电子断层扫描技术为揭示 AcrAB-TolC 外排泵在天然细胞膜环境中的组装和运行机制提供了新的见解, 本文综述了 AcrAB-TolC 不同层级的结构数据在研发外排泵抑制剂方面的贡献。

**关键词:** 多重耐药; 耐药结节细胞分化家族外排泵; AcrAB-TolC; 外排泵抑制剂

基金项目: 国家自然科学基金(82072312); 江苏省自然科学基金(BK20211053)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (82072312); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20211053)

\*Corresponding author: E-mail: xiaodongs01@163.com

Received: 2021-09-26; Accepted: 2021-11-16; Published online: 2021-12-30

# Structural insights into the AcrAB-TolC efflux pump of Gram-negative bacteria promote the development of pump inhibitors

GU Rongzhao<sup>1,2,3</sup>, ZHENG Wei<sup>1,2,3</sup>, SHI Xiaodong<sup>\*1,2,3</sup>

1 Jiangsu Province Key Laboratory of Anesthesiology, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, Jiangsu, China

2 Jiangsu Province Key Laboratory of Anesthesia and Analgesia Application Technology, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, Jiangsu, China

3 National Medical Products Administration Key Laboratory for Research and Evaluation of Narcotic and Psychotropic Drugs, Xuzhou 221004, Jiangsu, China

**Abstract:** The emerging of multidrug resistance (MDR) in Gram-negative bacteria has aroused worldwide concern. Overexpression of efflux pumps, especially the resistance-nodulation-cell division (RND) efflux pumps, has been demonstrated to be closely associated with MDR in Gram-negative pathogens. In RND family, AcrAB-TolC efflux pump, which is widely present in Gram-negative bacteria, is a decisive factor of bacteria to develop MDR. To develop effective efflux pump inhibitors, we need to clear understand the structure of AcrAB-TolC. The available studies about the structure of this pump are limited to individual components or the whole pump structures determined by X-ray crystallography or single-particle cryo-electron microscopy. The recently developed cryo-electron tomography sheds new light on the assembly and operating mechanism of this pump in the native cell membrane environment. Here, we summarize the contributions of the structural data of AcrAB-TolC efflux pump to the discovery of pump inhibitors against antibiotic resistance in bacteria.

**Keywords:** multidrug resistance; RND family efflux pump; AcrAB-TolC; efflux pump inhibitor

病原体日益增长的多重耐药性(multidrug resistance, MDR)已成为威胁人民健康的主要因素。据估计,全球每年约有70万人死于耐药菌感染<sup>[1]</sup>。我国是面临细菌耐药性威胁最严重的国家<sup>[2]</sup>。尽管细菌耐药的机制复杂多样,通过外排泵快速地将药物主动外排被认为是其产生耐药性的重要原因。根据结构特征和能量需求,外排泵可分为六大家族,它们是主要协助转运蛋白超家族(major facilitator superfamily, MFS)、小多重耐药性(small multidrug resistance, SMR)家族、多药和有毒化合物外排(multidrug and toxin extrusion, MATE)家族、耐药结节细胞分化(resistance-nodulation-cell division, RND)家族、ATP结合盒(ATP

binding cassette, ABC)家族和变形菌抗菌化合物外排(proteobacterial antimicrobial compound efflux, PACE)家族<sup>[3]</sup>。除RND家族外,其余5个家族外排泵广泛地分布于革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌中,而RND外排泵仅存在于革兰氏阴性菌中,其在革兰氏阴性菌的固有耐药和获得性耐药中均发挥主要作用<sup>[4]</sup>。

临床上,大部分严重感染都来自革兰氏阴性菌耐药菌感染<sup>[5]</sup>。革兰氏阴性菌的胞外被膜由两层膜组成,是阻挡药物进入的有力屏障。RND外排泵能够有效地外排多种毒性分子,从而降低其在细胞内的浓度,是许多临床相关的革兰氏阴性菌多重耐药的主要决定因素<sup>[6]</sup>。这些外排泵横跨细胞内外膜和膜间质,由外膜

通道蛋白、膜间质融合蛋白和内膜外排转运蛋白三部分组成<sup>[7]</sup>。AcrAB-TolC 是 RND 家族中最著名的外排泵, 并作为这类泵的原型得到了最为广泛的研究<sup>[4]</sup>。AcrAB-TolC 外排泵由外膜蛋白 TolC、膜间质融合蛋白 AcrA 和内膜转运蛋白 AcrB 组成, 存在于多种肠杆菌中, 如大肠埃希菌、沙门菌和肺炎克雷伯菌。其他革兰氏阴性菌中也存在 AcrAB-TolC 外排泵的同源复合物, 如铜绿假单胞菌中的 MexAB-OprM、空肠弯曲杆菌中的 CmeABC、鲍曼不动杆菌中的 AdeABC 等, 在临床上分离出来的耐药菌株中, 这些复合物的表达往往上调<sup>[8-10]</sup>。

革兰氏阴性菌耐药性的出现对人类的健康造成极大的威胁, 为临床治疗带来新的挑战, 对于 RND 外排泵结构的研究迫在眉睫<sup>[11]</sup>。鉴于 AcrAB-TolC 外排泵在 RND 外排泵中的重要地位, 科研人员已经做了大量的工作来研究该复合物的结构。对外排泵结构的研究有助于揭示其作用机制和药物靶点, 从而促进有效、选择性强、安全性高的外排泵抑制剂的设计。本文综述了通过 X 射线晶体学、冷冻电镜 (cryo-electron microscopy, cryo-EM) 单颗粒分析和细胞冷冻电子断层扫描 (cellular electron cryo-tomography, cryo-ET) 等技术解析出的 AcrAB-TolC 外排泵结构数据对抑制剂设计的启示。

## 1 AcrAB-TolC 各组分的晶体结构对抑制剂研发的启示

### 1.1 AcrB

AcrB 是 AcrAB-TolC 外排泵底物特异性和能量转导的决定因素。RND 外排泵的结构研究主要集中在 AcrB 上, 其可以识别包括抗生

素、染料、去垢剂和有机溶剂在内的一系列底物<sup>[6-12]</sup>。AcrB 的首个晶体结构显示其是呈水母形状的对称同源三聚体, 其中所有的亚基都具有相同的构象, 代表了转运体未被占据的静息状态<sup>[13-14]</sup>。一个 AcrB 原体由跨膜结构域 (transmembrane domain, TMD)、输送结构域和对接结构域组成; TMD 由 12 个  $\alpha$ -螺旋和一个附着在细胞质膜表面的膜外  $\alpha$ -螺旋组成, 存在伪双重对称, 使 6 个螺旋成为一个不对称单元; 输送结构域由 PN1、PN2、PC1 和 PC2 这 4 个子结构域组成, 从外膜看, 该区域紧密包裹, 呈圆形, AcrB 三聚体中心有 3 个 PN1 子结构域, 而 PN2、PC1 和 PC2 子结构域沿外周顺时针方向分布; 对接结构域最初被认为是 TolC 的对接点, 因为 AcrB 呈现出的漏斗状结构与 TolC 的底部完美对齐<sup>[13]</sup>。然而, 在 AcrAB-TolC 外排泵结构被解析之后, 发现是 AcrA 和 TolC 直接相互作用<sup>[15-16]</sup>。不对称性的 AcrB 晶体结构随后也被解析出来, 此时 AcrB 是一个呈非对称性结构的同源三聚体, 每个亚基以不同的构象存在, 分别被称为进入状态、结合状态和排出状态, 或者松散状态(L)、紧密状态(T)和开放状态(O), 分别对应运输周期中 3 个功能状态之一, 其中 T 单体的结构变化形成了其他单体不存在的疏水口袋, 这意味着该口袋可能是输送结构域内的底物结合口袋<sup>[16]</sup>。

AcrB 结合各种底物时的共晶结构表明, AcrB 内部存在复合底物的结合位点。四种 AcrB 结合底物的对称性结构表明, 底物结合在中心腔<sup>[17]</sup>。类似地, AcrB 与一个名为 YajC 的单次跨膜蛋白形成的复合物的晶体结构显示, 6 个氨苄西林分子位于对称的 AcrB 三聚体的中心腔内<sup>[18]</sup>。然而, 在非对称的 AcrB 三聚体的中心腔内, 并未观察到底物结合。非对称

的 AcrB 三聚体与底物结合的共晶结构表明, 2 种低分子量药物米诺环素和阿霉素只结合在 T 单体的远端结合口袋<sup>[19]</sup>, 而 2 种高分子量药物利福平和红霉素, 首先在松散状态结合到近端结合口袋, 然后在紧密状态被迫进入远端口袋<sup>[20]</sup>。AcrB 和阿霉素的共晶结构表明, 位于近端结合口袋和远端结合口袋之间富含甘氨酸的转换环, 对底物从近端结合口袋易位到远端结合口袋是必不可少的<sup>[21]</sup>。此外, AcrB 结合夫西地酸的晶体结构表明, 夫西地酸结合在 TM1 和 TM2 之间的一个中空位置上, 该研究增加了一个 AcrB 的底物结合位点<sup>[22]</sup>。最近, Tam 等解析出 AcrB 与红霉素、利奈唑胺、苯唑西林和夫西地酸共同存在时的共晶结构, 该结构揭示了 T 原聚体跨膜结构域的深处是 AcrB 的一个变构结合位点, 可以容纳夫西地酸、苯唑西林或新生霉素<sup>[23]</sup>。

解析出 AcrB 结合抑制剂 D13-9001 的晶体结构是该领域的一个重大突破, 这项研究揭示了抑制剂与 AcrB 结合的机制, 将有助于寻找更有效、更广泛的抑制剂。D13-9001 是一个比较大的吡啶嘧啶化合物, 其亲水部分与远端结合口袋中的“疏水陷阱”紧密结合, 阻止外排泵发生构象改变而发挥活性<sup>[24]</sup>。随后, AcrB 和另外一种抑制剂 MBX2319 (一种吡喃吡啶衍生物) 结合的晶体结构也被解析出来; MBX2319 是一个相对较小的中性分子, 由 1 个吡啶核和周围 5 个取代基组成; 晶体结构表明, MBX2319 与结合状态的原体结合并参与多种疏水相互作用, 这些相互作用靠近 D13-9001 的结合位置<sup>[25]</sup>。根据 AcrB 的晶体结构所揭示的抑制剂结合位点, Wang 等通过整合分子设计和基于晶体结构的药效团建模方法, 以 2H-苯并[h]色烯的核心结构作为支架, 设计并合成了 51 个化合物, 从中筛选靶向大肠埃希菌 AcrB 的抑制剂; 通过

进行抑制外排能力检测, 这些化合物中有 23 个被鉴定为理想的 AcrB 抑制剂, 其中 WK2、WL7 和 WL10 表现最突出, 具有广谱和高效的外排抑制活性<sup>[26]</sup>。

Simsir 等基于截至目前所有解析的 AcrB 晶体结构, 对 AcrB 子结构域之间动态的相互作用进行了系统的分析, 揭示出各种各样可以作为药物设计的潜在作用面, 其中在单体内的潜在界面至少有 7 个, 包括 loop8-PC1、loop9-PC1 和 DC-PN1 等; 跨单体的潜在界面有 PN1-PN1 和 PN2-PC2, 前者由于被包埋在三聚体的中心, 似乎不容易被接近, 而后者则是容易被抑制剂结合的理想界面<sup>[27]</sup>。总之, AcrB 结合不同底物或抑制剂的晶体学数据为探索底物识别的相似性提供了结构基础, 有助于设计一种通用的多药外排泵抑制剂。

## 1.2 AcrA

AcrA 位于膜间质, 作为桥梁连接 TolC 和 AcrB, 其 N 端通过脂质修饰锚定在内膜上<sup>[28]</sup>。晶体学数据显示, AcrA 由 4 个结构域组成, 分别是  $\alpha$ -发夹结构域、硫辛基结构域、 $\beta$ -桶结构域和近膜结构域<sup>[29]</sup>。 $\alpha$ -发夹结构域有 2 个螺旋, 由于铰链区域很灵活, 具有多种构象, 是 TolC 的对接位点; 与  $\alpha$ -发夹结构域的灵活性相比, 硫辛基结构域和  $\beta$ -桶结构域则具有刚性<sup>[29-30]</sup>。由于近膜结构域的稳定性和结构具有无序性, 因此该结构域在晶体结构中一直是缺失的。直到解析出 AcrA 同系物 MexA 的晶体结构 5 年后, 对 MexA 的晶体学数据进行了“再细化”分析, 才成功地建立了近膜结构域模型<sup>[31]</sup>。

与被广泛研究作为潜在治疗靶点的 AcrB 不同<sup>[25,32-33]</sup>, AcrA 近年来才被确定为多药物外排抑制的变构靶点, 因为它是连接 AcrB 和 TolC 的重要纽带<sup>[15-16]</sup>。Hazel 等通过对 AcrA 晶

体结构进行分子动力学模拟, 表明 AcrA 可能以 2 种关键的构象存在<sup>[30]</sup>。近膜结构域由于具有较高的灵活性, 被推测可以作为一个有发展前途的抑制剂结合位点。Abdali 等最近的一项研究聚焦于包括近膜结构域在内的 4 个候选结合口袋, 经过高通量筛选, 他们获得了数十种可能结合在  $\beta$ -桶结构域和近膜结构域之间的化合物<sup>[34]</sup>。然而, 由于缺失近膜结构域的 AcrA 更稳健, 更容易通过蛋白纯化获得<sup>[29]</sup>, 因此对结合在非近膜结构域的抑制剂研究要易于对结合在近膜结构域的抑制剂研究。通过引入虚拟筛选, Abdali 等<sup>[34]</sup>发现了一系列与 AcrA 特异性结合的化合物, 在这些化合物中, 发现来自国家癌症研究所数据库的 NSC60339 与铰链区结合, 而且会在体内改变 AcrA 的构象; 该研究组还对 NSC60339 的几个类似物进行了构效关系研究, 证实它们与 AcrA 结合后产生的变化与外排泵抑制剂活性之间存在明显关系; 因为仅在大肠埃希菌中具有活性, NSC60339 被鉴定为一类具有物种特异性的外排泵抑制剂。此外, Haynes 等设计并合成了一系列能够结合 AcrA 铰链位点的新型化合物, 更为重要的是, 这些化合物具有跨越革兰氏阴性菌外膜的能力<sup>[35]</sup>。综上所述, AcrA 晶体结构的解析为研究者们提供了原子细节, 促进了 AcrAB-TolC 外排泵抑制剂的发现。

### 1.3 TolC

作为 AcrAB-TolC 外排泵的外膜蛋白成分, TolC 跨越细胞外膜和膜间质, 提供一个向细胞外输出的通道, 在化合物的运输中起主要作用。Koronakis 等解析出的 TolC 晶体结构显示, TolC 是一个同源三聚体, 由 3 个不同的结构域组成, 即位于外膜部分的  $\beta$ -桶状结构域、进入膜间质 100 Å 的  $\alpha$ -螺旋结构域和赤道结构域; TolC 的首个晶体结构处于关闭状态, 因为

通道末端的  $\alpha$ -螺旋卷曲会逐渐变细, 进而关闭整个通道, 即使是离子也不能轻易扩散通过, 这种收缩由通过氢键和盐桥稳定的成对卷曲螺旋向内弯曲形成, 为了允许底物外排, 收缩部分必须被打开<sup>[36]</sup>。Pei 等通过将 TolC 进行突变, 解析出呈现部分打开状态的晶体结构, 让研究者们对 TolC 的开启机制有了新的见解: 膜间质尖端的不稳定性可以扩大 TolC 的孔径, 允许底物穿过通道<sup>[37]</sup>。TolC-Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub><sup>3+</sup>复合物的晶体结构显示, 配体分子结合在入口缩窄处, 入口的显著特征是一个由 6 个天门冬氨酸组成的环, 其中 Asp<sup>371</sup> 和 Asp<sup>374</sup> 残基形成最窄的孔隙; 在结合位点, 配体和每个 TolC 单体的 Asp<sup>374</sup> 残基形成氢键; 当 Asp<sup>374</sup> 被丙氨酸取代后, 配体和 TolC 的高亲和力结合消失, 表明天冬氨酸环有助于配体的高亲和力结合; 由于在整个革兰氏阴性菌的 TolC 家族中, 负电性入口是非常保守的, 因此认为入口收缩处可能是多药外排泵抑制剂的一个靶点<sup>[38]</sup>。虽然 TolC 的晶体结构研究为药物发现提供了必要的信息和指导, 但截至目前尚未发现一个可以在体内阻断 TolC 通道的活性化合物。

## 2 AcrAB-TolC 外排泵的冷冻电镜结构对抑制剂研发的启示

多年来, 关于 AcrAB-TolC 外排泵的组装形式、各组分的化学计量比以及特定组分之间的相互作用均不清楚。基于各组分的 X 射线晶体学研究数据<sup>[13,29,36]</sup>, 研究者们提出了关于 AcrAB-TolC 外排泵组装的不同模型<sup>[31,39-41]</sup>。因为长期以来一直缺乏组装完全的外排泵结构, 针对 AcrAB-TolC 抑制剂的设计主要集中在 AcrB 非对称性晶体结构中发现的底物结合口袋<sup>[19-20,25,28]</sup>。

纯化完全组装的AcrAB-TolC外排泵一直是一个技术挑战,而且通过简单地混合单个组分的重组也未成功。Du等开发了一种纯化完全组装的AcrAB-TolC外排泵的策略,即在组分之间引入柔性的氨基酸序列,从而纯化出完整的AcrAB-TolC进行冷冻电镜单颗粒分析;他们解析出的首个AcrAB-TolC外排泵结构无配体结合,分辨率只有16 Å,该结构表明TolC和AcrB之间并无直接的相互作用,而是通过AcrA在膜间质作为桥梁进行连接;AcrA通过其发夹结构与TolC在膜间质末端的 $\alpha$ -螺旋卷曲相互作用,通过其近膜结构域和 $\beta$ -桶结构域与AcrB相互作用;此外,该结构确定了AcrAB-TolC外排泵各组分的比例,支持AcrB:AcrA:TolC的化学计量比值为3:6:3的猜测<sup>[15]</sup>。

Wang等报道了静息态和运输态的AcrAB-TolC外排泵更高分辨率的冷冻电镜结构,显示了组分之间的具体相互作用,加深了对AcrAB-TolC组装形式的认识:AcrA通过2个构象不同原体(原体I和原体II)的三聚化形成一个六聚体,其中一个短的螺旋-转角-螺旋(helix-turn-helix, HTH)基序与TolC在膜间质末端卷曲螺旋的HTH基序以一种针尖对针尖的方式相互作用;AcrA的硫辛基结构域与TolC和AcrB均不相互作用,其 $\beta$ -桶结构域仅与AcrB的对接结构域相互作用;另一方面,AcrA的近膜结构域与AcrB的对接结构域和输送结构域均有联系;值得注意的是,AcrAB-TolC外排泵不结合配体和结合配体的体外结构揭示了其组装和运行机制,即从关闭状态到打开状态,AcrAB-TolC外排泵沿长轴发生了约10 Å的收缩;在AcrAB-TolC结合MBX3132(一种AcrB抑制剂)的冷冻电镜结构中,抑制剂结合在疏水陷阱,AcrB三聚体主要被困在对称的TTT构象,表明MBX3132饱和地结合了所有位点,阻止AcrB进

行3种状态的循环,从而有效地抑制了外排泵功能的发挥,因此,通过靶向AcrAB-TolC外排泵的组装或者构象转换有可能会抑制药物的转位,冷冻电镜结构很好地解析出AcrAB-TolC各组分之间的相互作用界面<sup>[16]</sup>,这些界面很可能是外排泵抑制剂开发的重要靶点。McNeil等最近根据AcrAB-TolC外排泵近原子分辨率的冷冻电镜结构,绘制了AcrA与AcrB结合所需的氨基酸残基,确定了形成离散“结合盒”的关键残基<sup>[42]</sup>。这些结合位点加深了对AcrAB-TolC外排泵组分间关系的进一步理解,以及对抑制剂靶向性的准确判断。

### 3 AcrAB-TolC 外排泵的原位结构对抑制剂研发的启示

由于AcrAB-TolC外排泵横跨细菌胞外被膜,具有高度的动态性,而且各组分之间的亲和力较弱,在体外捕获其中间状态尤其具有挑战性。虽然有一些生化方面的证据<sup>[43-45]</sup>,但仍不清楚AcrAB-TolC外排泵是如何在活细胞内组装的。2019年,Shi等首次报道了大肠埃希菌AcrAB-TolC外排泵分辨率为15 Å的原位结构,揭示了革兰氏阴性菌三联外排泵的组装机制<sup>[46]</sup>。通过在大肠埃希菌BL21(DE3)细胞中过表达AcrA、AcrB和TolC,在胞外被膜实现了AcrAB-TolC外排泵的可视化;完全组装的外排泵结构清楚地显示出活细胞中AcrB:AcrA:TolC的化学计量比值为3:6:3,与之前发表的冷冻电镜结构一致<sup>[15-16]</sup>。AcrAB-TolC外排泵在嘌呤霉素存在时处于关闭状态,在MBX3132存在时处于打开状态;最为重要的是,通过对外排泵上部进行分类分析发现了中间体AcrAB亚复合物的存在,该亚复合体的原位结构显示,AcrA与AcrB的比值与完全组装的外排泵相同,然而亚

复合物中AcrA的内部不同于完全组装外排泵的内部,其AcrA发夹结构域未形成完整的环结构<sup>[16]</sup>。虽然有生化证据表明AcrB与TolC存在不依赖于AcrA的直接相互作用,而且AcrA在AcrB不存在的情况下与TolC结合<sup>[45]</sup>,但通过原位结构研究,只观察到AcrAB亚复合物存在于细胞内。

得益于冷冻断层成像技术能够将蛋白质复合物与其周围环境之间的相互作用可视化,Shi等<sup>[46]</sup>解析出的AcrAB-TolC外排泵及其中间体的原位结构显示,TolC的螺旋线圈和AcrA的 $\alpha$ 发夹环均与肽聚糖(peptidoglycan, PG)层接触(图1)。曾有文章提出TolC可能通过其赤道结构域与PG相互作用<sup>[47]</sup>,而AcrA与PG之间的相互作用从未被报道过。Shi等通过体内化学交联结合串联质谱分析验证了从原位结构中发现的AcrA与PG之间的相互作用,AcrA与PG的潜在结合位点如图2所示,这些相互作用的残基分布在AcrA的 $\alpha$ 发夹结构域和硫辛基结构域<sup>[46]</sup>。Shi等提出PG层可以作为锚定位点来维持AcrAB亚复合物的稳定性,从而促进TolC的招募,然而通过干扰AcrA与PG或AcrB之间的相互作用,可能会阻断组装过程,进而破坏三联外排泵的功能<sup>[46]</sup>。

Chen等解析出大肠埃希菌AcrAB-TolC外排泵在MBX3132处理之后亚纳米分辨率(7 Å)的原位结构,展示了该三联复合物嵌在胞外被膜上的详细情况<sup>[48]</sup>。该结构具有足够的分辨率来观察外排泵与内外膜之间亚纳米水平的相互作用信息,揭示出用于精确对接高分辨率结构模型的二级结构元素;TolC的 $\beta$ 桶结构顶部的环被埋在多糖层中,TolC和AcrA上部的螺旋与体外获得的外排泵结构匹配良好,但在原位结构中发现AcrA的近膜结构域整体发生了逆时针8°的旋转(从胞外向胞内观察),可能是由于在体内

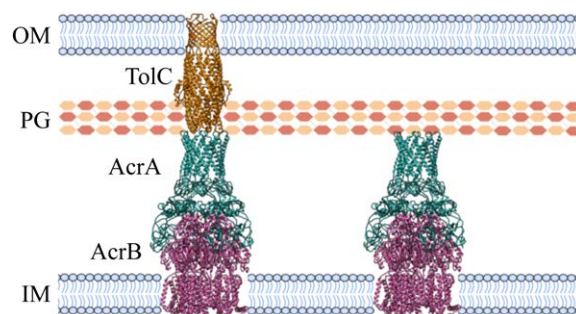


图1 在细菌胞外被膜上完全组装的AcrAB-TolC外排泵(PDB: 5V5S)<sup>[16]</sup>和AcrAB亚复合物AcrAB亚复合物的伪原子模型是通过将5V5S中的TolC隐藏起来显示的。OM: 外膜; IM: 内膜; PG: 肽聚糖

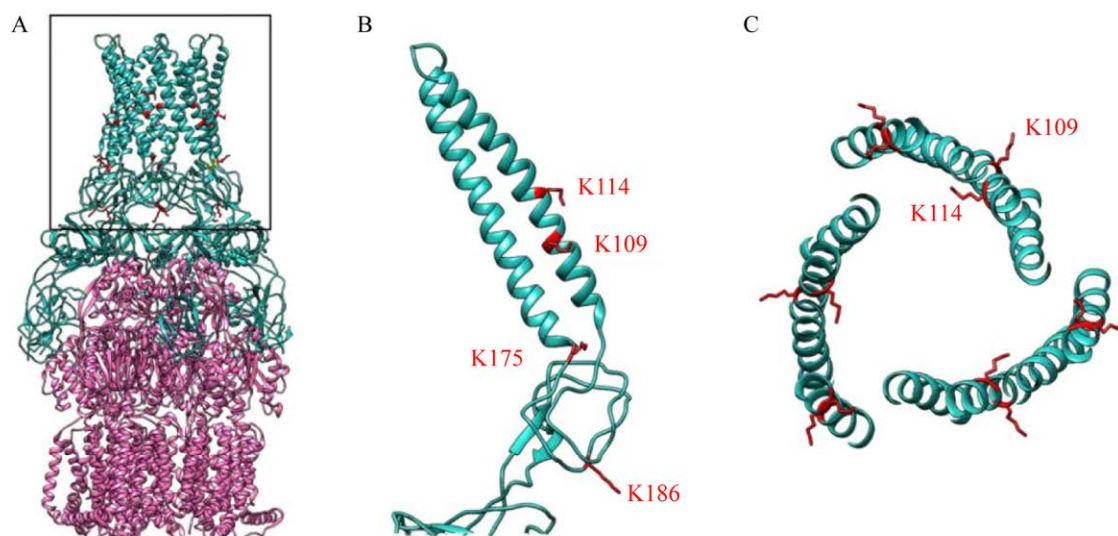
Figure 1 The fully assembled AcrAB-TolC efflux pump (PDB: 5V5S)<sup>[16]</sup> and the AcrAB subcomplex in the bacteria cell envelope. The pseudoatomic model of the AcrAB subcomplex is shown by hiding the TolC in 5V5S. OM: Outer membrane; IM: Inner membrane; PG: Peptidoglycan.

与内膜的相互作用;值得注意的是,AcrA的末端首次被观察到,而且6个AcrA末端与AcrB和内膜相互作用时呈现出2种不同的构象;与体外模型相比,AcrA在原位结构中AcrB有着更为广泛的相互作用,尤其是AcrA原体II末端区域和AcrB的PC2亚区相互作用<sup>[48]</sup>。通过高分辨率原位结构观察到AcrA和AcrB之间新的相互作用,可能为未来靶向治疗和外排泵抑制剂的开发指明了新的方向。

## 4 前景展望

随着抗生素使用的日渐增多,细菌多重耐药已成为全球公共卫生危机<sup>[49]</sup>。RND外排泵是大多数革兰氏阴性菌产生多重耐药性的主要因素之一,开发这类外排泵的抑制剂非常具有前景。通过对外排泵结构的深入研究,可以揭示各组分间关键的相互作用信息、重要的药物结





**图2** AcrAB亚复合物的体内交联结合串联质谱分析 A: 通过体内交联结合串联质谱分析发现AcrAB亚复合物中的AcrA与PG接触, AcrA与PG相互作用的潜在残基用红色显示(K109、K114、K175和K186)。AcrAB亚复合物的伪原子模型是通过将AcrAB-TolC外排泵冷冻电镜结构(PDB: 5V5S)<sup>[16]</sup>的TolC隐藏起来显示的, 方框内区域在右侧被放大显示; B: 一个AcrA原体的侧视图; C: 6个AcrA原体的俯视图

Figure 2 *In vivo* crosslinking combined with LC/MS-MS analysis in AcrAB subcomplex. A: The contact of PG with AcrA in AcrAB subcomplex revealed by *in vivo* crosslinking combined with LC/MS-MS analysis. The potential residues interacting with PG in AcrA is colored red (K109, K114, K175, and K186). The pseudoatomic model of the AcrAB subcomplex is shown by hiding the TolC in the cryo-EM structure of AcrAB-TolC efflux pump (PDB: 5V5S)<sup>[16]</sup>. Zoom in views of the boxed region are shown on the right; B: The side view of one AcrA protomer; C: The top view of the six AcrA protomers.

合位点及底物外排机制, 为抑制剂的设计提供依据。例如, 吡喃吡啉衍生物MBX2319、MBX2931、MBX3132和MBX3135都是基于晶体结构信息开发出来的AcrB抑制剂<sup>[25,50]</sup>。随着AcrB与其底物或抑制剂结合的共晶结构不断增加, 将继续为多重耐药性的决定因素提供新的见解, 从而指导新药效基团的设计来阻断药物易位。根据截至目前解析的AcrAB-TolC外排泵结构信息, 远端口袋可能是AcrB的底物或抑制剂的通用结合位点, 这意味着该口袋中的“疏水陷阱”是设计外排泵抑制剂的最佳靶点。AcrA的近膜结构域也是一个很有潜力的靶点, 受限于当前研究技术水平的不足, 相信未来会有大的突破。AcrA和AcrB的作用面及AcrA和PG的

作用面是否可以作为抑制剂的靶点有待进一步深入研究, 目前尚缺少AcrA和AcrB及AcrA和PG在细胞原位上的动态相互作用信息。

高分辨率原位结构可以提供对三联外排泵更全面和更深刻的理解, 因为在原生细胞膜环境中进行结构解析不需要任何化学修饰, 而且外排泵的组分和构象改变都可以被揭示。相比之下, 对于X射线结晶学和冷冻电镜单颗粒分析, 纯化膜蛋白需要付出巨大的努力, 而且所获得的结构不一定能代表其天然功能状态。截至目前, 在正常大小的大肠埃希菌细胞中进行尝试, 解析出来的三联外排泵原位结构的最高分辨率为7 Å, 成功地揭示了外排泵的各组分之间尤其是和膜组分相互作用的细节<sup>[48]</sup>。如果



在由大肠埃希菌改造成的体积更小的迷你细胞中过表达三联外排泵, 再应用聚焦离子束铣削技术使样品更薄, 则可以获得更高分辨率的原位结构。数据收集方法和断层成像数据处理程序的不断发展和改进也将为高分辨率原位结构的获取提供便利。原位结构研究有助于阐明与革兰氏阴性细菌感染相关的人类疾病的分子基础, 促进多药外排泵抑制剂的开发。此外, 高分辨率原位结构的解析为研究 RND 外排泵的计算方法提供了便利。通过采用计算工具对这些结构数据进行分析, 可以根据测算出的外排泵靶向结构域设计新的抑制剂。随着高分辨率三联外排泵原位结构的不断出现, 预计在不久的将来会研发出有效的抑制剂。

## REFERENCES

- [1] Antão EM, Vincze S, Hanke R, Klimmek L, Suchecka K, Lübke-Becker A, Wieler LH. Antibiotic resistance, the 3As and the road ahead[J]. *Gut Pathogens*, 2018, 10: 52
- [2] 王惠, 冯媛, 王崇刚. 主动外排系统 RND 家族最新研究进展[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2020, 20(4): 437-441  
Wang H, Feng Y, Wang CG. Latest research progress in the RND family active efflux systems[J]. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*, 2020, 20(4): 437-441 (in Chinese)
- [3] Spengler G, Kincses A, Gajdács M, Amaral L. New roads leading to old destinations: efflux pumps as targets to reverse multidrug resistance in bacteria[J]. *Molecules*, 2017, 22(3): 468
- [4] Li XZ, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2015, 28(2): 337-418
- [5] Viale P, Giannella M, Tedeschi S, Lewis R. Treatment of MDR-Gram negative infections in the 21st century: a never ending threat for clinicians[J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2015, 24: 30-37
- [6] Blair JMA, Richmond GE, Piddock LJV. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance[J]. *Future Microbiology*, 2014, 9(10): 1165-1177
- [7] Du DJ, Van Veen HW, Murakami S, Pos KM, Luisi BF. Structure, mechanism and cooperation of bacterial multidrug transporters[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2015, 33: 76-91
- [8] Weston N, Sharma P, Ricci V, Piddock LJV. Regulation of the AcrAB-TolC efflux pump in *Enterobacteriaceae*[J]. *Research in Microbiology*, 2018, 169(7/8): 425-431
- [9] Blair JMA, Smith HE, Ricci V, Lawler AJ, Thompson LJ, Piddock LJV. Expression of homologous RND efflux pump genes is dependent upon AcrB expression: implications for efflux and virulence inhibitor design[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2015, 70(2): 424-431
- [10] Piddock LJV. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2006, 19(2): 382-402
- [11] 侯进慧. 大肠杆菌的 AcrAB-TolC 多药外排泵及其调控研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2008, 35(12): 1932-1937  
Hou JH. Progress on *Escherichia coli* AcrAB-TolC multidrug efflux pump and its regulation[J]. *Microbiology*, 2008, 35(12): 1932-1937 (in Chinese)
- [12] Tsukagoshi N, Aono R. Entry into and release of solvents by *Escherichia coli* in an organic-aqueous two-liquid-phase system and substrate specificity of the AcrAB-TolC solvent-extruding pump[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(17): 4803-4810
- [13] Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Yamaguchi A. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB[J]. *Nature*, 2002, 419(6907): 587-593
- [14] Su CC, Li M, Gu RY, Takatsuka Y, McDermott G, Nikaido H, Yu EW. Conformation of the AcrB multidrug efflux pump in mutants of the putative proton relay pathway[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(20): 7290-7296
- [15] Du DJ, Wang Z, James NR, Voss JE, Klimont E, Ohene-Agyei T, Venter H, Chiu W, Luisi BF. Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump[J]. *Nature*, 2014, 509(7501): 512-515
- [16] Wang Z, Fan GZ, Hryc CF, Blaza JN, Serysheva II, Schmid MF, Chiu W, Luisi BF, Du DJ. An allosteric transport mechanism for the AcrAB-TolC multidrug efflux pump[J]. *eLife*, 2017, 6: e24905
- [17] Yu EW, McDermott G, Zgurskaya HI, Nikaido H, Koshland DE Jr. Structural basis of multiple drug-binding capacity of the AcrB multidrug efflux

- pump[J]. *Science*, 2003, 300(5621): 976-980
- [18] Törnroth-Horsefield S, Gourdon P, Horsefield R, Brive L, Yamamoto N, Mori H, Snijder A, Neutze R. Crystal structure of AcrB in complex with a single transmembrane subunit reveals another twist[J]. *Structure*, 2007, 15(12): 1663-1673
- [19] Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Matsumoto T, Yamaguchi A. Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism[J]. *Nature*, 2006, 443(7108): 173-179
- [20] Nakashima R, Sakurai K, Yamasaki S, Nishino K, Yamaguchi A. Structures of the multidrug exporter AcrB reveal a proximal multisite drug-binding pocket[J]. *Nature*, 2011, 480(7378): 565-569
- [21] Eicher T, Cha HJ, Seeger MA, Brandstätter L, El-Delik J, Bohnert JA, Kern WV, Verrey F, Grütter MG, Diederichs K, et al. Transport of drugs by the multidrug transporter AcrB involves an access and a deep binding pocket that are separated by a switch-loop[J]. *PNAS*, 2012, 109(15): 5687-5692
- [22] Oswald C, Tam HK, Pos KM. Transport of lipophilic carboxylates is mediated by transmembrane helix 2 in multidrug transporter AcrB[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 13819
- [23] Tam HK, Foong WE, Oswald C, Herrmann A, Zeng H, Pos KM. Allosteric drug transport mechanism of multidrug transporter AcrB[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 3889
- [24] Nakashima R, Sakurai K, Yamasaki S, Hayashi K, Nagata C, Hoshino K, Onodera Y, Nishino K, Yamaguchi A. Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug exporters[J]. *Nature*, 2013, 500(7460): 102-106
- [25] Sjuts H, Vargiu AV, Kwasny SM, Nguyen ST, Kim HS, Ding XY, Ornik AR, Ruggerone P, Bowlin TL, Nikaido H, et al. Molecular basis for inhibition of AcrB multidrug efflux pump by novel and powerful pyranopyridine derivatives[J]. *PNAS*, 2016, 113(13): 3509-3514
- [26] Wang YH, Alenazy R, Gu XJ, Polyak SW, Zhang PP, Sykes MJ, Zhang N, Venter H, Ma ST. Design and structural optimization of novel 2H-benzo[h]chromene derivatives that target AcrB and reverse bacterial multidrug resistance[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, 213: 113049
- [27] Simsir M, Broutin I, Mus-Veteau I, Cazals F. Studying dynamics without explicit dynamics: a structure-based study of the export mechanism by AcrB[J]. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 2021, 89(3): 259-275
- [28] Zgurskaya HI, Nikaido H. AcrA is a highly asymmetric protein capable of spanning the periplasm[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 285(1): 409-420
- [29] Mikolosko J, Bobyk K, Zgurskaya HI, Ghosh P. Conformational flexibility in the multidrug efflux system protein AcrA[J]. *Structure*, 2006, 14(3): 577-587
- [30] Hazel A, Abdali N, Leus IV, Parks JM, Smith JC, Zgurskaya HI, Gumbart JC. Conformational dynamics of AcrA govern multidrug efflux pump assembly[J]. *ACS Infectious Diseases*, 2019, 5(11): 1926-1935
- [31] Symmons MF, Bokma E, Koronakis E, Hughes C, Koronakis V. The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump[J]. *PNAS*, 2009, 106(17): 7173-7178
- [32] Blair JMA, Bavro VN, Ricci V, Modi N, Cacciotto P, Kleinekathöfer U, Ruggerone P, Vargiu AV, Baylay AJ, Smith HE, et al. AcrB drug-binding pocket substitution confers clinically relevant resistance and altered substrate specificity[J]. *PNAS*, 2015, 112(11): 3511-3516
- [33] Bohnert JA, Schuster S, Kern WV, Karcz T, Olejarz A, Kaczor A, Handzlik J, Kieć-Kononowicz K. Novel piperazine arylideneimidazolones inhibit the AcrAB-TolC pump in *Escherichia coli* and simultaneously act as fluorescent membrane probes in a combined real-time influx and efflux assay[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016, 60(4): 1974-1983
- [34] Abdali N, Parks JM, Haynes KM, Chaney JL, Green AT, Wolloscheck D, Walker JK, Rybenkov VV, Baudry J, Smith JC, et al. Reviving antibiotics: efflux pump inhibitors that interact with AcrA, a membrane fusion protein of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump[J]. *ACS Infectious Diseases*, 2017, 3(1): 89-98
- [35] Haynes KM, Abdali N, Jhawar V, Zgurskaya HI, Parks JM, Green AT, Baudry J, Rybenkov VV, Smith JC, Walker JK. Identification and structure-activity relationships of novel compounds that potentiate the activities of antibiotics in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, 60(14): 6205-6219
- [36] Koronakis V, Sharff A, Koronakis E, Luisi B, Hughes C. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export[J]. *Nature*, 2000, 405(6789): 914-919
- [37] Pei XY, Hinchliffe P, Symmons MF, Koronakis E,

- Benz R, Hughes C, Koronakis V. Structures of sequential open states in a symmetrical opening transition of the TolC exit duct[J]. PNAS, 2011, 108(5): 2112-2117
- [38] Higgins MK, Eswaran J, Edwards P, Schertler GFX, Hughes C, Koronakis V. Structure of the ligand-blocked periplasmic entrance of the bacterial multidrug efflux protein TolC[J]. Journal of Molecular Biology, 2004, 342(3): 697-702
- [39] Tamura N, Murakami S, Oyama Y, Ishiguro M, Yamaguchi A. Direct interaction of multidrug efflux transporter AcrB and outer membrane channel TolC detected via site-directed disulfide cross-linking[J]. Biochemistry, 2005, 44(33): 11115-11121
- [40] Lobedanz S, Bokma E, Symmons MF, Koronakis E, Hughes C, Koronakis V. A periplasmic coiled-coil interface underlying TolC recruitment and the assembly of bacterial drug efflux pumps[J]. PNAS, 2007, 104(11): 4612-4617
- [41] Schmidt TH, Raunest M, Fischer N, Reith D, Kandt C. Computer simulations suggest direct and stable tip to tip interaction between the outer membrane channel TolC and the isolated docking domain of the multidrug RND efflux transporter AcrB[J]. Biochimica et Biophysica Acta: BBA-Biomembranes, 2016, 1858(7): 1419-1426
- [42] McNeil HE, Alav I, Torres RC, Rossiter AE, Laycock E, Legood S, Kaur I, Davies M, Wand M, Webber MA, et al. Identification of binding residues between periplasmic adapter protein (PAP) and RND efflux pumps explains PAP-pump promiscuity and roles in antimicrobial resistance[J]. PLoS Pathogens, 2019, 15(12): e1008101
- [43] Tikhonova EB, Zgurskaya HI. AcrA, AcrB, and TolC of *Escherichia coli* form a stable intermembrane multidrug efflux complex[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(31): 32116-32124
- [44] Zgurskaya HI, Nikaido H. Cross-linked complex between oligomeric periplasmic lipoprotein AcrA and the inner-membrane-associated multidrug efflux pump AcrB from *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(15): 4264-4267
- [45] Touzé T, Eswaran J, Bokma E, Koronakis E, Hughes C, Koronakis V. Interactions underlying assembly of the *Escherichia coli* AcrAB-TolC multidrug efflux system[J]. Molecular Microbiology, 2004, 53(2): 697-706
- [46] Shi XD, Chen MY, Yu ZL, Bell JM, Wang H, Forrester I, Villarreal H, Jakana J, Du DJ, Luisi BF, et al. *In situ* structure and assembly of the multidrug efflux pump AcrAB-TolC[J]. Nature Communications, 2019, 10: 2635
- [47] Meroueh SO, Bencze KZ, Heseck D, Lee M, Fisher JF, Stemmler TL, Mobashery S. Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan[J]. PNAS, 2006, 103(12): 4404-4409
- [48] Chen MY, Shi XD, Yu ZL, Fan GZ, Serysheva II, Baker ML, Luisi BF, Ludtke SJ, Wang Z. *In situ* structure of the AcrAB-TolC efflux pump at subnanometer resolution[J]. Structure, 2021
- [49] 华炜聪, 邓在春, 张筠, 朱丹萍, 陈众博. AcrAB-TolC 外排泵在多重耐药肠杆菌中的作用研究进展[J]. 中国现代医生, 2021, 59(4): 184-188  
Hua WC, Deng ZC, Zhang Y, Zhu DP, Chen ZB. Research progress of AcrAB-TolC efflux pump in multidrug resistant enterobacteria[J]. China Modern Doctor, 2021, 59(4): 184-188 (in Chinese)
- [50] Vargiu AV, Ruggerone P, Opperman TJ, Nguyen ST, Nikaido H. Molecular mechanism of MBX2319 inhibition of *Escherichia coli* AcrB multidrug efflux pump and comparison with other inhibitors[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2014, 58(10): 6224-6234