

Received: 2008.08.11
Accepted: 2009.03.23
Published: 2009.04.09

Czynne usuwanie leku z komórki jako jeden z mechanizmów oporności bakterii na środki przeciwdrobnoustrojowe i metody jego zwalczania*

Active efflux as the multidrug resistance mechanism

Anna Wasążnik, Mariusz Grinholc, Krzysztof P. Bielawski

Pracownia Diagnostyki Molekularnej, Katedra Biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku

Streszczenie

Pompy MDR stanowią powszechny mechanizm oporności wielu gatunków bakterii, polegający na transporcie poza komórkę m.in. leków, toksyn i środków dezynfekcyjnych i antyseptycznych. Pompy, których swoistość substratowa jest duża, przyczyniają się do selekcji wieloopornych szczepów różnych gatunków bakterii, do których zalicza się przede wszystkim: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* oraz *Salmonella enterica* serowar *Typhimurium*. Ze względu na strukturę i funkcję dzieli się te systemy transportowe na 5 klas: MFS (major facilitator superfamily), SMR (small multidrug resistance family), MATE (multidrug and toxic compound extrusion family), ABC (ATP binding cassette superfamily) i RND (resistance nodulation cell division family). Transportowi substratu towarzyszy transport jonów wodorowych albo wykorzystywana jest energia z hydrolizy ATP. Transport substancji jest efektywnie regulowany przez białka regulatorowe występujące lokalnie, np. białko BmrR *Bacillus subtilis* oraz przez białka globalnej ścieżki regulatorowej całej komórki. Dogłębne poznanie mechanizmu regulacji, wiązania substratu i samego transportu pozwala na projektowanie nowych leków, które mogą działać np. jako inhibitory tych pomp. Poszukuje się również alternatywnych terapii, takich jak terapia fotodynamiczna, które wykorzystując inhibitory pomp efflux mogą stanowić skuteczną metodę eradykacji tych wielolekoopornych patogenów.

Słowa kluczowe:

efflux • inhibitory pomp efflux • wielolekooporność

Summary

Active efflux is a common resistance mechanism in a wide range of bacterial pathogens. It is responsible for the transport of such toxic compounds as drugs, toxins, and detergents. Pumps with broad substrate profiles promote the emergence of multidrug-resistant bacterial pathogens that are a particular threat to contemporary medicine, such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Salomonella enterica* sv *Typhimurium*. One can distinguish five major class of transport systems on the basis of their structure and function: MFS (major facilitator superfamily), SMR (small multidrug-resistance family), MATE (multidrug and toxic compound extrusion family), ABC (ATP binding cassette superfamily), and RND (resistance nodulation cell division family). Substrate transport may include hydrogen proton exchange or energy generated via ATP hydrolysis. The transport is effectively regulated by local regulatory proteins, such as BmrR from *Bacillus subtilis*, or by the global bacterial regulatory system. Investigations

* Praca naukowa współfinansowana przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach projektu „InnoDoktorant – stypendia dla doktorantów, I edycja”.

into efflux pumps and their substrate profiles and regulatory mechanisms have led to the discovery of new therapeutics and pump inhibitors that could potentially become alternative and effective antimicrobial drugs. Additionally, some alternative therapies such as photodynamic inactivation could be more effective if the synergistic action of efflux pump inhibitors are used. Thus research into efflux transport systems seems to be an important element of contemporary medicine.

Key words: efflux • efflux pump inhibitors • multidrug resistance

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=882645>

Word count: 4947

Tables: 2

Figures: –

References: 78

Adres autora: mgr Mariusz Grinholc, Pracownia Diagnostyki Molekularnej, Katedra Biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk; e-mail: grinholc@biotech.ug.gda.pl

Wykaz skrótów: **ABC** – białka transportowe zawierające kasetę wiążącą ATP (ATP binding cassette superfamily); **EPI** – inhibitory pomp efflux (efflux pump inhibitors); **Mar** – wielooporność antybiotykowa (multi antibiotic resistance); **MATE** – rodzina transporterów multidrug and toxic compounds extrusion; **MFS** – superrodzina transporterów błonowych major facilitator; **MRSA** – metycylinooporne szczepy *Staphylococcus aureus* (methicillin resistance *Staphylococcus aureus*); **MSSA** – metycylinowrażliwe szczepy *Staphylococcus aureus* (methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*); **PBP** – białko wiążące penicyliny (penicillin binding protein); **RND** – rodzina transporterów resistance nodulation cell division; **SMR** – rodzina transporterów small multidrug resistance.

1. WPROWADZENIE

Od wynalezienia penicyliny antybiotyki stały się nieodłącznym elementem medycyny. W latach 60 XX wieku wydawało się, że ostatecznie człowiek wygrał bitwę z epidemiami takich chorób, jak cholera czy kiła. Jednak szybko okazało się, że wraz ze wzrostem stosowania nowych leków, rośnie szybkość uodporniania się na nie bakterii i to one są naszym nowym, silniejszym niż kiedyś wrogiem. Niestety proces nabywania oporności przez bakterie jest nieunikniony. Skalę tego problemu możemy uświadomić sobie wpisując w wyszukiwarce PubMed hasło „antibiotic resistance”, gdzie około 100 000 publikacji na ten temat pokazuje ogrom tego zjawiska i jego istotne znaczenie. Naukowcy notują przypadki oporności bakterii po miesiącach lub latach od wprowadzenia nowego antybiotyku. Dlatego jedyną szansą na pokonanie opornych bakterii jest poszukiwanie nowych, skutecznych leków lub alternatywnych w stosunku do antybiotykoterapii. Szerokie stosowanie antybiotyków przyczyniło się do powstania szczepów metycylinoopornych *Staphylococcus aureus* (MRSA), wielolekoopornych pałeczek *Pseudomonas* czy wankomycynoopornych szczepów enterokoków, które stanowią poważny problem zakażeń szpitalnych. Obecność jednego mechanizmu oporności nie zapewnia bakteriom pewnego przetrwania, dlatego powszechne jest wśród bakterii występowanie jednocześnie kilku różnych mechanizmów oporności na różne grupy antybiotyków [77]. Mówimy wtedy o szczepach wieloopornych, które są dużym zagrożeniem, szczególnie w środowisku szpitalnym [34].

Bakterie przejawiają dwa rodzaje oporności: nabytą lub wrodzoną. Oporność wrodzoną charakteryzuje obecność danego mechanizmu u każdego przedstawiciela swojego gatunku. Na przykład wszystkie mikoplazmy są odporne na antybiotyki β -laktamowe z powodu braku peptydoglikanu jako składnika ściany komórkowej. Innym przykładem jest gatunek *Pseudomonas aeruginosa*, który jest mało wrażliwy na hydrofobowe antybiotyki, m.in. makrolidy. Przyczyną tego zjawiska jest trudność przenikania tych antybiotyków przez osłony komórkowe. Z kolei źródłem nabytej oporności są mutacje w genomie bakteryjnym, tj. mutacje punktowe, delecje, inwersje, insercje itp. W przypadku pomp efflux, mutacja w genach białek regulatorowych może doprowadzić do nadekspresji pomp i tym samym do zwiększonej oporności na dany antybiotyk. Elementy odpowiedzialne za oporność nabytą mogą być przekazywane z komórki do komórki przez transfer horyzontalny, czyli poprzez ruchome elementy kodujące, tj. plazmidy, transpozony czy sekwencje insercyjne [50,77]. Transfer horyzontalny pozwala na bardzo szybkie szerzenie się oporności wśród różnych szczepów i gatunków bakterii. Analiza genomu *Salmonella enterica* serowar *Typhi* bardzo dobrze ilustruje ewolucję oporności dzięki wielokrotnym insercjom ruchomych elementów genetycznych. Szczep ten ma duży plazmid, który niesie 18 genów zaangażowanych w oporność na wiele różnych antybiotyków oraz metale ciężkie [50].

Mechanizmów oporności jest wiele, ale opierają się one na kilku głównych strategiach. Do najbardziej rozpowszechnionych zaliczamy: wytwarzanie enzymów inaktywują-

Tabela 1. Pompy efflux

Grupa bakterii	Klasa pomp efflux	Składniki pomp	Oporność bakterii
Bakterie Gram-dodatnie	ABC	LmrA	liczne antybiotyki
	MFS	QacA	akryflawina cetrymid chlorheksydyna
	MATE	NorM	aminoglikozydy fluorochinolony
	SMR	QacC	akryflawina cetrymid
Bakterie Gram-ujemne	RND	AcrB AcrA TolC	liczne antybiotyki
	ABC	MacB MacA TolC	makrolidy
	MFS	EmrB EmrA TolC	kwas nalidyksowy nowobiocyna

cych antybiotyki, blokadę docelowych receptorów antybiotyków, zmianę przepuszczalności błony komórkowej oraz mechanizm aktywnego usuwania antybiotyku z komórki (efflux) [12, 23, 58].

1.1. Transport antybiotyku poza komórkę – mechanizm efflux

Niedawno odkrytym mechanizmem oporności wykorzystywanym przez bakterie jest wypompowywanie antybiotyku poza komórkę, czyli mechanizm efflux. Transport antybiotyków opiera się na obecności białek transportowych w błonie komórkowej. Pompy te różnią się budową, liczbą sekwencji transbłonowych, swoistością substratów oraz mechanizmem działania. Dzieli się je na pięć rodzin: MFS, SMR, ABC, MATE oraz RND. U bakterii Gram-ujemnych – ze względu na bardziej złożoną strukturę osłon komórkowych – białka transportowe tworzą potrójną strukturę, złożoną z białka wewnętrznej błony cytoplazmatycznej, białka zewnętrznej błony, tworzące kanał transportowy oraz z białka przestrzeni periplazmatycznej, łączącego oba wcześniejsze białka. Bakterie Gram-dodatnie mają mniej skomplikowaną budowę, dlatego też system transportowy tworzony jest przez pojedyncze białko błonowe [39]. Pompy różnią się również swoistością substratów, mogą transportować jeden określony rodzaj substancji lub wiele różnych rodzin leków. Uważa się, że nadekspresja pomp efflux może być pierwszym krokiem nabycia przez bakterie całkowitej oporności. Naukowcy utrzymują, że im większy genom bakteryjny tym więcej w nim genów kodujących różne rodziny pomp [56]. Wiele bakterii ma w swoim genomie geny kodujące pompy, jednak nie ulegają one ekspresji lub ekspresja ta zachodzi na bardzo niskim poziomie i nie zapewnia odpowiedniego stopnia oporności. Warunek, jaki musi być spełniony do utrzymania wysokiego poziomu oporności dzięki mechanizmowi efflux, to nadekspresja białek transportowych [61]. W komórce bakteryjnej ekspresja systemu efflux jest efek-

tywnie regulowana przez białka regulatorowe należące zarówno do białek działających lokalnie, jak i do ścieżki globalnej regulacji komórkowej. Przykładem takich lokalnych białek regulatorowych jest aktywator transkrypcji BmrR *Bacillus subtilis* oraz białko represorowe QacR *Staphylococcus aureus*. Regulatory lokalne często nie odgrywają dużej roli w regulacji. Głównym mechanizmem kontrolnym w tym przypadku są białka zaangażowane w ścieżkę globalnej regulacji [25]. Mechanizm efflux jest ważnym mechanizmem oporności z punktu widzenia medycyny. Ekspresja tego systemu występuje u wielu bakterii o znaczeniu klinicznym, które stają się coraz większym problemem terapeutycznym. Do takich bakterii zalicza się m.in.: *S. aureus*, *E. coli* czy *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* [56]. Dlatego też poszukiwanie antybiotyków zdolnych do ominięcia tego systemu oporności, jest wielkim wyzwaniem współczesnej medycyny. Źródła leków tego typu upatruje się obecnie wśród związków pochodzenia roślinnego, które wykazują zdolność blokowania pomp efflux. Również duże nadzieje pokłada się w terapii fotodynamicznej, która wykorzystując inhibitory pomp efflux może być skuteczną metodą w walce z tymi wielolekoopornymi patogenami [21,22,35].

2. RODZAJE POMP TRANSPORTOWYCH

Struktura transporterów białkowych nie jest całkowicie poznana. Przyczyną trudności w analizie ich budowy jest przede wszystkim znaczna hydrofobowość tych białek. Ekspresja białek błonowych zachodzi na bardzo niskim poziomie w porównaniu z innymi białkami. Bakteryjne systemy transportowe zalicza się do 5 klas, które scharakteryzowano poniżej (tabela 1) [55,57,75].

2.1. Nadrodzina transporterów błonowych MFS

MFS to duża i różnorodna rodzina transporterów, do której zaliczamy ponad tysiąc różnych białek transportują-

cych, występujących zarówno u bakterii jak i u ssaków [62]. Białka transportowe z tej rodziny tworzą symporty i antyporty, wykorzystujące gradient jonów wodorowych lub sodowych. Pompy te transportują nie tylko antybiotyki, ale również inne związki, m.in.: cukry czy substraty cyklu Krebsa [54]. Większość białek MFS jest zbudowana z 400–600 reszt aminokwasowych i ma 12, 14 lub 24 transmembranowych α -helis [62]. Pompy tego rodzaju występują głównie u bakterii Gram-dodatnich, np. pompa QacA czy NorA u *S. aureus* [54].

2.2. Rodzina transporterów SMR

Białka należące do rodziny SMR są małymi białkami o długości 100–120 reszt aminokwasowych [63], które tworzą 8-transmembranowy dimer lub oligomer [73]. Obecność tego rodzaju pomp potwierdzono zarówno w królestwie archebakterii jak i eubakterii [63]. Pompy SMR są odpowiedzialne za warunkowanie oporności na związki aromatyczne o ładunku dodatnim [73]. Przedstawicielem tej rodziny jest białko EmrE, które zostało zidentyfikowane u *E. coli* [63]. Badania białka EmrE z zastosowaniem kriomikroskopii wykazują, że helisy tworzące pompę są ułożone w asymetryczny sposób. Doświadczenia te potwierdzają również istnienie ważnych reszt aminokwasowych, które biorą udział w rozpoznaniu substratu i jego transporcie [73].

2.3. Rodzina transporterów MATE

Pompy z rodzaju MATE wykorzystują antyport jonów wodorowych lub sodowych do transportu takich substratów jak leki, toksyny i ksenobiotyki. Białka wchodzące w skład tej rodziny pomp są zbudowane z 400–700 aminokwasów, które tworzą 12 transmembranowych helis. Wszystkie białka z rodziny MATE wykazują prawie 40% identyczność sekwencji aminokwasowej. Analiza sekwencji kodującej pompy MATE wskazuje, że wszystkie geny kodujące jej białka wywodzą się od jednego genu, który uległ późniejszej duplikacji. W przypadku bakterii zidentyfikowano 17 różnych białek tworzących pompy MATE u 11 gatunków, które są odpowiedzialne za ich lekooporność. Wśród niedawno zidentyfikowanych systemów transportowych jest białko MepA *S. aureus*, którego nadekspresja prowadzi do oporności na tycyliny, wykazujące właściwości bakteriobójcze wobec szczepów MRSA oraz szczepów wankomycynoopornych *S. aureus* [52].

2.4. Białka transportowe zawierające kasetę wiążącą ATP

Pompy ABC wykorzystują do transportu energię pochodzącą z hydrolizy ATP i zaangażowane są w transport takich substancji jak: cukry, aminokwasy, leki, białka, peptydy oraz jony metali. Pompy typu ABC tworzą homodimery, a każdy monomer jest zbudowany z 2 domen: wysoce hydrofobowej oraz hydrofilowej wiążącej nukleotydy (nukleotyde binding domain – NBD). W skład domeny hydrofobowej wchodzi 6 transmembranowych helis. Domena ta jest odpowiedzialna za wiązanie substratu i jego translokację, natomiast NBD znajduje się po stronie wewnętrznej błony cytoplazmatycznej i odpowiada za pozyskiwanie energii do aktywnego transportu przez hydrolizę ATP. Mimo dużej różnorodności rodziny pomp ABC, sekwencje

kodujące niektóre jej elementy są wysoce konserwowane. Przykładem takich sekwencji są motywy Walker A i B znajdujące się w domenie wiążącej nukleotydy. Transportery z tej rodziny występują zarówno u bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, np. MsbA u *E. coli* oraz LmrA z *Lactococcus lactis* [13].

2.5. Rodzina transporterów RND

Dwa systemy pomp MexAB-OprM *P. aeruginosa* oraz AcrAB-TolC *E. coli* najlepiej zbadano pod względem budowy. Obie pompy należą do rodziny RND i tworzą trójskładnikowy system, który występuje u bakterii Gram-ujemnych. Pompy RND wykorzystują gradient protonów w poprzek błony komórkowej w celu wyzwolenia ruchu cząstek substratu [56]. W przypadku pompy AcrAB-OprM kompleks AcrAB łączy się z białkiem TolC z zewnętrznej błony, tworząc w ten sposób bezpośrednio połączenie między cytoplazmą a przestrzenią zewnątrzkomórkową. AcrB jest trimerem mającym 36 α -helis (12 helis na każdej monomer). Bierze on udział w translokacji jonów wodorowych oraz w wiązaniu substratu. Białko jest zakotwiczone w wewnętrznej błonie cytoplazmatycznej i otwiera się do przestrzeni periplazmatycznej. Białko TolC tworzy homotrimer, który formuje kanał przebijający zewnętrzną błonę oraz przestrzeń periplazmatyczną. Układ zwiniętych helis na końcu kanału prawdopodobnie go zamyka i otwiera. Białka AcrB i TolC połączone są białkiem AcrA tworząc kanał translokacyjny. Strukturalnym i funkcjonalnym homologiem AcrA jest MexA *P. aeruginosa*, którego struktura została zbadana krystalograficznie. MexA ma postać wydłużonej struktury i 3 subdomeny. Wyizolowane białko ma postać monomeru, jednak bardzo prawdopodobne jest tworzenie oligomeru białkowego indukowane kontaktem z pozostałymi białkami pompy. Najprawdopodobniej białka AcrA/MexA odgrywają najważniejszą rolę w procesie składania i stabilizacji trójskładnikowego systemu pompy, gdyż udowodniono, że AcrB i TolC nie mogą oddziaływać ze sobą bezpośrednio [17].

3. SUBSTRATY POMP EFFLUX ORAZ MECHANIZM ICH TRANSPORTU POPRZEC BŁONĘ KOMÓRKOWĄ

3.1. Substraty pomp efflux

Mimo że substraty pomp mają różne struktury chemiczne, to mają też wiele cech wspólnych. Przeważnie są to związki o wysokiej hydrofobowości, ładunku dodatnim lub neutralnym. Dzięki zastosowaniu krystalografii udowodniono, że w wiązaniu substratu biorą udział wiązania van der Waalsa oraz oddziaływania elektrostatyczne [74]. W przypadku pomp z rodziny RND, w białku odpowiedzialnym za wiązanie substratu zidentyfikowano wysoko-konserwowane reszty aminokwasowe o ujemnym ładunku np. kwas glutaminowy (Glu), które znajdują się w miejscu wiążącym substrat. Może to wyjaśniać, dlaczego większość substratów pomp ma ładunek dodatni. Substytucja Glu na kwas asparaginowy (Asp) w transmembranowej domenie białka Smr (staphylococcal multidrug resistance) *P. aeruginosa* skutkowałą powstaniem mutanta zdolnego do wiązania substratu [24]. Natomiast podstawienie reszty Glu aminokwasem o dodatnim ładunku w rejonie transmembranowym białka MdfA *E. coli*, uniemożliwiło wiązanie antybiotyku, co wskazuje na bezpośredni udział

tej reszty aminokwasowej w transporcie transbłonowym np. w wymianie protonów z substratem [16].

3.2. Transport zależny i niezależny od hydrolizy ATP

Aktywność pomp z rodziny SMR, RND, MATE, MFS jest minimalizowana przez traktowanie bakterii substancjami zaburzającymi transport jonów wodorowych w poprzek błony komórkowej, co potwierdza, że pompy te wykorzystują jony wodorowe do transportu wydalonej substancji [11]. Zamiast jonów wodorowych są wykorzystywane również inne jednododatnie jony, takie jak Na^+ (np. aktywność pomp z rodziny MATE). Jednak nie jest to regułą. Istnieją również pompy napędzane dzięki hydrolizie ATP. Wszystkie znane pompy korzystające z energii skumulowanej w ATP wchodzą w skład rodziny pomp ABC [18].

3.3. Mechanizm transportu

Jak już wiadomo większość substratów pomp ma naturę silnie hydrofobową, co sugeruje, iż miejsce wiązania substratu musi wykazywać silną lipofilność. Dlatego też zaproponowano mechanizm transportu substratu z błony lipidowej, a nie z przestrzeni cytoplazmatycznej o charakterze hydrofilowym. Ulokowanie lipofilowego miejsca wiązania w środowisku hydrofobowym błony lipidowej zapewnia efektywne wiązanie substratu [8, 51]. Przekonywającym dowodem o transporcie z błony lipidowej jest badanie pomp z użyciem związku fluorescencyjnego, jakim jest TMA-DPH (trimethylammonion-diphenyl-hexatriene), który silnie fluoryzuje w środowisku hydrofobowym błony lipidowej, a jednocześnie nie fluoryzuje w środowisku hydrofilowym cytoplazmy. Mechanizm transportu pompy MexAB-OprM *P. aeruginosa* z zastosowaniem TMA-DPH wykazuje dwa etapy transportu: krótki transport międzybłonowy z błony wewnętrznej do zewnętrznej, a następnie szybkie rozdzielenie się substancji w zewnętrznej błonie. Doświadczenie wskazuje rolę MexB i/lub MexA w rozpoznaniu i związaniu substratu w wewnętrznej błonie komórkowej, natomiast za uwolnienie substratu poza komórkę odpowiada białko zewnętrznej błony komórkowej OprM [51]. Mimo innej struktury osłon komórkowych u bakterii Gram-dodatnich, idea transportu jest podobna. Badania na *Lactococcus lactis* wskazują, że pompa wiąże substraty w wewnętrznej warstwie błony komórkowej, a następnie transportuje je do części zewnętrznej błony komórkowej oraz poza komórkę [8]. Istnieją też przynajmniej dwa modele dotyczące uwolnienia substratu przez białko transportowe. Zaproponowano mechanizm działania pompy podobny do białka enzymatycznego przenoszącego fosfolipidy, gdzie substrat transportowany do zewnętrznej części dwuwarstwy lipidowej ulega dyfuzji do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Drugi model nazywany „molekularnym odkurzaczem” zakłada bezpośredni, aktywny transport substratu poza komórkę [27].

4. CHARAKTERYSTYKA POMP EFFLUX WŚRÓD BAKTERII O ZNACZENIU KLINICZNYM

4.1. Bakterie Gram-ujemne

Bakterie Gram-ujemne mają wrodzoną oporność na niektóre grupy antybiotyków. Początkowo jedynym wyjaśnieniem tej sytuacji była bariera przepuszczalności osłon ko-

mórkowych. Udowodniono jednak, że ten mechanizm nie jest wystarczający do zachowania dużej oporności. Dotąd odkryto już wiele współdziałających ze sobą systemów efflux, które zapewniają oporność bakterii Gram-ujemnych na różne grupy antybiotyków [39].

4.1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Różne szczepy gatunku *Pseudomonas aeruginosa* mogą być odporne na wiele różnych grup antybiotyków. Do niedawna uważano, że oporność ta wynika ze słabej przepuszczalności osłon komórkowych. Dopiero Srikumar i wsp. [38] udowodnili, że za ten stan odpowiada mechanizm efflux, a dokładnie występująca w dzikim szczepie pompa MexAB-OprM [24]. *P. aeruginosa* jest zdolna do usuwania na zewnątrz wiele substancji m.in. tetracyklin, makrolidów, sulfonamidów, chloramfenikolu, fluorochinolonów i β -laktamów. Pompy MexAB-OprM mają największą swoistość substratów spośród poznanych pomp występujących u *P. aeruginosa* [40]. Poza wymienionym już rodzajem pomp, *P. aeruginosa* ma jeszcze inne pompy z rodziny RND: MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM. W odróżnieniu od MexAB-OprM, pompa MexCD-OprJ nie występuje w dzikim szczepie *P. aeruginosa*, a modyfikacja operonu *mexCD-oprJ* nie zmienia drastycznie wrażliwości bakterii na antybiotyki. Nadekspresja tego operonu w mutantach *nfxB* prowadzi do znacznego wzrostu oporności względem antybiotyków chinolonowych, tetracyklin i cefalosporyn [59]. Ekspresja następnego systemu transportowego *mexEF-oprN* również nie występuje w dzikim szczepie *P. aeruginosa*, ale zachodzi wydajnie w mutantach *nfxC*, które przejawiają dużą oporność na chloramfenikol oraz antybiotyki chinolonowe [33]. Z kolei rolą pompy MexXY jest transport antybiotyków aminoglikozydowych [65]. Konstytutywna ekspresja pompy MexAB-OprM oraz ekspresja MexXY-OprM przyczynia się do wielooporności *P. aeruginosa*, natomiast ekspresja dwóch pozostałych pomp nie ma większego znaczenia w lekooporności tej bakterii. Zauważono, że ekspresja pozostałych pomp RND zależy od ekspresji głównego systemu, czyli MexAB-OprM. W niektórych szczepach *P. aeruginosa* zmniejszonej ekspresji MexAB-OprM towarzyszył wzrost ekspresji pozostałych systemów np. MexCD-OprJ. Całkowitej utraty aktywności MexAB-OprM nie można jednak zrekomensować nadekspresją pozostałych pomp. Nadekspresja MexAB-OprM również korelowała ze zmniejszoną ekspresją MexEF-OprM, co potwierdza istnienie systemu kontrolującego zmiany w ekspresji tych białek transportowych [37,66].

4.1.2. *Escherichia coli*

W badaniach nad *E. coli* stwierdzono, że również ten gatunek Gram-ujemnej bakterii ma system transportowy efflux [48]. Badanie genomu *E. coli* ujawniło obecność przynajmniej 37 różnych pomp efflux: 7 ABC, 19 MFS, 1 MATE, 5 SMR, 7 RND [49]. Mimo tak dużej liczby różnych pomp, głównym kompleksem transportowym biorącym udział w transporcie leków jest AcrAB-TolC, który wykazuje bardzo dużą homologię z MexAB-OprM *P. aeruginosa* [17]. Pompy *E. coli* transportują takie substraty, jak chloramfenikol, niektóre β -laktamy, fluorochinolony, tetracykliny, SDS, detergenty czy bromek etydy. Niedawno odkryto u *E. coli* obecność innych pomp, takich jak AcrEF, AcrD,

YhiUV i MdtABC, które również biorą udział w transporcie substancji antybakteryjnych. Delecja genów *acrEF*, *yhiUV* oraz *mdtABCD* nie wpływa znacząco na wrażliwość na antybiotyki dzikiego szczepu *E. coli*, co może sugerować, że ekspresja tych pomp w dzikim szczepie nie zachodzi na wysokim poziomie [49]. Inny kodowany przez chromosom *E. coli* transporter MdfA z rodziny MFS odpowiada głównie za oporność na chloramfenikol, chociaż antybiotyk ten jest również inaktywowany w wyniku modyfikacji przez swoistą acetylotransferazę [6].

4.1.3. *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*

W genomie *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* znajdują się białka transportowe: AcrA, AcrB (które wykazują bardzo dużą homologię do białek AcrA i AcrB u *E. coli*) oraz AcrD i Arf [48]. Okazuje się, że od białka AcrB zależy transport antybiotyków chinolonowych, tetracyklin i chloramfenikolu, co zbadano na szczepach z delecją genu kodującego to białko [5]. Zaobserwowano również, że nadekspresja systemu AcrAB-TolC prowadzi do wielooporności bakterii z gatunku *Salmonella*. Delecja genów *acrD* i *acrF* miała mały wpływ na poziom wrażliwości na antybiotyki *Salmonella typhimurium*, jednak co ciekawe, delecja tych genów warunkowała nadekspresję genu *acrB*. Do nadekspresji *acrD* prowadzi delecja *acrB* lub *acrF*. Natomiast podwójna delecja *acrB* i *acrF* nie zmieniała wrażliwości w porównaniu z pojedynczą delecją *acrB*. Mechanizm ten wskazuje na możliwość rekompensaty utraty genu *acrB* za pomocą *acrF/acrD*, ale również potwierdza, że wiodącą rolę odgrywa tu system AcrAB-TolC [15]. *Salmonella* i *E. coli* należą do tej samej rodziny *Enterobacteriaceae* i oba gatunki bakterii mają te same systemy transportowe np. EmrAB, MdfA i MdsAB, natomiast interesujące jest to, że ich swoistość substratowa nie pokrywa się całkowicie [47].

4.2. Bakterie Gram-dodatnie

Mechanizmy oporności u bakterii Gram-dodatnich stały się poważnym problemem w związku z szerzeniem się metycylinoopornych szczepów *Staphylococcus aureus* (MRSA), szczepów *S. aureus* o zmniejszonej wrażliwości na wankomycynę (VISA), wankomycynoopornych szczepów enterokoków oraz penicylinoopornych szczepów paciorkowców [4]. U bakterii Gram-dodatnich, w odróżnieniu od bakterii Gram-ujemnych, otoczka bakteryjna ma stosunkowo nieskomplikowaną budowę. Składa się z wielu warstw peptydoglikanu. Z tej przyczyny pompy efflux również są mniej rozbudowane niż u bakterii Gram-ujemnych i składają się z jednego białka w błonie komórkowej.

4.2.1. *Staphylococcus aureus*

Chromosomalnie kodowane białko NorA z rodziny pomp MFS odkryto w 1990 roku [78]. Gen *norA* koduje pompę, która jest odpowiedzialna przede wszystkim za transport związków hydrofilowych, takich jak fluorochinolony. NorA wykazuje strukturalną i funkcjonalną homologię do systemu Bmr *B. subtilis*. W doświadczeniach nad NorA i Bmr okazało się, że obie pompy zapewniają również transport innym substancjom, m.in.: bromkowi etyldyny czy rodami-ny 6G [46]. Interesujące jest jednak to, że mimo podobieństwa NorA do białek transportujących tetracykliny, nie de-

cyduje ono o oporności względem tej grupy antybiotyków [44]. Ekspresja genu *norA* w dzikim szczepie utrzymuje się raczej na niskim poziomie, dlatego też utrzymanie odpowiedniej oporności wymaga nadekspresji białka NorA. Obecność tej pompy potwierdzono zarówno w szczepach MRSA jak i MSSA [14].

W badaniach nad *S. aureus* stwierdzono obecność kilku systemów efflux odpowiedzialnych za oporność antybiotykową. Przykładem są pompy zidentyfikowane w izolatach *S. aureus* z krwi pacjentów, tj.: NorA, NorB, NorC i MepA. Odpowiadają one za warunkowanie oporności na tetracykliny, antybiotyki makrolidowe oraz fluorochinolony [14]. NorB to białko zidentyfikowane stosunkowo niedawno. Zakres substratowy NorB częściowo pokrywa się ze swoistością NorA oraz Bmr, gdyż NorB wykazuje częściową homologię z tymi białkami. Ten system transportowy najprawdopodobniej nie odgrywa dużej roli w oporności *S. aureus*, gdyż w dzikich szczepach jego ekspresja zachodzi na bardzo niskim poziomie [71].

5. REGULACJA AKTYWNOŚCI POMP EFFLUX

Jak każdy proces komórkowy, ekspresja białek transportowych musi podlegać regulacji [26]. Wiadomo, że pompy z rodziny RND i MFS podlegają regulacji już na etapie transkrypcji. W regulacji ekspresji pomp efflux biorą udział lokalne białka regulatorowe oraz białka będące elementem globalnej regulacji komórkowej [39]. Kilka z przeprowadzonych badań wskazuje, że poziom ekspresji wielosubstratowych pomp, takich jak NorA i QacA *S. aureus*, może być regulowany przez substancje, które są substratami tych pomp [25]. Obserwacja ta wskazywałaby, że ekspresja białek transportowych jest kontrolowana przez białka regulatorowe zdolne rozpoznać strukturę substratów pomp [60]. Jedne z pierwszych opisanych mechanizmów lokalnej regulacji bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich dotyczy pomp *B. subtilis*, *S. aureus* i *E. coli*.

5.1. *Bacillus subtilis*

Najlepiej poznanym regulatorem transportu efflux jest białko Brr – aktywator transkrypcji genu *bmr* u *B. subtilis*. Ekspresja pompy efflux może być stymulowana przez działanie rodami-ny 6G i związku TPP. W procesie tym pośredniczy regulatorowe białko BmrR. Cząsteczki rodami-ny łączą się z dimerem BmrR, a następnie kompleks taki o zwiększonym powinowactwie do promotora *bmr* wiąże się z DNA. Efektem jest zwiększenie transkrypcji z tego promotora. Prawdopodobnie celem interakcji między BmrR a *bmr* jest szybka odpowiedź na zwiększone stężenie w środowisku związków toksycznych. Cały czas identyfikuje się nowe związki, które wywierają identyczny jak rodamina 6G i TPP wpływ na ekspresję *bmr* [1].

Genom *B. subtilis* koduje też drugie białko regulatorowe BltR (Bmr like transporter), które odpowiada za regulację ekspresji pompy Blt. Transporter ten wykazuje 51% homologii ze wspomnianym wcześniej Bmr, dlatego też zakres substratowy obu systemów transportowych nakłada się w znacznym stopniu. Mimo tych podobieństw, ekspresja pomp bardzo się różni. W przeciwieństwie do ekspresji Bmr, nie obserwujemy ekspresji Blt w dzikich szczepach *B. subtilis*, a mutacja promotora genu *blt* powoduje nad-

Tabela 2. Wpływ inhibitorów pomp efflux na wrażliwość bakterii na związki przeciwdrobnoustrojowe

Związek p-bakteryjny	Stosunek MIC/MIC + inhibitor [referencje]			
	Rezerpina	MC-207,110	Pochodne chinoliny	NMP
NFX	8 [30]		4 [78]	
CIP	8 [20]			
CHL		128 [42]	16 [9]	8 [7]
ERY		32 [42]		
TET	2 [20]	8 [42]	32 [9]	4 [7]

NFX – norfloksacyna, CIP – ciprofloksacyna, CHL – chloramfenikol, ERY – erytromycyna, TET – tetracyklina, MC-207,110 – Phe-Arg-naftylamido-dihydrochlorek, NMP – N-metylpiryolidon.

ekspresję Blt. Istotne jest to, że ekspresja Blt nie podlega tej samej stymulacji rodaminą 6G, co ekspresja Bmr [2].

5.2. *Staphylococcus aureus*

Ekspresja genu wielosubstratowej pompy QacA *S. aureus* jest regulowana przez białko regulatorowe QacR, które przyłącza się specyficznie do promotora genu *qacA* i w efekcie blokuje jego transkrypcję. Co dziwne, QacR nie reguluje własnej ekspresji, chociaż większość z białek regulatorowych homologicznych do QacR wykazuje zdolność do autoregulacji. Istnieje możliwość zmniejszenia oddziaływania między QacR a *qacR*. Substraty pompy, takie jak glukonian chlorheksydyny i chlorek cetylpirydydy, mogą bezpośrednio oddziaływać z białkiem QacR i blokować jego łączenie z promotorem *qacA*, w rezultacie odblokowując ekspresję genu z tego promotora [25].

S. aureus ma również pompę NorA, która wykazuje duże podobieństwo do pompy Bmr *B. subtilis*. Transport z udziałem NorA jest regulowany przez białka regulatorowe, w tym przypadku NorR. NorR bierze bezpośredni udział w regulacji ekspresji NorA przez wiązanie się do odpowiedniej sekwencji DNA i w ten sposób aktywuje ekspresję genu *norA*. Nadekspresja NorR w dzikim szczepie *S. aureus* prowadzi do nadekspresji NorA. Podobnie jak QacR, NorR nie podlega autoregulacji. Białko NorR jest składnikiem systemu regulacji ekspresji pomp efflux, którego elementy są dopiero zidentyfikowane [71, 72].

5.3. *Escherichia coli*

Białko EmrR bierze udział w regulacji ekspresji pompy EmrAB *E. coli*, jako negatywny regulator. Mutacja w genie kodującym EmrR powoduje zwiększenie oporności względem CCCP (chlorofenylohydraton cyjanku karbonylu), który jest substratem pompy EmrAB. Natomiast nadekspresja *emrR* prowadzi do większej niż normalnie wrażliwości szczepu *E. coli* na ten związek. Geny kodujące transporter oraz gen białka regulatorowego umiejscowione są w jednym operonie, co daje możliwość komórce szybkiej odpowiedzi, gdy w środowisku znajdzie się substancja dla niej toksyczna [41].

Innym systemem transportowym *E. coli* jest AcrAB. Operon genu *acrAB* jest blokowany przez białko AcrR, które wiąże się z promotorem genu *acrAB*. Mutacje w genie kodującym

AcrR przyczyniają się do odblokowania ekspresji genu *acrB* [68]. Prawdopodobne jest również to, że regulacja transkrypcji tego operonu zależy od globalnej ścieżki regulacji komórki [10].

5.4. Globalna regulacja systemu efflux

Poza wymienionymi swoistymi regulatorami, które wpływają na aktywność pomp efflux, regulacja tego systemu może zachodzić dzięki globalnej regulacji. Wielolekooporne szczepy *E. coli* Mar (multiple antibiotic resistance) zawierają geny usytuowane w obrębie operonu *marRAB* oraz *soxRS*, które mogą wpływać na mechanizm oporności. Ekspresja operonu MarRAB jest blokowana przez białko MarR [10]. Gen *marA* koduje aktywator, który jest strukturalnym i funkcjonalnym homologiem dwóch innych globalnych regulatorów *E. coli*: SoxS i Rob. Te trzy białka są transkrypcyjnymi aktywatorami przynajmniej kilkunastu promotorów, które biorą udział w systemie oporności przeciwko wielu antybiotykum [28]. MarA, SoxS oraz Rob są głównymi induktorami systemu AcrAB-TolC z rodziny pomp RND, który jest odpowiedzialny za oporność na antybiotyki i rozpuszczalniki organiczne [76]. Operon *mar* jest szeroko rozpowszechniony wśród bakterii m.in.: *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Citrobacter* i *Enterobacter* [60].

6. METODY ZWALCZANIA POMP EFFLUX U BAKTERII

Inhibicja pompy efflux wydaje się bardzo atrakcyjną metodą walki z opornymi bakteriami wykazującymi ten mechanizm oporności. Poszukiwanie skutecznych inhibitorów pomp przypomina zastosowanie inhibitorów β -laktamaz przeciwko oporności na antybiotyki β -laktamowe [39]. Badania nad efektywnością inhibitorów wykazują dużą wrażliwość bakterii, mających system efflux, na wprowadzone antybiotyki w towarzystwie inhibitorów pomp (tabela 2). Najważniejszą sprawą jest bardzo dokładne poznanie wszystkich mechanizmów oporności danego organizmu, zależności między nimi oraz oddziaływania między inhibitorem a antybiotykiem, przed rozpoczęciem doświadczeń na szerszą skalę [42]. Należy pamiętać, że różne mechanizmy mogą się przeciwstawiać działaniu jednego antybiotyku. Gdy zdeaktywujemy jedną ścieżkę obrony bakterii, mogą uaktywnić się inne, bardziej skuteczne. Na przykład, inhibicja pompy MexAB-OprM *P. aeruginosa* przyczynia się do wzrostu aktywności β -laktamaz [42].

Warto wymienić substancje, które dezaktywują transport substratów, jednak nie są uznawane za ich inhibitory. Chlorofenylohydrazon cyjanku karbonylu (CCCP) i dini-trofenol (DNP) rozprzęgają PMF (proton motive force), blokując transport jakichkolwiek substancji. Wpływają one na funkcję wszystkich pomp (oprócz ABC superfamily), wykorzystujących gradient protonów po obu stronach błony komórkowej jako siłę transportową [56].

Poza inhibitorami pomp istnieją inne możliwości zwalczania opornych patogenów. Szanse takie upatruje się w stworzeniu leków, które skutecznie omijałyby pompy efflux [39] lub opracowaniu innowacyjnych terapii, takich jak terapia fotodynamiczna do zwalczania m.in. metycylinoopornych szczepów *S. aureus* [22, 34].

6.1. Inhibitory pomp efflux

6.1.1. Rezerpina

Zauważone podobieństwo bakteryjnych pomp efflux do pomp eukariotycznych z rodzaju P-glikoproteinowych (PgP), doprowadziło do doświadczeń, w których inhibitory pomp eukariotycznych przebadano względem pomp *B. subtilis*. Pompy bakterii miały podobny profil transportowanych substratów oraz były wrażliwe na te same inhibitory, co pompy eukariotyczne. Badania wskazują, że wielooporność wynikająca z ekspresji pomp efflux u *Bacillus subtilis* zostaje zmniejszona w obecności rezerpiny oraz werapamilu [45]. Rezerpina to alkaloid pochodzenia roślinnego, który oddziałuje bezpośrednio z białkiem Bmr odpowiedzialnym za mechanizm efflux. Substancja ta ma powinowactwo do dwóch reszt fenyloalaniny i reszty waliny białka Bmr. Aminokwasy te odgrywają główną rolę w mechanizmie wiązania rezerpiny. Mimo że oddalone są od siebie i leżą w różnych domenach białka Bmr, to fałdowanie białka powoduje fizyczne ich zbliżenie blisko kieszeni wiążącej rezerpinę. Substytucja fenyloalaniny wpływa istotnie na zmianę powinowactwa białka do rezerpiny, ale również na swoistość wiązania innych substancji [32]. Niestety substancja ta nie może zostać wdrożona do terapii, ponieważ skuteczne stężenie rezerpiny jest toksyczne dla organizmu ludzkiego [39].

6.1.2. Berberyna oraz 5'-metoksyhydno-karpina

Innymi związkami pochodzenia roślinnego, które mogą wpływać na aktywność białka NorA *S. aureus* są berberyna oraz 5'-MHC (5'-methoxyhydno-carpin). Berberyna podobnie jak bromek etydyliny jest związkiem o ładunku dodatnim, który wiąże się z DNA. Słabe działanie antybakteryjne tego związku wynika prawdopodobnie z tego, że sam staje się substratem pomp i jest transportowany poza komórkę. Flawonoid 5'-MHC odkryto w ekstrakcie z liści rośliny z gatunku *Berberis fremontii* oraz *Berberis aetnensis* [43,67]. Związek ten wzmacnia działanie antimikrobiologiczne berberyny, alkaloidu obecnego w tej samej roślinie, poprzez inhibicję mechanizmu efflux z udziałem białka NorA *S. aureus*. Inhibicja zachodzi, mimo że 5'-MHC nie jest typowym substratem pompy NorA. Pompa ta transportuje związki hydrofilowe, o ładunku dodatnim, natomiast 5'-MHC przyjmuje ładunek ujemny lub neutralny [43]. To, że w jednej roślinie znajduje się zarówno substrat i inhibitor efflux świadczy o tym, że rośliny roz-

wiły skuteczną strategię walki przeciwko patogenom roślinnym [36].

6.1.3. Phe-Arg-naftyl-amido dihydrochlorek

Intensywnie poszukuje się inhibitorów swoistych dla pomp z rodziny RND, dlatego że są one najczęściej występującymi pompami w gatunkach Gram-ujemnych bakterii, takich jak *P. aeruginosa*. Jedną z pierwszych substancji o szerokim zastosowaniu był związek MC-207,110 (Phe-Arg-naphthyl-amide dihydrochloride). W badaniach okazało się, że odpowiednie stężenie MC-207,110 powoduje nawet 8-krotny wzrost wrażliwości na lewofloksacynę u *P. aeruginosa* oraz 64-krotny wzrost wrażliwości w szczepie *P. aeruginosa*, który wykazuje nadekspresję pomp efflux [42]. Inhibitor MC-207,110 działa na różne szczepy bakteryjne, również na te z mutacją w genach mex. MC-207,110 wzmacnia działanie antybiotyków, które są substratami pompy MexAB-OprM, ale nie ma wpływu na takie, które takimi substratami nie są. Silna zależność aktywności inhibitora od rodzaju substratu pompy wskazuje, że antybiotyki mogą mieć różne miejsca wiązania na białkach transportowych. W związku z tym inhibicja pompy nie powoduje jej całkowitej dezaktywacji i w dalszym ciągu może ona transportować inne substraty, a nawet sam MC-207,110 może ulec transportowi poza komórkę. Doświadczenia wykazują, że szczepy, które nie mają systemu efflux są również w niewielkim stopniu wrażliwe na obecność MC-207,110. Przyczyną tego może być zwiększenie przepuszczalności osłon komórkowych [42].

Do dziś żaden z testowanych inhibitorów pomp nie został dopuszczony do leczenia ludzi lub zwierząt. Jak dotąd mechanizm oporności, warunkowany przez pompy efflux nie jest wystarczająco poznany. Nadal problemem pozostaje konieczność kompatybilności inhibitorów i antybiotyków [56].

6.1.4. Pochodne chinoliny

Aktywność inhibitorową pochodnych chinoliny potwierdzono w badaniach dotyczących szczepów z gatunku *Enterobacter aerogenes* [3]. Związki te zwiększają wrażliwość bakterii na różne grupy antybiotyków, w tym chloramfenikol i norfloksacynę [9, 19]. Obecnie pochodne chinoliny badane są pod kątem ich wykorzystania do walki z wielolekoopornymi szczepami *E. aerogenes* oraz *Klebsiella pneumoniae* zwłaszcza w przypadku takich antybiotyków jak chloramfenikol, tetracykliny czy norfloksacylna [9].

6.1.5. Arylpiperydyny i arylpiperazyny

Dotychczas kilkanaście związków klasyfikowanych do arylpiperydyn oraz arylpiperazyn przebadano pod kątem ich aktywności inhibitorowej względem pomp efflux. Niektóre pochodne arylpiperydyn, głównie dihalogeny, zwiększają wrażliwość *Escherichia coli* na linezolid zwiększając akumulację tego antybiotyku wewnątrz komórki bakteryjnej [70]. Dodatkowo, związki te blokują aktywność pomp efflux *S. aureus* oraz pompy AcrAB-TolC u *E. coli* [29]. W przypadku arylpiperazyn, wykazano, że związki należące do tej grupy mogą hamować aktywność pomp efflux z rodziny RND. Jednym z najpowszechniej badanych arylpiperazyn jest N-metylpiperolidon (NMP), któ-

ry wskutek aktywności inhibitorowej zwiększa akumulację wewnątrz komórek bakteryjnych, takich związków jak fluorochinolony, barwniki fluorescencyjne czy linezolid [7]. NMP wykazywał skuteczną aktywność wobec pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz *Acinetobacter baumannii* [31,53,64].

6.2. Inne metody

Alternatywną metodą dla inhibitorów pomp jest zaprojektowanie nowych leków zdolnych do ominięcia transporterów błonowych. Do walki przeciwko metycylinoopornym szczepom *S. aureus* wprowadza się zupełnie nowe metody, takie jak terapia fotodynamiczna. Ten rodzaj terapii jest szeroko badany, jako skuteczna alternatywa niszczenia komórek rakowych. Niemniej ostatnio badania nad tą terapią skupiają się również wokół jej zastosowania przeciwko bakteriom, grzybom i wirusom. Terapia fotodynamiczna polega na wprowadzeniu substancji światłoczułej aktywowanej przez światło o odpowiedniej długości fali. W wyniku aktywacji związku chemicznego powstaje tlen singletowy oraz wolne rodniki, które działają cytotoksycznie na komórki [22]. Dobre wyniki otrzymano zwłaszcza z zastosowaniem takich fotoczułaczy jak: hematoporfiryny, pochodne porfiryń [21]. Niedawno okazało się, że istnieją również substancje fotoczułające, które są substratami pomp, takich jak NorA *S. aureus*. Terapia daje znacznie lepsze wyniki, gdy szczepy bakterii są preinkubowane z inhibitorami pomp, takimi jak wspomniana już rezerpina czy 5'-MHC. Skuteczność wzrasta rów-

nież w przypadku szczepów z nadekspresją NorA [69]. Ogromną zaletą tej terapii jest to, iż nie prowadzi ona do selekcji bakterii opornych [21].

7. PODSUMOWANIE

Bakterie mają bardzo wyrafinowaną „broń” przeciwko antybiotykowi i bardzo często wykazują różne mechanizmy oporności. Paradoksalnie sami jesteśmy odpowiedzialni za nabywanie oporności przez bakterie. Stosowanie antybiotyków na tak szeroką skalę zarówno w szpitalach, lecznictwie zwierząt i rolnictwie, powoduje skutek odwrotny do zamierzonego. Dlatego trzeba inwestować w inne sposoby walki z bakteriami, niż dotychczas znane antybiotyki. Wielkie nadzieje pokłada się w roślinach, jako źródle substancji aktywnych. Pozyskiwanie nowych leków jest o tyle trudne, że nie znamy wszystkich mechanizmów działania pomp oraz ich systemu regulacji. Napotykamy na trudności choćby z izolacją białek transportowych. Dodatkowo mechanizm pomp może być modyfikowany wyjątkowo szybko przez mutacje w genomie bakteryjnym, które przyczyniają się również do nadekspresji pomp wcześniej nieznanych. Dotychczas badane inhibitory pomp wykazują dużą toksyczność w stosunku do organizmu ludzkiego, dlatego dla rozwoju tej strategii, konieczna jest identyfikacja nowych związków. Dotąd poznano ważne reszty aminokwasowe biorące udział w rozpoznaniu substratów oraz określono większość potencjalnych substratów najczęściej występujących pomp bakteryjnych. Zidentyfikowano wiele systemów transportowych, i wciąż identyfikuje się kolejne.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Ahmed M., Borsch C.M., Taylor S.S., Vázquez-Laslop N., Neyfakh A.A.: A protein that activates expression of a multidrug efflux transporter upon binding the transporter substrates. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 28506–25813
- [2] Ahmed M., Lyass L., Markham P.N., Taylor S.S., Vázquez-Laslop N., Neyfakh A.A.: Two highly similar multidrug transporters of *Bacillus subtilis* whose expression is differentially regulated. *J. Bacteriol.*, 1995; 177: 3904–3910
- [3] Amaral L., Viveiros M., Molnar J.: Antimicrobial activity of phenothiazines. *In Vivo*, 2004; 18: 725–731
- [4] Baquero F.: Gram-positive resistance: challenge for the development of new antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1997; 39 (Suppl.A): 1–6
- [5] Baucheron S., Tyler S., Boyd D., Mulvey M.R., Chaslus-Dancla E., Cloeckaert A.: AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004; 48: 3729–3735
- [6] Bohn C., Boulouc P.: The *Escherichia coli* cmlA gene encodes the multidrug efflux pump Cmr/MdfA and is responsible for isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside exclusion and spectinomycin sensitivity. *J. Bacteriol.*, 1998; 180: 6072–6075
- [7] Bohnert J.A., Kern W.V.: Selected arylpiperazines are capable of reversing multidrug resistance in *Escherichia coli* overexpressing RND efflux pumps. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005; 49: 849–852
- [8] Bolhuis H., van Veen H.W., Molenaar D., Poolman B., Driessen A.J., Konings W.N.: Multidrug resistance in *Lactococcus lactis*: evidence for ATP-dependent drug extrusion from the inner leaflet of the cytoplasmic membrane. *EMBO J.*, 1996; 15: 4239–4245
- [9] Chevalier J., Bredin J., Mahamoud A., Malléa M., Barbe J., Pages J.M.: Inhibitors of antibiotic efflux in resistant *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004; 48: 1043–1046
- [10] Cohen S.P., Hächler H., Levy S.B.: Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (mar) locus in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1993; 175: 1484–1492
- [11] Cohen S.P., McMurry L.M., Hooper D.C., Wolfson J.S., Levy S.B.: Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1989; 33: 1318–1325
- [12] Daniels C., Ramos J.L.: Adaptive drug resistance mediated by root-nodulation-cell division efflux pumps. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2009; 15 (Suppl.1): 32–36
- [13] Davidson A.L., Chen J.: ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.*, 2004; 73: 241–268
- [14] DeMarco C.E., Cushing L.A., Frempong-Manso E., Seo S.M., Jaravaza T.A., Kaatz G.W.: Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and biocides in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007; 51: 3235–3239
- [15] Eaves D.J., Ricci V., Piddock L.J.: Expression of acrB, acrF, acrD, marA, and soxS in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: role in multiple antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004; 48: 1145–1150
- [16] Edgar R., Bibi E.: A single membrane-embedded negative charge is critical for recognizing positively charged drugs by the *Escherichia coli* multidrug resistance protein MdfA. *EMBO J.*, 1999; 18: 822–832
- [17] Eswaran J., Koronakis E., Higgins M.K., Hughes C., Koronakis V.: Three's company: component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2004; 14: 741–747
- [18] Fath M.J., Kolter R.: ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.*, 1993; 57: 995–1017
- [19] Ghisalberti D., Mahamoud A., Chevalier J., Baitiche M., Martino M., Pages J.M., Barbe J.: Chloroquinolones block antibiotic efflux pumps in antibiotic-resistant *Enterobacter aerogenes* isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2006; 27: 565–569
- [20] Gibbons S., Oluwatuyi M., Kaatz G.W.: A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2003; 51: 13–17

- [21] Grinholc M., Szramka B., Kurlenda J., Graczyk A., Bielawski K.P.: Bactericidal effect of photodynamic inactivation against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* is strain-dependent. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 2008; 90: 57–63
- [22] Grinholc M., Szramka B., Olender K., Graczyk A.: Bactericidal effect of photodynamic therapy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain with the use of various porphyrin photosensitizers. *Acta Biochim. Pol.*, 2007; 54: 665–670
- [23] Grinholc M., Węgrzyn G., Kurlenda J.: Evaluation of biofilm production and prevalence of the *icaD* gene in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with nosocomial infections and carriers. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2007; 50: 375–379
- [24] Grinius L.L., Goldberg E.B.: Bacterial multidrug resistance is due to a single membrane protein which functions as a drug pump. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 2998–30004
- [25] Grkovic S., Brown M.H., Roberts N.J., Paulsen I.T., Skurray R.A.: QacR is a repressor protein that regulates expression of the *Staphylococcus aureus* multidrug efflux pump QacA. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 18665–18673
- [26] Grkovic S., Brown M.H., Skurray R.A.: Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2002; 66: 671–701
- [27] Hofmeyr J.H., Rohwer J.M., Snoep J.L., Westerhoff H.V., Konings W.N.: How to distinguish between the vacuum cleaner and flipcase mechanisms of the *ImrA* multi-drug transporter in *Lactococcus lactis*. *Mol. Biol. Rep.*, 2002; 29: 107–112
- [28] Jair K.W., Yu X., Skarstad K., Thöny B., Fujita N., Ishihama A., Wolf R.E. Jr.: Transcriptional activation of promoters of the superoxide and multiple antibiotic resistance regulons by Rob, a binding protein of the *Escherichia coli* origin of chromosomal replication. *J. Bacteriol.*, 1996; 178: 2507–2513
- [29] Kaatz G.W., Moudgal V.V., Seo S.M., Hansen J.B., Kristiansen J.E.: Phenylpiperidine selective serotonin reuptake inhibitors interfere with multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2003; 22: 254–261
- [30] Kaatz G.W., Moudgal V.V., Seo S.M., Kristiansen J.E.: Phenothiazines and thioxanthenes inhibit multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003; 47: 719–726
- [31] Kern W.V., Steinke P., Schumacher A., Schuster S., von Baum H., Bohnert J.A.: Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2006; 57: 339–343
- [32] Klyachko K.A., Schuldiner S., Neyfakh A.A.: Mutations affecting substrate specificity of the *Bacillus subtilis* multidrug transporter Bmr. *J. Bacteriol.*, 1997; 179: 2189–2193
- [33] Köhler T., van Delden C., Curty L.K., Hamzehpour M.M., Pechere J.C.: Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 2001; 183: 5213–5222
- [34] Kurlenda J., Grinholc M., Jasek K., Węgrzyn G.: RAPD typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a 7-year experience in a Polish hospital. *Med. Sci. Monit.*, 2007; 13: MT13–MT18
- [35] Levy S.B.: Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1992; 36: 695–703
- [36] Lewis K.: In search of natural substrates and inhibitors of MDR pumps. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2001; 3: 247–254
- [37] Li X.Z., Barré N., Poole K.: Influence of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-oprJ and MexE-MexF-oprN multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2000; 46: 885–893
- [38] Li X.Z., Ma D., Livermore D.M., Nikaido H.: Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to beta-lactam resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1994; 38: 1742–1752
- [39] Li X.Z., Nikaido H.: Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, 2004; 64: 159–204
- [40] Li X.Z., Nikaido H., Poole K.: Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1995; 39: 1948–1953
- [41] Lomovskaya O., Lewis K., Matin A.: EmrR is a negative regulator of the *Escherichia coli* multidrug resistance pump EmrAB. *J. Bacteriol.*, 1995; 177: 2328–2334
- [42] Lomovskaya O., Warren M.S., Lee A., Galazzo J., Fronko R., Lee M., Blais J., Cho D., Chamberland S., Renau T., Leger R., Hecker S., Watkins W., Hoshino K., Ishida H., Lee V.J.: Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001; 45: 105–116
- [43] Musumeci R., Speciale A., Costanzo R., Annino A., Ragusa S., Rapisarda A., Pappalardo M.S., Iauk L.: *Berberis aetnensis* C. Presl. extracts: antimicrobial properties and interaction with ciprofloxacin. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2003; 22: 48–53
- [44] Neyfakh A.A.: The multidrug efflux transporter of *Bacillus subtilis* is a structural and functional homolog of the *Staphylococcus* NorA protein. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1992; 36: 484–485
- [45] Neyfakh A.A., Bidnenko V.E., Chen L.B.: Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88: 4781–4785
- [46] Neyfakh A.A., Borsch C.M., Kaatz G.W.: Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1993; 37: 128–129
- [47] Nishino K., Latifi T., Groisman E.A.: Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.*, 2006; 59: 126–141
- [48] Nishino K., Nikaido E., Yamaguchi A.: Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009; (w druku)
- [49] Nishino K., Yamaguchi A.: Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 2001; 183: 5803–5812
- [50] Normark B.H., Normark S.: Evolution and spread of antibiotic resistance. *J. Intern. Med.*, 2002; 252: 91–106
- [51] Ocaktan A., Yoneyama H., Nakae T.: Use of fluorescence probes to monitor function of the subunit proteins of the MexA-MexB-oprM drug extrusion machinery in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 21964–21969
- [52] Omote H., Hiasa M., Matsumoto T., Otsuka M., Moriyama Y.: The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2006; 27: 587–593
- [53] Pannek S., Higgins P.G., Steinke P., Jonas D., Akova M., Bohnert J.A., Seifert H., Kern W.V.: Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-beta-naphthylamide. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2006; 57: 970–974
- [54] Paulsen I.T., Brown M.H., Skurray R.A.: Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.*, 1996; 60: 575–608
- [55] Pidcock L.J.: Multidrug-resistance efflux pumps – not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2006; 4: 629–636
- [56] Pidcock L.J.: Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2006; 19: 382–402
- [57] Poole K.: Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2005; 56: 20–51
- [58] Poole K.: Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol.*, 2002; 92(Suppl.1): 55S–64S
- [59] Poole K., Gotoh N., Tsujimoto H., Zhao Q., Wada A., Yamasaki T., Neshat S., Yamagishi J., Li X.Z., Nishino T.: Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.*, 1996; 21: 713–724
- [60] Putman M., van Veen H.W., Konings W.N.: Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2000; 64: 672–693
- [61] Ren Q., Kang K.H., Paulsen I.T.: TransportDB: a relational database of cellular membrane transport systems. *Nucleic Acids Res.*, 2004; 32: D284–D288
- [62] Saidjiam M., Benedetti G., Ren Q., Xu Z., Hoyle C.J., Palmer S.L., Ward A., Bettaney K.E., Szakonyi G., Meuller J., Morrison S., Pos M.K., Butaye P., Walravens K., Langton K., Herbert R.B., Skurray R.A., Paulsen I.T., O'Reilly J., Rutherford N.G., Brown M.H., Bill R.M., Henderson P.J.: Microbial drug efflux proteins of the major facilitator superfamily. *Curr. Drug Targets*, 2006; 7: 793–811
- [63] Schuldiner S., Granot D., Mordoch S.S., Ninio S., Rotem D., Soskin M., Tate C.G., Yerushalmi H.: Small is mighty: EmrE, a multidrug transporter as an experimental paradigm. *News Physiol. Sci.*, 2001; 16: 130–134

- [64] Schumacher A., Steinke P., Bohnert J.A., Akova M., Jonas D., Kern W.V.: Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* other than *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2006; 57: 344–348
- [65] Sobel M.L., McKay G.A., Poole K.: Contribution of the MexXY multidrug transporter to aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003; 47: 3202–3207
- [66] Srikumar R., Paul C.J., Poole K.: Influence of mutations in the mexR repressor gene on expression of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 2000; 182: 1410–1414
- [67] Stermitz F.R., Lorenz P., Tawara J.N., Zenewicz L.A., Lewis K.: Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydracarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 1433–1437
- [68] Su C.C., Rutherford D.J., Yu E.W.: Characterization of the multidrug efflux regulator AcrR from *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007; 361: 85–90
- [69] Tegos G.P., Masago K., Aziz F., Higginbotham A., Stermitz F.R., Hamblin M.R.: Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps potentiate antimicrobial photoinactivation. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2008; 52: 3202–3209
- [70] Thorarensen A., Presley-Bodnar A.L., Marotti K.R., Boyle T.P., Heckaman C.L., Bohanon M.J., Tomich P.K., Zurenko G.E., Sweeney M.T., Yagi B.H.: 3-arylpiperidines as potentiators of existing antibacterial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001; 11: 1903–1906
- [71] Truong-Bolduc Q.C., Dunman P.M., Strahilevitz J., Projan S.J., Hooper D.C.: MgrA is a multiple regulator of two new efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 2005; 187: 2395–2405
- [72] Truong-Bolduc Q.C., Zhang X., Hooper D.C.: Characterization of NorR protein, a multifunctional regulator of norA expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 2003; 185: 3127–3138
- [73] Ubarretxena-Belandia I., Baldwin J.M., Schuldiner S., Tate C.G.: Three-dimensional structure of the bacterial multidrug transporter EmrE shows it is an asymmetric homodimer. *EMBO J.*, 2003; 22: 6175–6181
- [74] Vázquez-Laslop N., Markham P.N., Neyfakh A.A.: Mechanism of ligand recognition by BmrR, the multidrug-responding transcriptional regulator: mutational analysis of the ligand-binding site. *Biochemistry*, 1999; 38: 16925–16931
- [75] Viveiros M., Martins M., Couto I., Rodrigues L., Spengler G., Martins A., Kristiansen J.E., Molnar J., Amaral L.: New methods for the identification of efflux mediated MDR bacteria, genetic assessment of regulators and efflux pump constituents, characterization of efflux systems and screening for inhibitors of efflux pumps. *Curr. Drug Targets*, 2008; 9: 760–778
- [76] White D.G., Goldman J.D., Demple B., Levy S.B.: Role of the acrAB locus in organic solvent tolerance mediated by expression of marA, soxS, or robA in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1997; 179: 6122–6126
- [77] Yoneyama H., Katsumata R.: Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2006; 70: 1060–1075
- [78] Yoshida H., Bogaki M., Nakamura S., Ubukata K., Konno M.: Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* norA gene, which confers resistance to quinolones. *J. Bacteriol.*, 1990; 172: 6942–6949

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.