

Received: 2010.12.20
Accepted: 2011.03.03
Published: 2011.04.01

Oporność wielolekowa związana z aktywnym usuwaniem leków z komórek drobnoustrojów*

Efflux-mediated antimicrobial multidrug resistance

Agata Jarmuła¹, Ewa Obłąk¹, Donata Wawrzycka², Jan Gutowicz¹

¹ Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski

² Instytut Biologii Roślin, Uniwersytet Wrocławski

Streszczenie

Oporność wielolekowa jest poważnym problemem w leczeniu infekcji bakteryjnych i grzybiczych. Jednym z głównych mechanizmów oporności jest aktywne usuwanie leków z komórki. U bakterii eksport substancji toksycznych z komórek odbywa się za pośrednictwem białek należących do pięciu rodzin: MFS, SMR, ABC, RND i MATE. Substratami pomp mogą być m.in. antybiotyki, chemioterapeutyki i detergenty. Geny oporności na te związki mogą się umiejscawiać na chromosomach bądź elementach ruchomych (plazmidy, transpozony, integrony). Obecność genów oporności na elementach ruchomych umożliwia bakteriom łatwe ich przekazywanie z komórki do komórki i rozprzestrzenianie oporności wielolekowej. Obecnie trwają badania nad związkami wykazującymi działanie inhibicyjne względem transporterów wyrzutu leków. Białka warunkujące wielolekooporność występują również u grzybów. Należą głównie do rodziny transporterów ABC, do podrodziny PDR. Białka te są powszechnie badane u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.

Słowa kluczowe:

systemy wyrzutu leków • oporność wielolekowa • antybiotyki

Summary

Multidrug resistance is a major problem in the treatment of infectious diseases caused by bacteria and fungi. One of the basic mechanisms of resistance is active efflux of distinct drugs from cells. Export of toxic compounds from bacterial cells is mediated by proteins of 5 distinct families: MF, SMR, ABC, RND and MATE. The substrate spectrum of efflux pumps includes antibiotics, chemotherapeutics and detergents. Genes that determine resistance can be located on chromosomes or mobile elements (plasmids, transposons, integrons). The presence of resistance genes on mobile elements enables bacteria to transfer those genes between cells and spread the multidrug resistance phenotype. There are several inhibitors of efflux pumps that are currently in the experimental phase. Proteins that mediate multidrug resistance are also present in fungal cells. They belong mainly to the ABC superfamily of transporters and PDR subfamily. These efflux pumps are widely investigated in *Saccharomyces cerevisiae*.

Key words:

efflux pumps • multidrug resistance • antibiotics

Full-text PDF:

<http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=937011>

* Praca częściowo finansowana z 10/16/S IGM/11/14 oraz z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N N303 068 534.

Word count: 6320
Tables: 4
Figures: 1
References: 55

Adres autorki: dr Ewa Oblak, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski, ul. S. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław; e-mail: ewa.oblak@microb.uni.wroc.pl

Wykaz skrótów: **ABC** – kasetta wiążąca ATP (ATP-binding cassette); **MATE** – multidrug and toxic compound extrusion; **MF** – major facilitator; **MFP** – białko łączące błony (membrane fusion protein); **MIC** – minimalne stężenie hamujące (minimal inhibitory concentration); **OMP** – białko błony zewnętrznej (outer membrane protein); **PDR** – oporność wielolekowa (pleiotropic drug resistance); **QRDR** – region determinujący oporność na chinolony (quinolone-resistance-determining region); **RND** – resistance-nodulation-cell division; **SMR** – small multidrug resistance.

1. WPROWADZENIE

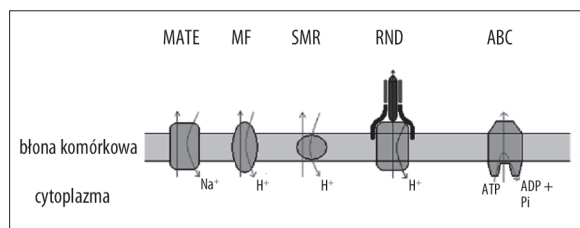
Odkrycie i zastosowanie antybiotyków umożliwiło walkę z groźnymi infekcjami bakteryjnymi. Jednak wraz z rozpowszechnieniem się antybiotyków, bakterie wykształciły różne mechanizmy oporności na te środki. Jednym z nich jest aktywny wyrzut leków z komórki. Biorą w nim udział białka, które eksportują antybiotyki i inne środki antybakteryjne z wnętrza komórki do środowiska zewnętrznego. Transportery te należą do pięciu niespokrewnionych rodzin: MF (major facilitator), SMR (small multidrug resistance), MATE (multidrug and toxic compound extrusion), RND (resistance-nodulation-cell division) i ABC (ATP-binding cassette) (ryc. 1). Transportery należące do rodzin MF, SMR i RND, jako źródło energii do aktywnego eksportu leków z komórki wykorzystują siłę protonomotoryczną. Transport leków przez białka MATE warunkowany jest gradientem stężenia jonów Na^+ , natomiast białka należące do rodziny ABC wykorzystują energię pochodzącą z hydrolizy ATP [40].

Transportery lekowe mogą mieć szeroką swoistość substratów i odpowiadać za wyrzut antybiotyków należących do różnych klas lub mogą być lekowswoiste i eksportować konkretną, charakterystyczną dla danego białka, klasę związków antybakteryjnych. Geny kodujące białka odpowiedzialne za wyrzut leków mogą występować zarówno na chromosomie bakteryjnym, jak i na mobilnych elementach genu, takich jak plazmidy czy transpozony.

W związku z dużą rolą systemów usuwania leków w warunkowaniu wielolekooporności drobnoustrojów potencjalnie groźnych dla zdrowia ludzi i zwierząt, stale prowadzone są badania nad ich budową, mechanizmem działania, fizjologiczną rolą w komórce, jak i związkami hamującymi ich działanie [42].

2. TRANSPORT AKTYWNY

Opisane w pracy systemy usuwania leków należą do układów transportu aktywnego. Transport aktywny to termodynamicznie niesamorzutny, endoergiczny strumień substancji przechodzący przez błonę komórkową sprzężony z procesem egzoergicznym dostarczającym energii dla tego transportu (np. hydroliza ATP, ale też bierne transporty innych substancji). Siłami napędowymi egzoergicznych biernych procesów transportowych mogą być gradienty elektrochemiczne różnych jonów (np. gradient protonowy, gradient Na^+). System



Ryc. 1. Schemat budowy i działania błonowych transporterów lekových

transportujący jedną substancję nazywamy uniportem, natomiast transporty sprzężone dwu substancjami mogą być symportem (w tym samym kierunku) lub antyportem (w przeciwnych kierunkach). Systemy transportu aktywnego nazywane są pompami, gdyż mogą translokować substancję w określonym kierunku (np. wyrzut z komórki) niezależnie od kierunku ich gradientu chemicznego lub elektrochemicznego.

Systemy aktywnego transportu stanowią białkowo-lipidowe układy (kompleksy) umiejscowione w błonach komórkowych. Strumienie substancji są wielkościami ukierunkowanymi (wektorowymi). Sprzężenie procesów ukierunkowanych z reakcjami chemicznymi lub innymi systemami transportowymi nie może być realizowane w środowisku izotropowym, wymaga środowiska anizotropowego. Błona komórkowa, jako miejsce lokalizacji tych układów, stanowi barierę między komórką i jej otoczeniem, a także tworzy środowisko anizotropowe niezbędne dla tego sprzężenia transportu z reakcją chemiczną lub innym ukierunkowanym transportem. Opisane systemy transportowe wyrzutu rozmaitych leków należą do różnych grup zróżnicowanych pod względem rodzajów transportu aktywnego i mechanizmów wykorzystania energii dla ich funkcji.

Różne pod względem sprzężenia z egzoergicznymi procesami systemy transportowe mogą być hamowane inhibitorami aktywności ATP-azowej lub czynnikami rozprzegającymi współtransport, czyli sprzężony transport dwóch substancji w tym samym bądź przeciwnym kierunku (symport lub antyport).

3. SYSTEMY USUWANIA LEKÓW Z KOMÓREK BAKTERII GRAM-DODATNICH

U bakterii Gram-dodatnich występuje wiele transporterów błonowych promujących usuwanie leku z komórki, aby

Tabela 1. Rodziny systemów usuwania leków z komórek bakteryjnych

Rodzina transporterów	Budowa białka	Zakres substratowy	Źródło energii
MF	około 400 aminokwasów; 12 lub 14 TMS; jednopodjednostkowe	tetracykliny, fluorochinolony, chloramfenikol, makrolidy, linkozamidy, streptograminy	siła protonomotoryczna (gradient pH)
SMR	około 110 aminokwasów; 4 TMS; występują w postaci tetramerów	chloramfenikol, streptomycyna, tetracykliny	siła protonomotoryczna (gradient pH)
RND	około 1000 aminokwasów; 12 TMS; współdziałają z OMP i MFP	β -laktamy, fluorochinolony, chloramfenikol, tetracykliny, makrolidy, sulfonamidy, aminoglikozydy, erytromycyna	siła protonomotoryczna (gradient pH)
MATE	około 450 aminokwasów; 12 TMS	aminoglikozydy, fluorochinolony	gradient Na^+
ABC	występuje w postaci kompleksu wielopodjednostkowego	tetracykliny, fluorochinolony, chloramfenikol, makrolidy, linkozamidy, aminoglikozydy, rifampycyna	hydroliza ATP

zapobiec jego akumulacji w komórce, co w konsekwencji mogłoby doprowadzić do śmierci bakterii. Białka transportujące leki u bakterii Gram-dodatnich należą do trzech niespokrewnionych rodzin: MF (major facilitator), SMR (small multidrug resistance) i ABC (ATP-binding cassette) [26]. Ich obecność zapewnia bakteriom oporność na wiele związków antybakteryjnych, tj. fluorochinolonów, tetracyklin oraz antybiotyków należących do rodziny MLS (makrolidy, linkozamidy i streptograminy). Niektóre własności tych białek zebrano w tabeli 1.

3.1. Rodzina MF transporterów błonowych

Wiele transporterów błonowych, występujących u bakterii Gram-dodatnich, należy do rodziny MF (major facilitator). Jest to duża i różnorodna rodzina. Należące do niej transportery błonowe bakterii Gram-dodatnich funkcjonują jako jednopodjednostkowa pompa [23]. Białka te składają się z około 400 reszt aminokwasowych zorganizowanych w 12 lub 14 transbłonowych helis [4]. Pomiędzy helisą 6 i 7 występuje duża pętla cytoplazmatyczna łącząca obie połowy transportera [5]. Transport substratu przez systemy wyrzutu należące do rodziny MF odbywa się na zasadzie uniportu, symportu z jednoczesnym wypływem jonów H^+ lub Na^+ , antyportu z jednoczesnym napływem jonów wodorowych lub antyportu z jednoczesnym napływem substancji rozpuszczonej [23]. Energię do transportu białka te czerpią z gradientu protonów po obu stronach błony [51]. Do grona transporterów leków, należących do rodziny MF, zalicza się m.in. białko NorA. Występuje ono u *Staphylococcus aureus* i charakteryzuje się szeroką swoistością dla leków hydrofilnych [4]. Gen kodujący białko NorA znajduje się na chromosomie, co zapewnia wrodzoną oporność tego gatunku na fluorochinolony, takie jak norfloksacyna i ciprofloksacyna [44]. Oporność uzależniona jest od zwiększenia ekspresji genu *norA*, która może być wynikiem mutacji. Takie zjawisko występuje w opornych na fluorochinolony szczepach klinicznych *S. aureus*, u których mutacja występuje w promotorze genu *norA* [30]. Kolejnym przykładem transportera, należącego do rodziny MF, jest Bmr występujący u *Bacillus subtilis*.

Jest to transporter wielolekowy, homologiczny do NorA. Ekspresja tego białka jest regulowana przez białko regulatorowe BmrR. W swojej strukturze ma ono kieszeń, która wiąże kationy hydrofobowe, aktywując tym samym ekspresję białka Bmr. Każda dodatnio naładowana cząsteczka, mogąca dopasować się do kieszeni, może być ligandem dla BmrR [38]. Badania wykazały, że transporter Bmr odpowiada za usuwanie z komórki antybiotyków, takich jak chloramfenikol, puromycyna i fluorochinolony [33]. U *B. subtilis* występuje również białko transporterowe Blt, będące homologiem Bmr. Oba białka mają podobny zakres substratowy, jednak różnią się drogami ekspresji u szczepów dzikich [42]. U bakterii Gram-dodatnich powszechnie występuje również transporter MefA, opisany u *Streptococcus pyogenes* oraz MefE, występujący u *Streptococcus pneumoniae*. Geny obu białek zidentyfikowano wewnątrz transpozonu, występującego na chromosomie. Zarówno białko MefA, jak i MefE mają wąski zakres substratowy, ograniczony do makrolidów. Poznane dotychczas systemy usuwania leków z komórek bakterii Gram-dodatnich zebrano w tabeli 2.

Do transporterów z rodziny MF, występujących u wielu bakterii Gram-dodatnich, należą dwa białka promujące eksport tetracykliny: TetK i TetL. Są one przykładem transporterów o wąskiej swoistości substratowej. Obecność TetL opisano u *B. subtilis*, natomiast TetK u *S. aureus* [33]. Przedstawione wyżej determinanty oporności na tetracykliny są kodowane chromosomowo, natomiast ekspresja tych białek jest regulowana przez białko TetR. Regulator ten ma kieszeń, w której polarne aminokwasy i związane cząsteczki wody tworzą gęstą sieć wiązań tetracyklina- Mg^{2+} za pomocą wiązań wodorowych i sił van der Waalsa [38].

Kolejnym przykładem systemu usuwania leków, zaklasyfikowanego do rodziny MF, jest białko LmrB. Wykazano, że spontaniczne mutanty *B. subtilis*, odporne na linkomycynę i puromycynę, wykazywały podwyższoną ekspresję genu *lmrB*, występującego w operonie z genem *lmrA*, kodującym prawdopodobnie białko represorowe [42].

Tabela. 2. Systemy usuwania leków z komórek bakterii Gram-dodatnich

System wyrzutu leków	Rodzina transporterów	Organizm	Zakres substratowy
NorA	MF	<i>S. aureus</i>	fluorochinolony
Bmr	MF	<i>B. subtilis</i>	chloramfenikol, fluorochinolony, puromycyna
Blt	MF	<i>B. subtilis</i>	chloramfenikol, fluorochinolony
MefA	MF	<i>S. pyogenes</i>	makrolidy
MefE	MF	<i>S. pneumoniae</i>	makrolidy
TetL	MF	<i>B. subtilis</i>	tetracykliny
TetK	MF	<i>S. aureus</i>	tetracykliny
FexA	MF	<i>S. lentus</i>	chloramfenikol, florfenikol
LmrB	MF	<i>B. subtilis</i>	linkomycyna, puromycyna
LmrP	MF	<i>L. lactis</i>	makrolidy, linkozamidy, streptograminy
MdeA	MF	<i>S. aureus</i>	makrolidy, linkozamidy, streptograminy
Smr	SMR	<i>S. aureus</i>	bromek etydyiny, czwartorzędowe sole amonowe
LmrA	ABC	<i>L. lactis</i>	chloramfenikol, makrolidy, linkozamidy, streptograminy
Vga A/B	ABC	<i>S. aureus</i>	streptograminy
MsrA	ABC	<i>Staphylococcus</i> spp.	erytromycyna, streptograminy typu B
MsrC	ABC	<i>E. faecalis</i>	makrolidy, streptograminy B
Lsa	ABC	<i>E. faecalis</i>	linkozamidy, streptograminy A
LsaB	ABC	<i>S. sciuri</i>	klindamycyna

3.2. Rodzina SMR transporterów błonowych

Transportery należące do rodziny SMR składają się z około 110 reszt aminokwasowych i w swojej strukturze zawierają cztery segmenty transbłonowe. W związku z niewielkimi rozmiarami białek należących do tej rodziny, prawdopodobnie funkcjonują one jako kompleksy oligomeryczne [33].

Źródłem energii do aktywnego usuwania substratów jest siła protonomotoryczna [23]. Mimo że transportery SMR są wielolekowe, ich zakres substratowy ograniczony jest do lipofilnych leków, środków antyseptycznych i dezynfekcyjnych [30]. Transportery należące do tej rodziny po raz pierwszy opisano u *S. aureus*, ale występują również u innych gronkowców. Należy tu białko Smr, kodowane przez gen *smr*, który znajduje się zarówno na plazmidach koniugacyjnych, jak i niekoniugacyjnych. Białko Smr pośredniczy w wymianie leku na proton na zasadzie antyportu. Analiza sekwencyjna plazmidów ujawniła obecność także dwóch innych białek, w dużym stopniu homologicznych do Smr, QacG i QacH. Podobnie jak Smr, transportery te promują eksport m.in.: bromku etydyiny i czwartorzędowych soli amonowych [44].

3.3. Rodzina ABC transporterów błonowych

Kolejną rodziną transporterów lekowych, występujących u bakterii Gram-dodatnich, jest rodzina ABC. Białka

należące do tej rodziny zbudowane są z czterech domen: dwóch domen NBD (nucleotide binding domain) i dwóch TMD (transmembrane domain) [31]. TMD w swej strukturze zawierają sześć transbłonowych α -helis i tworzą homo- lub heterodimery. Dwie domeny NBD wiążą ATP po stronie cytoplazmatycznej i współdziałają z domenami transbłonowymi [23].

Cechą odróżniającą transportery ABC od pozostałych rodzin jest źródło energii do aktywnego usuwania leków, energia bowiem pochodzi z hydrolizy ATP. Związanie i hydroliza ATP wywołuje zmiany konformacyjne w strukturze transportera, co jest niezbędne do eksportu substratów. Zakres substratowy transporterów ABC obejmuje tetracykliny, fluorochinolony, chloramfenikol, rifampicynę, makrolidy, linkozamidy, aminoglikozydy [55]. Białka należące do rodziny ABC rzadko występują u bakterii. Pierwszym poznany bakteryjnym systemem usuwania leków jest LmrA występujący u *L. lactis*. Transporter ten funkcjonuje jako homodimer i ma przynajmniej dwa miejsca wiążące lek [4]. Determinuje oporność na chloramfenikol oraz antybiotyki MLS. Homologi tego białka występują także u *B. subtilis* i *S. aureus* [33]. Badania wykazały, że indukowana oporność na erytromycynę i streptograminy typu B związana jest z przypuszczalnym mechanizmem usuwania leków kodowanym przez plazmidowy gen *msrA*. Białko MsrA należy do rodziny ABC jednak nie ma domeny transmembranowej. Gronkowce mające MsrA wykazywały zmniejszoną

Tabela. 3. Systemy usuwania leków z rodziny RND występujące u *E. coli*

System wyrzutu leków	Komponenty systemu			Zakres substratowy
	MFP	RND	OMP	
AcrAB-TolC	AcrA	AcrB	TolC	β -laktamy, erytromycyna, chloramfenikol, fluorochinolony, tetracykliny, nowobiocyna, linezolid
AcrD	AcrA	AcrD	TolC	aminoglikozydy, nowobiocyna
AcrEF	AcrE	AcrF	TolC	fluorochinolony, tetracykliny, linezolid, trimetoprim
YhiUV	YhiU	YhiV	TolC	doksorubicyna, nowobiocyna, erytromycyna
MdtABC	MdtA	MdtB/MdtC	TolC	nowobiocyna, β -laktamy

akumulację erytromycyny w komórce. Jest więc możliwe, że MsrA współpracuje z innym białkiem, dostarczającym niezbędną domenę transbłonową. Znaleziono na mobilnych elementach plazmidowych geny *vgaA* i *vgaB* determinują oporność na mieszaninę streptogramin typu A i typu B u *S. aureus* [33]. U innej bakterii, *Enterococcus faecalis*, powszechnie występuje chromosomowy gen *msrC* kodujący determinant oporności na makrolidy i streptograminy B. *E. faecalis* wykazuje również charakterystyczną dla siebie, wrodzoną oporność na linkozamidy i streptograminy A. Zapewnia ją chromosomowy gen *lsa*, kodujący transporter ABC, który nie ma domeny transbłonowej. Białko podobne do Lsa opisano u *Streptococcus sciuri*. Jest to transporter LsaB kodowany przez DNA plazmidowe i warunkujący oporność tego gatunku na półsyntetyczny antybiotyk z grupy linkozamidów – klindamycynę [33].

4. SYSTEMY USUWANIA LEKÓW Z KOMÓREK BAKTERII GRAM-UJEMNYCH

W związku z różnicami w budowie między osłonami komórek bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, różne są również systemy usuwania leków występujące u tej grupy bakterii. Mimo że u bakterii Gram-ujemnych występują systemy usuwania leków należące do wszystkich wspomnianych wcześniej rodzin, najbardziej znaczące i charakterystyczne dla tej grupy są transportery należące do rodziny RND (resistance-nodulation-cell division).

4.1. Rodzina RND transporterów błonowych

Transportery RND (resistance-nodulation-cell division) są szeroko rozprzestrzenione wśród bakterii Gram-ujemnych. Są to pompy wielolekowe, kodowane zwykle przez geny chromosomowe [23]. Transportery RND współpracują z białkami występującymi w peryplazmie i w błonie zewnętrznej w taki sposób, że cały system wyrzutu leków składa się z trójczęściowego kompleksu. Pierwszą składową tego systemu jest białko transporterowe znajdujące się w błonie cytoplazmatycznej. Ma ono 12 transmembranowych segmentów lub α -helis, które mają dwie duże domeny cytoplazmatyczne między segmentem pierwszym i drugim oraz między segmentem siódmym i ósmym. Domeny te zawierają reszty aminokwasowe, które są odpowiedzialne za rozpoznawanie substratu. Działanie transporterów polega na antyporcie substrat-proton. Kolejną częścią systemu RND jest peryplazmatyczne białko łączące

błony. Białko to tworzy strukturę podobną do pierścienia i ma dwie domeny hydrofobowe przy C-końcu i N-końcu, które prawdopodobnie oddziałują z komponentami błony zewnętrznej i cytoplazmatycznej. Jego działanie opisują dwa możliwe modele. Pierwszy zakłada oligomeryzację peryplazmatycznego białka łączącego błony z białkiem błony zewnętrznej, przez co formowany jest kanał, który stanowi drogę substratu przez peryplazmę. Funkcjonowanie białka łączącego błony według drugiego modelu odbywa się przez pośrednictwo w zestawieniu błony zewnętrznej i cytoplazmatycznej i utworzeniu szlaku transportu substratu. Białka te są prawdopodobnie niezbędne w montażu i funkcjonowaniu pomp RND [43]. Ostatnią składową jest białkowy kanał błony zewnętrznej. Jest to trimer składający się z połączonych beczułkowatych struktur. Jeden koniec tworzy por o szerokim otworze i jest osadzony w błonie zewnętrznej kotwicząc długi tunel zbudowany z 12 α -helis, sięgający w peryplazmę. Jest on otwarty w stronę części beczułkowatej, a zamknięty w kierunku błony cytoplazmatycznej. Zamknięty koniec tunelu może zostać otwarty poprzez ruch α -helis. Tak funkcjonujący system wyrzutu może usuwać antybiotyki przez błonę cytoplazmatyczną i słabo przepuszczalną błonę zewnętrzną. U *Escherichia coli* występuje siedem znanych transporterów RND, z czego pięć jest dobrze scharakteryzowanych. Charakterystykę tych białek przedstawia tabela 3.

Najlepiej poznany jest system AcrAB-TolC, gdzie AcrB to białko transporterowe znajdujące się w błonie cytoplazmatycznej, AcrA jest białkiem peryplazmatycznym, a TolC białkiem błony zewnętrznej [32]. Trimer AcrB składa się z domeny peryplazmatycznej i domeny transmembranowej. Wyższa część domeny peryplazmatycznej wchodzi w interakcje z TolC. Domena peryplazmatyczna odgrywa decydującą rolę w determinowaniu swoistości substratowej. Transportowany lek jest wiązany do kieszeni znajdującej się w centrum trimera AcrB, jednak każdy z rozpoznawanych leków oddziałuje z innymi resztami aminokwasów.

TolC to białko wielofunkcyjne, które dzięki krótkotrwałym interakcjom z transporterem lekowym indukowanym obecnością substratu, może się chwilowo otwierać i przenosić leki o niewielkiej masie oraz duże polipeptydowe toksyny. TolC ma strukturę trimeryczną – trzy cząsteczki TolC formują cylindryczny kanał. Koniec od strony błony zewnętrznej jest otwarty, a koniec peryplazmatyczny zżęza się. Zamykanie kanału TolC zależy m.in. od pH [4]. Geny

Tabela. 4. Systemy usuwania leków z rodziny RND u *P. aeruginosa*

System wyrzutu leków	Komponenty systemu			Zakres substratowy
	MFP	RND	OMP	
MexAB-OprM	MexA	MexB	OprM	β -laktamy, fluorochinolony, chloramfenikol, makrolidy, tetracyklina, sulfonamidy, nowobiocyna
MexCD-OprJ	MexC	MexD	OprJ	cefsulodyna, nowobiocyna, fluorochinolony, chloramfenikol, erytromycyna, tetracyklina
MexEF-OprN	MexE	MexF	OprN	fluorochinolony, chloramfenikol, trimetoprim, tetracyklina
MexXY	MexX	MexY	OprM	tetracyklina, erytromycyna, aminoglikozydy
MexJK	MexJ	MexK	OprM/OpmH	erytromycyna, tetracyklina, triklosan
MexGHI-OpmD	MexH	MexI	OpmD	norfloksacyna
MexVW	MexV	MexW	OprM	fluorochinolony, tetracyklina, chloramfenikol, erytromycyna

acrA i *acrB* leżą w jednym operonie i ekspresjonowane razem odpowiadają za oporność na barwniki, detergenty i antybiotyki. Substratami tego systemu są takie leki jak: chloramfenikol, β -laktamy, makrolidy i fluorochinolony. Składanie *AcrA*, *AcrB* i *TolC* w funkcjonalną pompę następuje w zależności od obecności substratu. Innym systemem usuwania leków u *E. coli* jest *AcrD*, który eksportuje nowobiocynę i aminoglikozydy, jednak do sprawnego funkcjonowania wymaga obecności *AcrA* i *TolC*. System *AcrEF* nie występuje u organizmów dzikich, tylko u mutantów opornych na fluorochinolony, które nie mają systemu *AcrAB*. Białko *AcrF* współdziała z *AcrA* i *TolC*. Zwiększona ekspresja genów systemu *YhiUV* powoduje oporność tego gatunku na dokсорubicynę i erytromycynę. *YhiUV* jest homologiem *AcrAB*. Kolejnym kompleksem promującym eksport leków u *E. coli* jest *MdtABC*. Jest to system, zawierający dwa różne transportery: *MdtB* i *MdtC* i obecność ich obu jest konieczna do sprawnego działania. Substratami dla tych transporterów jest np. nowobiocyna [23]. Wszystkie wyżej wymienione systemy współdziałają z białkiem *TolC*.

Kolejnym organizmem, u którego występuje wiele różnych transporterów RND jest *Pseudomonas aeruginosa*. Ma on około dwanaście pomp, z czego siedem zostało dotychczas scharakteryzowanych (tabela 4). Pierwszą z nich jest system *MexAB-OprM*, gdzie *MexA* to białko peryplazmatyczne łączące błony, *MexB* jest transporterem RND, a *OprM* białkiem błony zewnętrznej. Jest to system, którego transportery mają najszerszy zakres substratowy u tego gatunku. Substratami dla tej pompy mogą być β -laktamy, chinolony, makrolidy, tetracyklina, chloramfenikol, nowobiocyna, sulfonamidy, trimetoprim, tiolaktomycyna. System *MexCD-OprJ* występuje u szczepów *P. aeruginosa* mających mutację *nfxB*. Mutanty *nfxB* dzielą się na dwie grupy: A i B. Mutanty typu A oporne są na ofloksacynę, erytromycynę i niektóre nowe cefalosporyny (np. cefsulodyna), a mutanty typu B dodatkowo jeszcze na tetracyklinę i chloramfenikol. Kolejnym mechanizmem eksportu leków u tego gatunku jest *MexEF-OprN*. System ten występuje tylko u szczepów mających mutację *nfxC*. Zapewnia im to

oporność na fluorochinolony, tetracyklinę, chloramfenikol i trimetoprim. W przeciwieństwie do *MexAB-OprM*, systemy *MexCd-OprJ* oraz *MexEF-OprN* nie są odpowiedzialne za oporność na β -laktamy. Działanie tego systemu wspomaganego jest zmniejszoną ekspresją *oprD* – genu kodującego białko porynowe błony zewnętrznej, które jest głównym kanałem imipenemu. Mutanty, u których brak tego białka są niewrażliwe na ten antybiotyk. Operon *mexXY*, w przeciwieństwie do wyżej wymienionych systemów, nie ma otwartej ramki odczytu dla genu kodującego białko błony zewnętrznej. Zamiast tego wykorzystuje *OprM* jako komponent błony zewnętrznej. Delecja genów *mexXY* skutkuje zwiększoną przepuszczalnością dla aminoglikozydów, tetracykliny i erytromycyny. Ekspresja tych genów u *E. coli* powoduje oporność na fluorochinolony, mimo że u *P. aeruginosa* nie przyczynia się do wrodzonej oporności na te leki. *MexJK* jest systemem, dla którego substratami jest triklosan, erytromycyna i tetracyklina. Do transportu erytromycyny i tetracykliny *MexJK* wymaga obecności białka błony zewnętrznej *OprM*, a do eksportu triklosanu wykorzystuje białko *OpmH*. Kolejnym mechanizmem eksportu leków u *P. aeruginosa* jest *MexGHI-OpmD*. Składa się on z peryplazmatycznego białka łączącego błony (*MexH*), transportera RND (*MexI*) i kanału białkowego błony zewnętrznej (*OpmD*). W systemie tym występuje dodatkowo małe białko integralne błony – *MexG*, którego rola nie została jeszcze poznana. Mechanizm ten zapewnia oporność na norfloksacynę. *MexVW* współpracuje z *OprM* i jest odpowiedzialny za eksport fluorochinolonów, tetracykliny, chloramfenikolu i erytromycyny. U *Neisseria gonorrhoeae* występuje system *MtrCDE*, gdzie *MtrC* jest białkiem peryplazmatycznym, *MtrD* jest transporterem RND, a *MtrE* białkiem błony zewnętrznej. Obecność *MtrC* i *MtrE* jest konieczna do transportu erytromycyny, penicyliny i kwasów tłuszczowych. Ich inaktywacja powodowała wzrost wrażliwości na te związki [23]. *Burkholderia cephacia*, która jest patogenem roślin i oportunistycznym patogenem ludzkim ma system *CeoAB-OpcM*. Jest on homologiem *MexAB-OprM* i promuje aktywne usuwanie chloramfenikolu, fluorochinolonów i trimetoprimu. Inny przedstawiciel tego rodzaju, *Burkholderia pseudomallei*, ma dwa

systemy wyrzutu: AmrAB-OprA oraz BpeAB-OprB. Oba nadają oporność tej bakterii na aminoglikozydy i w mniejszym stopniu na makrolidy. Dwa mechanizmy eksportu leków występują również u innej bakterii Gram-ujemnej, *Stenotrophomonas maltophilia*. Pierwszy z nich to SmeABC, jednak tylko SmeC warunkuje oporność na β -laktamy, aminoglikozydy i fluorochinolony. Sugeruje to, że SmeC może być częścią innej, niezidentyfikowanej jeszcze pompy. Drugim mechanizmem jest SmeDEF, dla którego substratami są makrolidy, fluorochinolony, chloramfenikol, tetracyklina i erytromycyna [23]. *Serratia marcescens* ma trzy mechanizmy RND, zapewniające wieloantybiotykową oporność. SdeAB odpowiada za usuwanie fluorochinolonów, chloramfenikolu, barwników i detergentów, natomiast SdeCDE i SdeXY eksportują norfloksacynę i tetracyklinę [4]. U *Haemophilus influenzae* występuje trójgenowa grupa kodująca HIO893, HIO894 i HIO895. Dysrupcja (zniszczenie) genów HIO894 i HIO895 powoduje wzrost wrażliwości na erytromycynę, rifampicynę, nowobiocynę, SDS i barwniki kationowe. *Acinetobacter baumannii* ma dwa systemy usuwania leków: AdeABC, których obecność warunkuje oporność na aminoglikozydy, fluorochinolony, chloramfenikol, tetracyklinę, erytromycynę i trimetoprim, natomiast ekspresja AdeDE powoduje spadek wrażliwości na amikacynę, ceftazidim, chloramfenikol, ciprofloksacynę, erytromycynę, meropenem, rifampin i tetracyklinę [23]. *Salmonella enterica* serotyp Typhimurium oporność na fluorochinolony, tetracykliny, chloramfenikol, karbenicylinę i cefoksytynę zawdzięcza obecności systemu AcrAB [42]. Mechanizm AcrAB-TolC występuje też u *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* i *Klebsiella oxytoca* i warunkuje oporność na fluorochinolony, chloramfenikol i tetracyklinę. U *Campylobacter jejuni* obecne są dwa mechanizmy usuwania leków: CmeABC, odpowiedzialny za oporność na fluorochinolony, sole kwasów żółciowych, bromek etyldyny i metale ciężkie oraz CmeDEF [23].

4.2. Rodziny MF, MATE, SMR i ABC transporterów błonowych

U bakterii Gram-ujemnych występują białka transportujące leki należące do każdej z głównych rodzin. Transportery tetracykliny są w większości białkami rodziny MF. Systemy usuwania leków są przeważającym mechanizmem warunkującym oporność na te związki. Występują u kilkunastu organizmów m.in.: *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *E. coli*, *Chlamydia*, *Helicobacter pylori*, ale brak ich na przykład u *Campylobacter* czy *Neisseria* spp. Białka Tet zapewniają oporność na tetracyklinę, oksytetracyklinę i chlortetracyklinę [43]. Badania wykazały obecność u *E. coli* dwóch otwartych ramek odczytu: *emrA* i *emrB*. Pierwsza z nich koduje białko transporterowe należące do rodziny MF, a druga białko peryplazmatyczne łączące błony. Transporter ten współdziała z białkiem błony zewnętrznej TolC. System EmrAB zapewnia oporność na antybiotyki hydrofobowe. Znaczącą homologię z systemem EmrAB wykazuje VceAB występujący u *Vibrio cholerae*. Obecność tego transportera warunkuje oporność na różne toksyczne związki np. deoksycholany oraz antybiotyki: kwas nalidyksowy i chloramfenikol [44]. MdfA występujący u *E. coli* również należy do rodziny MF i promuje wyrzut chloramfenikolu z komórki. MdfA jest przykładem transportera, który nadaje oporność na jedną grupę związków, ale zwiększa wrażliwość na drugą. Homologi MdfA

obecne są u wielu bakterii Gram-ujemnych, np. CmlA występujący u *P. aeruginosa*. Jego obecność warunkuje oporność na chloramfenikol i florfenikol. Z opornością na oba te związki związane jest również białko kodowane plazmidowo przez gen *pp-flo* występujące u patogenu ryb *Pasteurella piscicida*. Prawie identyczny gen *flo_{SI}* jest obecny u *Salmonella enterica* serowar Typhimurium i również warunkuje eksport chloramfenikolu i florfenikolu [30]. Do rodziny SMR należy m.in. transporter EmrE występujący u *E. coli*. Jest to homoooligomer, złożony prawdopodobnie z trzech monomerów [7]. Warunkuje oporność na tetracyklinę i bromek etyldyny. Jego działanie polega na tym, że po związaniu leku dwie z trzech reszt Glu oddają proton. Wtedy transporter ulega zmianom konformacyjnym. Miejsce wiązania zamyka się i otwiera po drugiej stronie błony. Uwolnienie leku katalizowane jest przez dwa protony. U bakterii Gram-ujemnych występują także transportery należące do rodziny MATE. Usuwaniu leku jest w tym przypadku połączone z napływem Na⁺ do komórki. Przedstawicielem tej klasy białek jest NorM występujący u *Vibrio parahaemolyticus*. Determinuje oporność na barwniki, fluorochinolony i aminoglikozydy [4]. Jego homolog YdhE promuje eksport tych samych związków i występuje u *E. coli*. Innymi transporterami tej rodziny są HmrM u *Haemophilus influenzae* oraz PmpM u *P. aeruginosa*. Ich obecność warunkuje oporność na fluorochinolony, detergenty i barwniki [43]. Do rodziny ABC należy m.in. MacAB-TolC. Jest to jedyny znany system usuwania leków z tej rodziny, kodowany przez geny chromosomowe u bakterii Gram-ujemnych, który działa razem z peryplazmatycznym białkiem łączącym błony i białkiem błony zewnętrznej. Występuje u *E. coli* i jest swoisty dla eksportu makrolidów [44]. Transporterem należącym do rodziny ABC jest EC-MsbA występujący u *E. coli*, który eksportuje lipidy. Funkcjonuje jako homodimer o kształcie stożka, gdzie domeny wiążące nukleotyd znajdują się przy podstawie. Każdy monomer składa się z sześciu α -helis, które zapewniają wejście i wyjście kanału po stronie wewnętrznej i zewnętrznej błony [4].

5. REGULACJA EKSPRESJI SYSTEMÓW WYRZUTU LEKÓW

Ekspresja transporterów błonowych promujących eksport leków z komórek musi podlegać ścisłej kontroli. Mechanizmy prowadzące do nadekspresji systemów usuwania leków działają na różnej zasadzie. Większość systemów RND znajduje się pod kontrolą lokalnego represora [44]. AcrR, podobnie jak wiele innych represorów, należy do rodziny represorów TetR. Wszystkie białka represorowe podobne do TetR działają na podobnej zasadzie. Represor wiąże się do operatora, co zapobiega ekspresji transportera. Powoduje to podatność komórki bakteryjnej na toksyczne substancje. Jednak gdy związek pasujący do profilu substratowego znajdzie się w komórce, wiąże się do represora, co umożliwi ekspresję i wytwarzanie białek transporterowych. Kontrola ekspresji systemów wyrzutu leków może się również odbywać na zasadzie regulacji pozytywnej dzięki aktywowatorom transkrypcji. Przykładem jest regulacja operonu *mexEF-oprN* przez lokalny aktywator MexT. Gen *mexT* znajduje się powyżej genów systemu usuwania leków *MexEF-OprN* i ulega transkrypcji w tym samym kierunku co *mexEF-oprN*. Nadekspresja MexT indukuje ekspresję białek transporterowych [43]. Ekspresja operonu *MexEF-OprN* regulowana jest również przez

produkt genu *mexS*, który jest represorem tego operonu. Mutacje w genie *mexS* powodują wzrost ekspresji genów operonu *mexEF-oprN* [25]. Lokalnym induktorem jest również białko BmrR, występujące u *B. subtilis* i aktywujące transkrypcję transportera Bmr [30]. Innym mechanizmem kontroli ekspresji białek transporterowych są mutacje w genach kodujących globalne regulatory. Przykładem mogą być geny *soxR* i *marR* występujące m.in. u *E. coli* i *S. enterica*. Mutacje w tych genach prowadzą do ich nadekspresji, co powoduje aktywację transkrypcji *acrAB* [42]. Pozytywnej regulacji przez globalne regulatory podlegają również m.in.: systemy Mex u *P. aeruginosa* oraz Bmr i Blt u *B. subtilis* [30]. Innym mechanizmem kontroli ekspresji genów kodujących transportery lekowe są mutacje w regionie promotora tych genów. Badania wykazały, że mutacje w +5 nukleotydzie mRNA kodującego system *norA* u *S. aureus* prowadziły do nadekspresji tego systemu [42]. W wielu przypadkach ekspresja genów kodujących białka transporterowe zwiększa się, gdy w środowisku znajduje się substrat danego białka. Wielolekooporne szczepy kliniczne często są otrzymywane podczas stosowania terapii antybakteryjnych. Niektóre z leków są szczególnie istotne w powstawaniu i selekcji mutantów opornych na antybiotyki i chemioterapeutyki. Najlepiej zbadaną grupą środków antybakteryjnych w związku z selekcją lekoopornych mutantów są fluorochinolony. Badania wykazały, że oporność indukowana działaniem fluorochinolonów powstaje dzięki mutacjom w domenie QRDR (quinolone-resistance-determining region). Fluorochinolony to substancje syntetyczne, a docelowym miejscem ich działania jest gyraza DNA, co stwarzało ogromną szansę skutecznego leczenia infekcji bakteryjnych. Jednak okazało się, że działanie tymi chemioterapeutykami na komórki bakteryjne powodowało zwiększone wytwarzanie transporterów lekowych, ponieważ jest to jedyny mechanizm zapewniający bakteriom oporność na fluorochinolony. Możliwe również, że związki te niszczą bakteryjne DNA i inicjują włączenie systemu naprawy DNA, co pomaga w selekcjonowaniu mutantów opornych na fluorochinolony. Przykładem bakterii, która wystawiona na działanie fluorochinolonów zwiększała wytwarzanie transporterów jest *P. aeruginosa*. W zależności od użytego leku powstały różne fenotypy. Na przykład po zadziałaniu kwasem nalidiksowym wyselekcjonowane zostały mutanty typu *nal*, natomiast norfloksacyna powodowała generację mutantów typu *nfx*. Badania nad selekcją lekoopornych mutantów *P. aeruginosa in vitro* wykazały, że często dochodziło do generowania mutantów poprzez działanie na dzikie szczepy, takimi środkami antybakteryjnymi jak β -laktamy (zwłaszcza karbenicylina), tetracyklina, chloramfenikol czy aminoglikozydy. Induktorami powstawania wielolekoopornych mutantów mogą być również środki antyseptyczne, takie jak triklosan [30].

6. NATURALNE FUNKCJE TRANSPORTERÓW LEKOWYCH

Mimo ogromnej roli w warunkowaniu oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki, fizjologiczne funkcje transporterów błonowych są prawdopodobnie o wiele bardziej złożone. Bardzo ważną rolę spełniają one w transporcie substancji szkodliwych, co zapewnia przetrwanie w niesprzyjającym środowisku. W przypadku bakterii jelitowych, ich naturalne środowisko bytowania bogate jest w żółć i sole kwasów żółciowych. Są to naturalne substancje o działaniu antymikrobiologicznym, występujące w układzie

pokarmowym ptaków i ssaków, dlatego też naturalna mikroflora jelitowa musi mieć mechanizmy ochrony przed tymi substancjami. Ochronę taką zapewniają białka eksporterowe, które z jednej strony zapobiegają akumulacji soli kwasów żółciowych, a z drugiej promują wydzielanie metabolitów z komórki bakteryjnej. Rolę w zwiększaniu tolerancji na żółć i sole kwasów żółciowych wykazano badając mutanty *E. coli*, *S. enterica* serowar Typhimurium oraz *Campylobacter jejuni*. Delecje komponentów systemu AcrAB-TolC lub CmeABC skutkowały w zwiększonej przepuszczalności osłon komórkowych dla soli kwasów żółciowych. Natomiast mutanty wykazujące nadekspresję białek wyrzutu były odporne na duże stężenia żółci. U *E. coli* ekspozycja na sole kwasów żółciowych, takie jak cheno-deoksycholan i taurocholan indukowała aktywację systemów AcrAB i EmrAB, natomiast w przypadku *S. enterica* serowar Typhimurium, wystawienie na działanie żółci uaktywniało mechanizm AcrAB [42]. Wiele różnych funkcji mają systemy należące do rodziny RND. Są one bardzo ważne dla patogenności bakterii i przetrwania w ich niszy ekologicznej. U *P. aeruginosa* mechanizm MexAB-OprM odpowiada za eksport kilkunastu czynników wirulencji na zewnątrz komórki. Szczepy wykazujące nadekspresję tego mechanizmu charakteryzowały się mniejszą zdolnością wirulencji, spowodowaną zwiększonym eksportem czynników wirulencji. Funkcjonowanie systemu MtrCDE u *Neisseria gonorrhoeae* zapewnia przetrwanie w obecności hydrofobowych substancji śluzówkowych w drogach rodnych [42]. Systemy IefABC u *Agrobacterium tumefaciens* oraz AcrAB u *Erwinia amylovora* pełnią istotną rolę w wirulencji i kolonizacji roślin. Pompy te eksportują izoflawonoidy i zapewniają oporność na fitoaleksyny. Podczas badań hodowli tkankowych wykazano, że składniki pomp RND są bardzo istotne w inwazji, adhezji i kolonizacji komórek gospodarza przez bakterie. Mutanty *P. aeruginosa* z nieaktywnym genem *mexB* nie miały zdolności kolonizacji komórek. Szczepy *S. enterica* serowar Typhimurium z delecją genu *tolC* wykazywały słabszą adhezję do ludzkich komórek jelita cienkiego, mysich monocytów oraz nie były zdolne do inwazji makrofagów [43]. Systemy usuwania leków prawdopodobnie odgrywają też rolę w quorum-sensing. Obecność transporterów promuje eksport cząsteczek sygnałnych do kontaktu komórka-komórka. Na wydzielanie sygnałnego chinolonu PQS przez *P. aeruginosa* wpływa nadekspresja systemu MexEF-OprN. Białko SdiA, będące regulatorem quorum-sensing u *E. coli*, jest pozytywnym regulatorem systemu AcrAB-TolC. Badania wykazały, że istnieje związek między obecnością systemu AcrAB-TolC u *E. coli* a transportem wapnia [23].

7. INHIBITORY TRANSPORTERÓW WIELOLEKOWYCH

W związku z dużym wpływem systemów usuwania leków w warunkowaniu wielolekooporności, konieczne jest zastosowanie środków hamujących działanie transporterów lekowych. W przeciągu ostatnich lat zidentyfikowano wiele związków będących inhibitorami transporterów wielolekowych występujących u bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Wiele z nich zostało wyizolowanych z roślin lub mikroorganizmów.

Badania dotyczące inhibicji pomp wielolekowych występujących u bakterii Gram-dodatnich prowadzono głównie na wielolekoopornych szczepach *S. aureus*. Związki

działające hamująco na transportery lekowe pochodzą głównie ze źródeł naturalnych. Przykładem jest rezerpina, alkaloid roślinny po raz pierwszy wyizolowany z korzeni *Rauwolfia vomitoria* [50]. Działa ona hamująco na białko Bmr, będące transporterem lekowym u *B. subtilis*. Badania wykazały, że rezerpina oddziałuje bezpośrednio z białkiem Bmr, wiążąc się do kieszeni utworzonej przez fenyloalaninę 143, walinę 286 i fenyloalaninę 306 [42]. Alkaloid ten wzmacnia również działanie tetracykliny, czego dowodem był 4-krotny spadek MIC w izolatach klinicznych *S. aureus* mających białka TetK promujące eksport tetracykliny [50]. Rezerpina hamuje również transporter NorA, obecny u *S. aureus*, przez wzmocnienie działania norfloksacyliny [42]. Kolejnym inhibitorem jest flawonolignan 5'-MHC-D (5'-metoksyhydrokarpin-D). W połączeniu z berberyną, która naturalnie wykazuje niewielkie właściwości antybakteryjne, obserwowano 16-krotny wzrost działania antybakteryjnego berberyny przeciwko *S. aureus*. Również zastosowanie niektórych metabolitów fenolowych wzmacniało działanie zarówno berberyny jak i tetracykliny i erytromycyny. Przykładem może być chalcon, który redukował MIC do tego stopnia, że był on porównywalny z wartością MIC dla mutantów *S. aureus* niemających białka NorA. Innymi fenolowymi metabolitami są estry kwasu galusowego. EGCG (galusan epigallokatechiny) wzmacnia działanie tetracykliny u szczepów *S. aureus* mających białka TetK. Badania meksykańskich gatunków „Morning Glory” doprowadziły do izolacji trzech oligosacharydów (orizabin XIX, XV i IX), które wzmacniają aktywność norfloksacyliny względem szczepów *S. aureus* charakteryzujących się zwiększoną ekspresją transporterów NorA. Kolejnym inhibitorem transporterów lekowych jest piperyna, alkaloid roślinny wyizolowany m.in. z pieprzu czarnego. Badania wykazały, że związek ten zwiększa akumulację ciprofloksacyliny i powoduje 2-krotny spadek MIC dla tego chemioterapeutyku. Aktywność białek transportujących leki hamuje również baikaleina. Jest to flawonoid wyizolowany z liści *Thymus vulgaris*. Wykazuje silne działanie zwiększające koncentrację tetracykliny oraz niektórych β -laktamów (ampicyliny i oksacyliny) w komórce szczepów *S. aureus* opornych na metycylinę [50].

Badania dotyczące mechanizmów usuwania leków występujących u bakterii Gram-ujemnych doprowadziły do odkrycia i produkcji środków wpływających hamująco na transportery lekowe. Dużą rodzinę inhibitorów białek eksportujących leki stanowią peptydomimetyki. Pierwszym zidentyfikowanym środkiem hamującym transportery lekowe był PA β N (fenyloalanylo-arginylo-naftyloamid), inaczej zwany MC-207,110. Związek ten zwiększa przepuszczalność lewofloksacyliny u różnych szczepów *P. aeruginosa*, ale również może wzmacniać działanie innych antybiotyków, takich jak chloramfenikol czy makrolidy. PA β N pasuje do profilu substratowego systemów wyrzutu leków i współzawodniczy z antybiotykiem o miejsce wiązania leku. Dużym problemem w przypadku użycia tego inhibitora w terapii antybakteryjnej jest jego znaczna toksyczność. Jest jednak używany w laboratoriach do badań nad inhibicją transporterów lekowych. Kolejną klasą związków hamujących systemy usuwania leków są pochodne chinolonów. Badania wykazały, że związki te wzmagają działanie antybiotyków należących do różnych rodzin, poprzez zwiększenie ich akumulacji w komórce. Pochodne chinolonów są aktywne względem transporterów wielolekowych obecnych u *E.*

aerogenes i *K. pneumoniae*. Oba gatunki, po zastosowaniu tych inhibitorów, stawały się wrażliwe na chloramfenikol, tetracyklinę i norfloksacynę, nie wykazano jednak działania przeciwko systemowi MexAB-OprM występującego u *P. aeruginosa*. Mimo dokładnie zbadanej aktywności pochodnych chinolonów przeciwko transporterom wielolekowym, wciąż trwają badania związane z toksycznością tych środków. Innym inhibitorem transporterów wielolekowych jest arylopiperydyna, która wspomaga akumulację linezolidu w komórce *E. coli*. Z kolei inhibitory należące do rodziny arylopiperazyn hamują działanie transporterów RND. Przykładem jest NMP (N-metylopirolidon), który zwiększa wewnątrzkomórkową koncentrację różnych związków antybakteryjnych, m.in.: fluorochinolonów, chloramfenikolu i linezolidu. Jest on aktywny wobec transporterów lekowych występujących u *Acinetobacter baumannii*, rodziny *Enterobacteriaceae* (z wyjątkiem rodzaju *Serratia* spp.), jednak nie obserwowano aktywności wobec transporterów *P. aeruginosa*. Związki należące do rodziny arylopiperydyn i arylopiperazyn są jednak zbyt toksyczne, aby stosować je w leczeniu ludzi i zwierząt [33].

Mimo istnienia tak wielu związków działających hamująco na systemy wyrzutu leków, żaden z nich nie został wprowadzony do użycia w medycynie i weterynarii. Ze względu na potencjalne lub realne zagrożenie tych środków dla zdrowia konieczne jest przeprowadzenie jeszcze wielu badań dotyczących toksyczności inhibitorów bakteryjnych transporterów lekowych.

8. TRANSPORTERY WIELOLEKOWE U GRZYBÓW

Oporność wielolekowa drobnoustrojów stanowi poważny problem kliniczny. Zarówno bakterie, jak i grzyby wykorzystują różne mechanizmy obrony przed antybiotykami i fungicydami. U grzybów głównym mechanizmem oporności jest aktywny eksport leków z komórki za pomocą białek transportujących znajdujących się w błonie komórkowej. Badania przeprowadzone na drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* wykazały, że za wyrzut leków z komórek grzybów odpowiadają głównie białka należące do rodziny ABC.

8.1. Transportery ABC występujące u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Całkowita sekwencja genomu *S. cerevisiae* została opublikowana w 1996 roku [13]. Drożdże piekarnicze były pierwszym organizmem eukariotycznym, dla którego wykonano analizę sekwencji genomu w celu wyszukania genów wszystkich potencjalnych transporterów ABC. Wykazano istnienie 30 potencjalnych genów transporterów ABC. Wśród wyszukanych białek znalazły się 22 transportery ABC mające domeny NBD i MSD i 8 białek mających tylko sekwencje NBD. Wśród drożdżowych transporterów wyróżniono 5 podrodziny: PDR, MDR, ALDP, MRP/CFTR, YEF3 i RLI [3,9,34]. Białka ABC u drożdży są zlokalizowane w błonach komórkowej, wakuoli, mitochondriów, peroksysomów i cytoplazmie.

Białka odpowiedzialne za wielolekooporność należą do podrodziny PDR (pleiotropic drug resistance). Wszystkie białka tej podrodziny to klasyczne pełne transportery zbudowane z dwóch domen NBD i TMD, umiejscowione w błonie komórkowej. Odpowiedzialne są za katalizowanie

zależnego od ATP transportu związków z cytoplazmy na zewnątrz komórki. Zaliczane do niej transportery Pdr5p i Snq2p należą do najlepiej poznanych spośród białek ABC. Pdr5p i Snq2p to białka lokalizujące się w błonie komórkowej drożdży, mające szeroki zakres substratowy, obejmujący antybiotyki, fungicydy, detergenty, jonofory i leki przeciwnowotworowe [45]. Gen *PDR5* nie jest niezbędny do życia komórki, jego delecja powoduje jednak hiperwrażliwość komórek na wiele inhibitorów. Wyniki badań wskazują, że Pdr5p jest głównym mediatorem oporności komórek drożdży na azole, powszechnie stosowane środki grzybobójcze. Wśród substratów Pdr5p znalazły się również leki przeciwnowotworowe i ludzkie hormony steroidowe. Szczepy z usuniętym genem *PDR5* są więc wykorzystywane w projektach dotyczących badań toksycznego działania związków na komórki drożdży [10,22]. Bliskim homologiem *PDR5* jest należący do tej samej podrodziny gen *SNQ2* (sensitivity to 4nitroquinoline oxide). Początkowo błonowe białko Snq2p zostało scharakteryzowane jako nadające komórkom oporność na N-tlenek 4-nitrochinoliny (4NQO) w późniejszych badaniach wykazano, że usunięcie genu *SNQ2* powoduje hiperwrażliwość komórek drożdży na kilkadziesiąt różnych inhibitorów [11, 21].

Z wielolekową opornością komórek związane jest również białko Pdr12p. Transporter Pdr12p zidentyfikowano jako nadający komórkom oporność na słabe kwasy organiczne. Pdr12p jest umiejscowiony w błonie komórkowej i katalizuje zależny od ATP transport anionów karboksylowych na zewnątrz komórki. Wykazano, że substratami pompy Pdr12p są związki stosowane jako konserwanty żywności (np. kwas benzoowy, kwas sorbowy, kwas propionowy), jak i C1-C7 słabe kwasy organiczne powstające w czasie metabolizmu komórki [18,41]. Najbliższym homologiem głównego mediatora wielorakiej oporności komórki białka Pdr5p jest białko Pdr15p. Transporter Pdr15p nadaje komórkom oporność na chloramfenikol i eter laurylowy polioksyetyleny, które są również substratami Pdr5p [54]. Do podrodziny MDR należy m.in. umiejscowione w błonie komórki białko: Ste6p, odpowiedzialne za eksport czynnika a feromonu płciowego. Był to pierwszy odkryty transporter błonowy u drożdży *S. cerevisiae*. Komórki pozbawione genu *STE6* stają się sterylne [29]. Pozostałe białka należące do podrodziny MDR to zlokalizowane w błonie mitochondrialnej Atm1p, Mdl1p i Mdl2p powiązane z usuwaniem z mitochondriów źle sfałdowanych białek [17,19].

W podrodzynie MRP/CFTR zgrupowane są białka, takie jak: Ycf1p, Bat1p i Bpt1p, Vmr1p, Nft1p i Yor1p. Białka tej rodziny są zlokalizowane w błonie wakuoli, jedynym wyjątkiem jest Yor1p zlokalizowany w błonie komórkowej i są odpowiedzialne za detoksyfikację cytoplazmy poprzez aktywny transport inhibitorów do wakuoli. Ycf1p został scharakteryzowany jako wakuolarny czynnik oporności na metale np. kadm, rtęć, ołów, arsen [27,28]. Białko Bpt1 bierze również udział w detoksyfikacji bilirubiny i kadmu [39, 48]. Vmr1p jest zdolny do transportu wielu różnych inhibitorów w tym np. rodaminy6G, kadmu i rtęci. Wykazano, że substraty białek Ycf1p, Bpt1p i Vmr1p są transportowane głównie w postaci koniugatów glutationu rzadziej w postaci nieskoniugowanej [53]. Białko Bat1p bierze udział w transporcie kwasów żółciowych [37]. Yor1p został scharakteryzowany jako transporter wielolekowy. Mutacje inaktywujące gen *YORI* powodowały wrażliwość

m.in. na oligomycynę i leki anionowe. Najnowsze dane wskazują również na udział Yor1p w detoksyfikacji kadmu [8,35]. Nie poznano jeszcze funkcji wszystkich transporterów. Pdr11 i Aus1 związane są z pobieraniem steroidu, a także mają wpływ na wzrost komórek w warunkach beztlenowych.

Tak różnorodny charakter transportowanych przez białka ABC związków sugeruje różne możliwe mechanizmy transportu. Nie udało się jeszcze dokładnie scharakteryzować w jaki sposób białka ABC przenoszą związki przez błony. Zaproponowano trzy modele transportu: klasycznej pompy, flipazy i wakuolarnego odkurzacza [2,15,49]. Zgodnie z modelem klasycznej pompy związki przenoszone są z cytoplazmy bezpośrednio przez kanał centralny tworzony w błonie przez białko (np. Pdr12p). Większość substratów przenoszonych przez transportery ABC ma jednak charakter hydrofobowy, wydaje się więc prawdopodobne, że są one wyłapywane bezpośrednio w błonie i usuwane na zewnątrz w systemie molekularnego odkurzacza lub poprzez aktywność flipazową ABC (np. Pdr5p) w ruchu flip-flop. W każdym z tych modeli wykorzystywana jest energia uzyskana z rozkładu dwóch cząsteczek ATP. Uważa się, że przyłączenie substratu do domen TMD zwiększa powinowactwo białek do ATP, natomiast związanie ATP wymusza zmianę konformacji białka umożliwiającą przechnięcie substratu na drugą stronę błony [2].

Pompy ABC zidentyfikowano również u innych grzybów, w tym u patogennych *Candida albicans*. Wykazano, że substratami białka Cdr1p, najlepiej scharakteryzowanego transportera ABC u *C. albicans*, są m.in. cykloheksymid, flukonazol, ketokonazol, itraconazol i oligomycyna, hormony steroidowe, chloramfenikol. Białko Cdr1p z powodzeniem ekspresjonowano w *S. cerevisiae* [52].

8.2. Transportery MF występujące u *S. cerevisiae*

Wielolekooporność nie jest związana jedynie z działaniem transporterów ABC. Badania wykazały, że u drożdży występują również białka należące do rodziny pomp protonowych MF. Transportery te potrzebują do transportu energię czerpią z gradientu protonów po obu stronach błony. Białka te nie mają domen NBD. Ze względu na liczbę transbłonowych domen TMD dzielimy je na 12- i 14-transbłonowe. Białka MF transportują chemioterapeutyki, ale również katalizują transport substancji endogennych, takich jak intermediały cyklu Krebsa czy oligosacharydy [38,46,47].

Najlepiej poznane MF transportery to: Atr1p – nadający komórce oporność na aminotriazol, Sge1p – związany z opornością na kationowe barwniki, Hxt9p – transporter heksoz oraz białko Tpo1p będące wakuolarnym transporterem poliaminowym [12,36].

W przypadku *Candida albicans* najlepiej poznany transporterem MF jest Ca MDR1(BEN) odpowiedzialny za nadawanie komórkom oporności na benomyl, metotretksat i azole. Nadekspresja *FLU1* przyczynia się do oporności komórek *C. albicans* na flukonazol i kwas mukofenolowy [6,16]. Podobnie jak w bakteryjnych systemach usuwania leków, transportery drożdżowe również mają swoją fizjologiczną rolę niezwiązaną z eksportem leków. Ich naturalne funkcje polegają na dwukierunkowym transporcie

hydrofobowych substratów egzogennych, takich jak jony metali, peptydy, lipidy, cholesterol czy witaminy oraz endogennych steroidów, cytokin czy bilirubiny [45].

8.3. Regulacja ekspresji białek PDR u drożdży

Systemy usuwania leków typu PDR (pleiotropic drug resistance) tworzą sieć genów obejmującą geny kodujące białka transporterów błonowych oraz geny *PDR1* i *PDR3*. Geny *PDR1* i *PDR3* kodują czynniki transkrypcyjne regulujące ekspresję transporterów PDR. Dominujące mutacje spontaniczne, które aktywują transkrypcję genów *PDR1* lub *PDR3* powodują powstawanie fenotypu wielolekooporności poprzez aktywny transport leków z komórki lub modyfikacje biernej dyfuzji leków do komórki przez zmianę składu lipidów błony komórkowej [20]. Pdr1p i Pdr3p należą do rodziny czynników transkrypcji GAL4. Cechą charakterystyczną tej rodziny jest motyw Zn2Cys6 wiążący DNA. Pdr1p i Pdr3p przyłączają się do sekwencji PDRE (Pdr1p/Pdr3p response element) obecnej w promotorach genów docelowych. Aktywuje to transkrypcję genów kodujących transportery PDR. Mimo wielu podobieństw w budowie i ogólnej funkcji, białka Pdr1p i Pdr3p rozpoznają i aktywują różne geny. Struktura obu czynników transkrypcji jest podobna. Oba mają domenę z palcem cynkowym wiążącą DNA, znajdującą się na N-końcu. W centrum obu białek znajduje się osiem motywów hydrofobowych (MI-MVIII). Białko Pdr1p ma dwa regiony aktywujące (AR). ARI znajduje się przy N-końcu, natomiast bardziej znaczący ARII jest umiejscowiony przy C-końcu. Pdr3p ma jeden region aktywujący [20]. Czynniki Pdr1p i Pdr3p regulują transkrypcję wielu genów związanych z opornością na inhibitory. Są to m.in. geny kodujące białka błonowe ABC (Pdr5p, Pdr10p, Pdr15p, Snq2p, Yor1p), geny

kodujące transportery należące do rodziny MF (Hxt9p, Hxt11p), gen *IPT1/D4405*, którego produkt wpływa na biosyntezę sfingolipidów, gen *PDR16* kodujący białko mające wpływ na skład fosfolipidów i steroli w błonie komórkowej, *TPO1* kodujący wakuolarny transporter poliamidy, permeazy *HXT2*, *RTA1*, *YOR049c* oraz geny kodujące białka zaangażowane w metabolizm lipidów i ściany komórkowej. Białka Pdr1p i Pdr3p wpływają również na zahamowanie ekspresji niektórych białek, np. Pdr12p będącego transporterem typu ABC, odpowiedzialnym za oporność na sorbiny, benzoesan i octan [20]. Transportery PDR są również regulowane przez wiele innych czynników. Badania wykazały, że w kontrolę transkrypcji genów kodujących białka transporterowe zaangażowany jest czynnik yAP-1. Białka podlegające kontroli czynnika yAP-1 zapewniają drożdżom oporność m.in. na kadm, cykloheksymid oraz wiele innych toksycznych związków [1].

9. PODSUMOWANIE

Oporność wielolekowa coraz częściej pojawiająca się wśród bakterii i grzybów stała się poważnym problemem w leczeniu zakażeń. Jednym z szeroko rozpowszechnionych mechanizmów oporności są systemy aktywnego usuwania leków z komórek. Białka te pozwalają bakteriom i grzybom przeżyć w środowisku zawierającym toksyczne dla nich substancje, natomiast występowanie wielu czynników regulujących ich ekspresję zapewnia prawidłowe funkcjonowanie transporterów lekowych. Znane są substancje hamujące działanie systemów wyrzutu leków jednak wciąż wymagają zbadania pod kątem toksyczności. Poznanie dokładnego działania transporterów oraz ewentualnych możliwości inhibicji ich działania stanowi krok w kierunku pokonania infekcji wywoływanych przez wielolekooporne szczepy.

PIŚMIENICTWO

- [1] Alarco A., Balan I., Talibi D., Mainville N., Raymond M.: API-mediated multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae* requires FLR1 encoding a transporter of the major facilitator superfamily. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 19304–19313
- [2] Ambudkar S.V., Kim I.W., Sauna Z.E.: The power of the pump: mechanism of action of P-glycoprotein (ABCB1). *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2006; 27: 392–400
- [3] Bauer B.E., Wolfger H., Kuchler K.: Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1999; 1461: 217–236
- [4] Borges-Walmsley M.I., McKeegan K.S., Walmsley A.R.: Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochem. J.*, 2003; 376: 313–338
- [5] Borges-Walmsley M.I., Walmsley A.R.: The structure and function of drug pumps. *Trends Microbiol.*, 2001; 9: 71–79
- [6] Calabrese D., Bille J., Sanglard D.: A novel multidrug efflux transporter gene of the major facilitator superfamily from *Candida albicans* (*FLU1*) conferring resistance to fluconazole. *Microbiology*, 2000; 146: 2743–2745
- [7] Chen Y.J., Pornillos O., Lieu S., Ma C., Chen A.P., Chang G.: X-ray structure of EmrE supports dual topology model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 18999–19004
- [8] Cui Z., Hirata E., Tauchiya H., Osada H., Miyakawa T.: The multidrug resistance associated protein (MRP) subfamily (YRS1/Yor1) of *S. cerevisiae* is important for the tolerance to a broad range of organic anions. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 14712–14716
- [9] Decottignies A., Goffeau A.: Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat. Gen.*, 1997; 15: 137–145
- [10] Decottignies A., Kolaczowski M., Balzi E., Goffeau A.: Solubilization and characterization of the overexpressed *PDR5* multidrug resistance nucleotide triphosphatase of yeast. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 12797–12803
- [11] Decottignies A., Lambert L., Catty P., Degand H., Epping E.A., Moye-Rowley W.S., Balzi E., Goffeau A.: Identification and characterization of *SNQ2*, a new multidrug ATP-binding cassette transporter of the yeast plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 18150–18157
- [12] Ehrenhofer-Murray A.E., Seitz K., Sengstag C.: The Sge1 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is a membrane associated multidrug transporter. *Yeast*, 1998; 14: 49–65
- [13] Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S.G.: Life with 6000 genes. *Science*, 1996; 274: 546–567
- [14] Hieter P., Bassett D.E.Jr, Valle D.: The yeast genome: the common currency. *Nat. Genet.*, 1996; 13: 253–255
- [15] Higgins C.F., Gottesman M.M.: Is the multidrug transporter a flipase? *Trends Biochem. Sci.*, 1992; 17: 18–21
- [16] Hiller D., Sanglard D., Morschhauser J.: Overexpression of MDR1 gene is sufficient to confer increased resistance to toxic compounds in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006; 50: 1365–1371
- [17] Hofacker M., Gompf S., Zutz A., Presenti C., Haase W., van der Does C., Model K., Tampe R.: Structural and functional fingerprint of the mitochondrial ATP-binding cassette transporter Mdl1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 3951–3961
- [18] Holyoak C.D., Bracey D., Piper P.W., Kuchler K., Coote P.J.: The *Saccharomyces cerevisiae* weak-acid-inducible ABC transporter Pdr12 transports fluorescein and preservative anions from the cytosol by an energy-dependent mechanism. *J. Bacteriol.*, 1999; 181: 4644–4652
- [19] Kispaal G., Csere P., Guiard B., Lill R.: The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis. *FEBS Lett.*, 1997; 418: 346–350
- [20] Kolaczowska A., Goffeau A.: Regulation of pleiotropic drug resistance in yeast. *Drug Resist. Updat.*, 1999; 2: 403–414

- [21] Kolaczowska A., Kolaczowski M., Goffeau A., Moye-Rowley S.: Compensatory activation of the multidrug transporter Pdr5p, Snq2p, and Yor1p, by Pdr1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 2008; 582: 977–983
- [22] Kolaczowski M., Van der Rest M., Cybularz Kolaczowska A., Soumillion J.P., Konings W.N., Goffeau A.: Anticancer drugs. Ionophoric peptides and steroids as substrates of the yeast multidrug transporter Pdr5p. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 31543–31548
- [23] Kumar A., Schweizer H.P.: Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2005; 57: 1486–1513
- [24] Laundry A.E.: Systemy MDR – istotny mechanizm oporności patogenów gram-ujemnych na antybiotyki i chemioterapeutyki. *Postępy Mikrobiol.*, 2008; 47: 415–422
- [25] Levy S.B.: Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1992; 36: 695–703
- [26] Li X.Z., Nikaido H.: Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, 2004; 64: 159–204
- [27] Li Z.S., Lu Y.P., Zhen R.G., Szczyпка M., Thiele D.J., Rea P.A.: A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 42–47
- [28] Li Z.S., Szczyпка M., Lu Y.P., Thiele D.J., Rea P.A.: The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 6509–6517
- [29] Loayza D., Tam A., Schmidt W.K., Michaelis S.: Ste6p mutants defective in exit from the endoplasmic reticulum (ER) reveal aspects of an ER quality control pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, 1998; 9: 2767–2784
- [30] Lomovskaya O., Zgurskaya H.I., Totrov M., Watkins W.J.: Waltzing transporters and 'the dance macabre' between humans and bacteria. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2007; 6: 56–65
- [31] Lubelski J., Konings W.N., Driessen A.J.: Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2007; 71: 463–476
- [32] Mahamoud A., Chevalier J., Alibert-Franco S., Kern W.V., Pagés J.M.: Antibiotic efflux pumps in gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2007; 59: 1223–1229
- [33] Markham P.N., Neyfakh A.A.: Efflux-mediated drug resistance in Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2001; 4: 509–514
- [34] Michaelis S., Berkower C.: Sequence comparison of yeast ATP-binding cassette proteins. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1995; 60: 291–307
- [35] Nagy Z., Montigny C., Leverrier P., Yeh S., Goffeau A., Garrigos M., Falson P.: Role of the yeast ABC transporter Yor1p in cadmium detoxification. *Biochimie*, 2006; 88: 1665–1671
- [36] Nourani A., Wesolowski-Louvel M., Delaveau T., Jacq C., Delahodde A.: Multiple-drug-resistance phenomenon in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of two hexose transporters. *Mol. Cell. Biol.*, 1997; 17: 5453–5460
- [37] Ortiz D.F., St-Pierre M.V., Abdulmessih A., Arias I.M.: A yeast ATP-binding cassette-type protein mediating ATP-dependent bile acid transport. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 15358–15365
- [38] Paulsen I.T., Brown M.H., Skurray R.A.: Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.*, 1996; 60: 575–608
- [39] Petrovic S., Pascolo L., Cupelli F., Ostrow J.D., Goffeau A., Tiribelli C., Bruschi C.V.: The product of Ycf1 and YLL015w (BPT1) cooperate for the ATP-dependent vacuolar transport of unconjugated bilirubin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2000; 16: 561–571
- [40] Piddock L.J.: Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2006; 19: 382–402
- [41] Piper P., Mahe Y., Thompson S., Pandjaitan R., Holyoak C., Egner R., Mulhnbauer M., Coote P., Kuchler K.: The pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. *EMBO J.*, 1998; 17: 4257–4265
- [42] Poole K.: Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2005; 56: 20–51
- [43] Poole K.: Efflux-mediated multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2004; 10: 12–26
- [44] Putman M., van Veen H.W., Konings W.N.: Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2000; 64: 672–693
- [45] Rogers B., Decottignies A., Kolaczowski M., Carvajal E., Balzi E., Goffeau A.: The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2001; 3: 207–214
- [46] Sá-Correia I., dos Santos S.C., Teixeira M.C., Cabrito T.R., Mira N.P.: Drug H⁺ antiporters in chemical stress response in yeast. *Trends Microbiol.*, 2009; 17: 22–31
- [47] Sa-Correia I., Tenreiro S.: The multidrug resistance transporters of the major facilitator superfamily, 6 years after disclosure of *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. *J. Biotechnol.*, 2002; 98: 215–226
- [48] Sharma K.G., Mason D.L., Liu G., Rea P.A., Bachhawat A.K., Michaelis S.: Localization, regulation, and substrate transport properties of Bpt1p, a *S. cerevisiae* MRP-type ABC transporter. *Eucaryot. Cell.*, 2002; 1: 391–400
- [49] Sharom F.J., Lugo M.R., Eckford P.D.: New insight into the drug binding, transport and lipid flippase activities of the p-glycoprotein multidrug transporter. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2005; 37: 481–487
- [50] Stavri M., Piddock L.J., Gibbons S.: Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2007; 59: 1247–1260
- [51] Van Bambeke F., Balzi E., Tulkens P.M.: Antibiotic efflux pumps. *Biochem. Pharmacol.*, 2000; 60: 457–470
- [52] Wakiec R., Prasad R., Morschauer J., Barchiesi F., Borowski E.: Voriconazole and multidrug resistance in *Candida albicans*. *Mycoses*, 2006; 50: 109–115
- [53] Wawrzycka D., Sobczak I., Bartosz G., Bocier T., Ułaszewski S., Goffeau A.: Vmr1p is a novel vacuolar multidrug resistance ABC transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, 2010; 10: 828–838
- [54] Wolfger H., Mammun Y.M., Kuchler K.: The yeast Pdr15p ATP-binding cassette (ABC) protein is a general stress response factor implicated in cellular detoxification. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 11593–11599
- [55] Zgurskaya H.I., Nikaido H.: Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol. Microbiol.*, 2000; 37: 219–225

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.