

BIAŁKOWE SYSTEMY EKSPORTU WARUNKUJĄCE OPORNOŚĆ BAKTERII NA ANTYBIOTYKI

MULTIDRUG RESISTANCE TRANSPORTER PROTEINS (EFFLUX SYSTEM) IN BACTERIA

Kinga KRYSTA, Sławomir SUŁOWICZ, Zofia PIOTROWSKA-SEGET

Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski
w Katowicach

Streszczenie: Odkrycie antybiotyków, a następnie ich zastosowanie w zwalczaniu infekcji bakteryjnych, pozwoliło na opanowanie wielu uciążliwych chorób. Jednakże nadużywanie i/lub niewłaściwe stosowanie tych związków doprowadziło do zwiększenia ich stężenia w środowisku i spowodowało powstanie presji selekcyjnej faworyzującej mikroorganizmy antybiotykooporne. Współczesna medycyna boryka się z problemem patogennych szczepów, często wykazujących oporność wielolekową, które wywołują infekcje praktycznie nieuleczalne za pomocą stosowanych terapii. Badania nad opornością wśród bakterii wykazały, że jednym z najważniejszych mechanizmów odpowiedzialnych za to zjawisko jest aktywny transport antybiotyków poza obręb komórki z wykorzystaniem białkowych systemów eksportu związanych z błoną komórkową. Na podstawie badań filogenetycznych wyróżniono pięć grup transporterów zaangażowanych w usuwanie związków przeciwbakteryjnych: SMR (*Small Multidrug Resistance*), MFS (*Major Facilitator Superfamily*), RND (*Resistance-Nodulation-Cell Division*), MATE (*Multidrug And Toxic Compound Extrusion*) oraz białka transportowe zawierające kasetę wiążącą ATP (*ATP-binding Cassette Superfamily*). Obecnie trwają intensywne prace nad poznaniem molekularnych mechanizmów działania tych białkowych transporterów. Wykorzystanie krystalografii rentgenowskiej umożliwiło poznanie struktury niektórych przedstawicieli omawianych białek, powstają również modele transportu substratu. Ponadto trwają poszukiwania nowych związków wykazujących zdolność blokowania eksportu antybiotyków. Zniszczenie bakteryjnej oporności na antybiotyki poprzez hamowanie systemów wyrzutu antybiotyków z komórki wydaje się być obiecującą strategią, która może mieć w przyszłości ogromne zastosowanie kliniczne.

Kluczowe słowa: antybiotykooporność, oporność wielolekowa, system eksportu, SMR, MFS, RND, MATE, transportery ABC.

Summary: The discovery and use of antibiotics to fight against bacterial infection have let to overrun many diseases. However overuse and/or incorrect use of the antibiotics increase the concentration of these compounds in the environment and create the selective pressure, which promotes antibiotic resistant microorganisms. Multidrug resistant pathogenic bacteria are a huge problem of the modern medical science because of the infections, which they cause, are almost incurable. Researches show that the one of the most important mechanism responsible for the multidrug resistance in bacteria is the active transport

(efflux system) of the antibiotics out of the cell. Bacterial drug efflux transporters are classified into the five groups: SMR (*Small Multidrug Resistance*), MFS (*Major Facilitator Superfamily*), RND (*Resistance-Nodulation-Cell Division*), MATE (*Multidrug And Toxic Compound Extrusion*) and ABC transporters (*ATP-binding Cassette Superfamily*). Currently scientists are working on recognition of molecular mechanisms of these transporters action, detection of their spatial structure and creation the model of drug transport. Additionally, new strategy of elimination of multidrug resistant bacteria focus on detecting of efflux pump inhibitors. It seems to be promising future strategy to control the bacterial diseases.

Key words: antibiotic resistance, multidrug resistance, efflux system, SMR, MFS, RND, MATE, ABC transporters.

WSTĘP

Seria odkryć naukowych, które miały miejsce pod koniec XIX i na początku XX wieku, przyniosła światu wiedzę na temat mikroorganizmów, rewolucjonizując ówczesną medycynę i dając ludzkości nowy oręż w walce z drobnoustrojami chorobotwórczymi. Nadeszła era antybiotyków, zdefiniowanych przez odkrywcę streptomycyny, laureata nagrody Nobla – Selmana Waksmana, jako naturalne związki syntetyzowane przez drobnoustroje, działające bakteriobójczo lub bakteriostatycznie już w niewielkich stężeniach. Pojęcie antybiotyku ewoluowało na przestrzeni lat w związku z poszerzaniem wiedzy na temat substancji antybakteryjnych. Obecnie za antybiotyki uważa się związki chemiczne pochodzenia naturalnego, ich półsyntetyczne pochodne oraz syntetyczne analogi wykazujące wybiórcze działanie na struktury i procesy biochemiczne, powodując hamowanie wzrostu lub podziału komórek [20].

Stosowanie antybiotyków na szeroką skalę znacznie zwiększyło ich stężenie w środowisku. W różnych niszach ekologicznych spotykane są mikroorganizmy charakteryzujące się wrodzoną bądź nabytą zdolnością do wzrostu w obecności antybiotyku, tzw. antybiotykoopornością. Jednak intensywne wykorzystywanie antybiotyków w oddziałach szpitalnych, czy też dodawanie do pasz w celu zwiększenia efektywności hodowli oraz w profilaktyce chorób zwierzęcych doprowadziło do powstania presji selekcyjnej, w wyniku czego obserwowany jest wzrost częstotliwości występowania szczepów opornych na jeden, jak i wiele antybiotyków. Coraz częściej odnotowuje się także infekcje bakteryjne, które są praktycznie nieuleczalne za pomocą antybiotykoterapii [7, 15].

Poznanie mechanizmów oporności bakterii na antybiotyki wydaje się być kluczem do znalezienia skutecznych sposobów walki z tym zjawiskiem. Obecnie trwają badania nad wieloma procesami związanymi z opornością. Jednym z budzących duże zainteresowanie jest system białkowych transporterów, które umożliwiają eksport antybiotyków poza komórkę bakterii. Wyniki eksperymentów świadczą, iż właśnie ten system odgrywa znaczącą rolę w oporności wielolekowej. Pojawia się zatem nadzieja, że dogłębne poznanie molekularnych podstaw działania białkowych systemów eksportu pozwoli na określenie inhibitorów blokujących ich aktywność i tym samym da możliwość wykorzystania nowej broni w walce z mikroorganizmami [28].

MECHANIZMY ANTYBIOTYKOOPORNOŚCI

Na podstawie wyników badań naukowych prowadzonych od połowy XX wieku zaproponowano liczne mechanizmy wyjaśniające oporność bakterii na antybiotyki. Obecnie uważa się, że bakterie uzyskują antybiotykooporność przez:

- aktywne usuwanie antybiotyku z komórki,
- modyfikacje enzymatyczne antybiotyku,
- modyfikacje składników komórki będących celem antybiotyku,
- nadekspresję enzymu inaktywowanego przez antybiotyk,
- zmianę przepuszczalności osłon komórkowych bakterii,
- wytworzenie alternatywnego szlaku metabolicznego,
- zwiększenie stężenia metabolitu, będącego antagonistą antybiotyku,
- obniżenie ilości bądź aktywności enzymu aktywującego prekursor antybiotyku,
- modyfikacje w systemach regulacyjnych nie dotyczących bezpośrednio mechanizmu działania antybiotyku,
- obniżenie zapotrzebowania na produkt hamowanego szlaku metabolicznego [2,7].

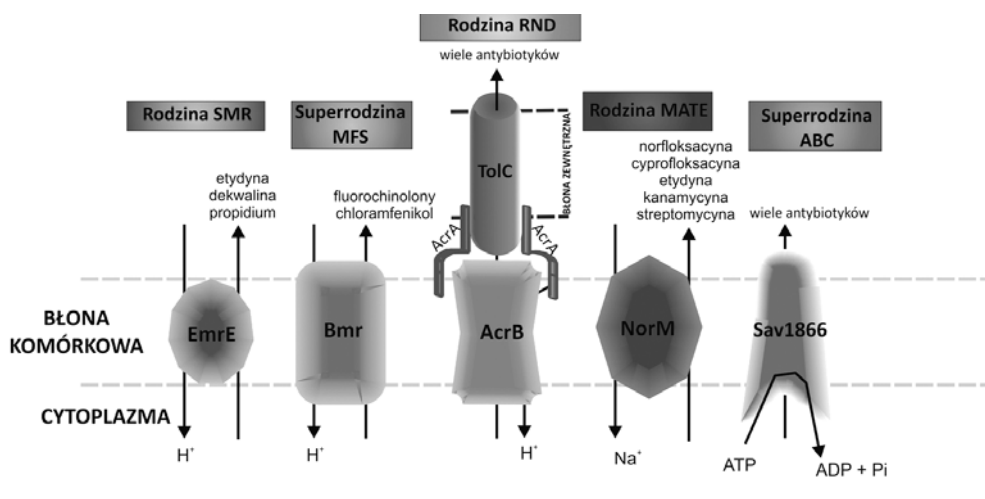
Należy jednak zaznaczyć, że jest to podział uproszczony, gdyż często za oporność określonego mikroorganizmu na konkretny lek odpowiada kilka mechanizmów. Do najważniejszych mechanizmów antybiotykooporności zalicza się system białek transportowych, umożliwiających eksport antybiotyku z komórki. Mechanizm ten umożliwia nabycie przez mikroorganizmy oporności na wiele leków. Zatem poznanie podstaw jego działania być może pozwoli na odnalezienie sposobu zwalczania szczepów cechujących się opornością wielolekową.

AKTYWNY TRANSPORT Z KOMÓRKI – OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA RODZIN I SUPERRODZIN BIAŁEK WARUNKUJĄCYCH ANTYBIOTYKOOPORNOŚĆ

Pompy wykazujące zdolność do eksportu pewnych substancji z wnętrza komórki spotykane są zarówno w komórkach prokariotycznych, jak i eukariotycznych, co świadczy o ich powstaniu jeszcze przed wyodrębnieniem się tych dwóch typów budowy komórki [28]. Często pierwotne funkcje białkowych eksporterów związane były z przystosowaniem się mikroorganizmów do określonych środowisk. Przykładowo system AcrAB bytującej w jelitach *Escherichia coli* eksportuje sole żółciowe i krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe [29]. Transportery są strukturami uczestniczącymi w naturalnych procesach metabolicznych, np. transporter MsbA wyizolowany z *Vibrio cholerae* oraz *Salmonella typhimurium* odpowiada za transport prekursora mureiny z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy fosfolipidowej błony komórkowej [40].

Białkowe transportery warunkujące antybiotykooporność u bakterii zaklasyfikowano do pięciu grup: dwóch superrodzin: MFS (*Major Facilitator Superfamily*) i białek transportowych zawierających kasetę wiążącą ATP (*ATP-binding Cassette*)

oraz trzech rodzin: SMR (*Small Multidrug Resistance*), MATE (*Multidrug And Toxic Compound Extrusion*) i RND (*Resistance-Nodulation-Cell Division*) (ryc.1). Pompy należące do rodziny RND występują jedynie u bakterii Gram-ujemnych, natomiast pozostałe wykryto zarówno u bakterii Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich [28].



RYCINA 1. Schematyczne porównanie białkowych systemów eksportu związanych z opornością bakterii na antybiotyki

FIGURE 1. Diagrammatic comparison of the multidrug resistance transporter proteins

Wspomniane superrodziny i rodziny transporterów to zaledwie kilka przykładów z licznej grupy białek transportujących. Na podstawie badań filogenetycznych i funkcji pełnionych przez poszczególne transportery stworzono zbiorczy system klasyfikacji błonowych białek transportujących uwzględniający transportery występujące w organizmach prokariotycznych, jak i eukariotycznych – TC system (*Transport Classification system*). Każde z białek opisane jest w tej klasyfikacji przez pięć następujących składowych:

- A (liczba) – odpowiada klasie, do której należy transporter;
- B (litera) – odpowiada podklasie, do której należy transporter;
- C (liczba) – odpowiada rodzinie, do której należy transporter;
- D (liczba) – odpowiada podrodzinie, do której należy transporter;
- E – odpowiada rodzajowi substratu, bądź grupie substratów dla transportera [34].

Transportery ABC – *ATP-binding Cassette* (TC#3.A.1) są jedynymi spośród bakteryjnych systemów eksportu, które usuwają antybiotyki z komórki na zasadzie pierwotnego transportu aktywnego, wykorzystując do tego energię hydrolizy ATP. Pozostałe omawiane rodziny SMR, RND, MATE i superrodzina MSF są zaliczane do przenośników wykorzystujących gradient elektrochemiczny, które przemieszczają substrat przez błonę na zasadzie wtórnego transportu aktywnego. Numery przypisane

TABELA 1. Klasyfikacja białek zaangażowanych w antybiotykooporność
 TABLE 1. Diagrammatic comparison of the multidrug resistance transporter proteins

TC#	KLASA	TC#	RODZINA / SUPERRODZINA
2.	Przenośniki wtórnego transportu aktywnego	2.A.1	Major Facilitator Superfamily (MFS)
		2.A.6	Resistance – Nodulation – Cell Division (RND)
		2.A.7.1	Small Multidrug Resistance (SMR)
		2.A.66.1	Multidrug And Toxic Compound Extrusion (MATE)
3.	Przenośniki pierwotnego transportu aktywnego	3.A.1	ATP-binding Cassette (ABC)

poszczególnym, charakteryzowanym w dalszych rozdziałach grupom białek transportujących zamieszczono w tabeli 1 [34].

RODZINA SMR

Najmniejsze transportery warunkujące antybiotykooporność, jakie do tej pory odkryto, należą do rodziny SMR (*Small Multidrug Resistance*). Są to integralne białka błony cytoplazmatycznej zbudowane ze 100–140 aminokwasów o masie cząsteczkowej ok. 12 kDa. Mają cztery transbłonowe helisy α z krótkimi lipofilnymi pętlami, które warunkują ich rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych. Omawiane transportery są antyporterami wykorzystującymi do transportu siłę protonomotoryczną. Nośniki te sprzęgają eksport cząsteczki z komórki z przemieszczeniem protonu do komórki. Białka SMR mają zdolność eksportu związków lipofilnych, takich jak: czwartorzędowe związki amonowe oraz niektóre antybiotyki, antyseptyki i detergenty. Geny kodujące te białka odkryto na wielu plazmidach warunkujących oporność na aminoglikozydy i β -laktamy [1].

W 2008 roku Bay i wsp. [1] zaproponowali zmodyfikowaną klasyfikację rodziny SMR. W jej obrębie wyróżnili trzy podrodziny: SMP (*small multidrug pumps*), SUG (*suppressor of groEL mutation proteins*) oraz PSMR (*paired small multidrug resistance proteins*). Transportery należące do SMP zgrupowano na podstawie mechanizmu działania, podobieństwa w budowie oraz filogenezy. Białka te warunkują wielolekową oporność u bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych oraz archeonów, a do jej uzyskania wystarczy ekspresja pojedynczego genu, np. u *Staphylococcus aureus* jest to gen *smr* [24]. Przypuszcza się, że strukturalnym pierwowzorem wszystkich białek należących do rodziny SMR, jest występujące u *E. coli* białko EmrE, warunkujące oporność na etydyne, propidium i dekwalinę [14, 38].

Białka SUG, w przeciwieństwie do białek SMP, nie mają zdolności do rozpoznawania czwartorzędowych związków amonowych i lipofilnych barwników, jednakże w warunkach dużego stężenia tych związków mogą one być transportowane przez białka SUG do komórki (np. białko SugE u *Citrobacter freundii*) [35]. Przykładem

białek należących do podrodziny PSMR są transportery YdgE i YdgF występujące u *E. coli*. Do uzyskania przez bakterie oporności na czwartorzędowe związki amonowe konieczna jest ekspresja pary genów kodujących białka PSMR. Do innych przedstawicieli podrodziny PSMR należą białka EbrA i EbrB występujące u *B. subtilis* [1].

Mechanizm przenoszenia substratów przez białka SMR wciąż nie jest do końca poznany. W literaturze funkcjonuje kilka modeli, w których jednostką funkcjonalną jest trimer, dimer lub monomer. Yerushalmi i Shuldiner (2000) [42] przyjęli, że jednostką funkcjonalną białka EmrE jest trimer. Dwie z trzech reszt Glu14 każdego z monomerów ulegają deprotonacji pod wpływem przyłączenia naładowanej dodatnio cząsteczki antybiotyku. Kationowa cząsteczka wiąże się do kieszonki uformowanej przez trimer i stabilizowanej przez ujemnie naładowaną resztę Glu14. Dochodzi do zmiany konformacyjnej kompleksu białkowego, która prowadzi do otwarcia kieszonki od strony peryplazmatycznej i jednoczesnego zamknięcia tej kieszonki od strony cytoplazmatycznej. Przedostanie się dwóch protonów z peryplazmy do miejsca wiązania substratu powoduje uwolnienie cząsteczki do peryplazmy i reprotonację kompleksu białkowego. Reprotonacja powoduje regenerację jednostki transportującej.

W innym modelu jednostką funkcjonalną jest dimer. Przyjęto, że miejsce aktywne wiążące określone substraty znajduje się pomiędzy dwoma monomerami EmrE. Utrata z tego miejsca dwóch protonów umożliwia związanie cząsteczki antybiotyku, co wywołuje zmiany konformacyjne białka transportującego umożliwiające ekspozycję substratu w kierunku przestrzeni peryplazmatycznej. Do w ten sposób utworzonej kieszonki docierają dwa protony, które powodują przemieszczenie cząsteczki antybiotyku do przestrzeni peryplazmatycznej oraz powrót do wyjściowej konformacji kompleksu białkowego [9, 30, 37].

Stworzono również model monomerycznej jednostki transportującej. Monomer EmrE uwalnia jeden proton, następnie dochodzi do przyłączenia substratu do reszty Glu14. Związana cząsteczka jest transportowana na stronę peryplazmatyczną. Z przestrzeni peryplazmatycznej proton dociera do miejsca wiązania i uwalnia substrat oraz powoduje zmianę stanu konformacji białka przenośnikowego. Według tego modelu może dochodzić do konkurencji o miejsce wiązania w jednostce transportującej między cząsteczką substratu a protonem [36].

SUPERRODZINA MFS

MFS (*Major Facilitator Superfamily*) to zróżnicowana, bardzo liczna (ponad tysiąc zsekwencjonowanych członków) i stara superrodzina białek transportujących. Należą do niej białka zbudowane z pojedynczych łańcuchów polipeptydowych zawierające 12 lub 14 transbłonowych regionów [19].

Trzy rodziny, będące antyporterami antybiotyków, zasługują na szczególne uwzględnienie: DHA1 (nazywana również DHA12), DHA2 (nazywana również DHA14) oraz DHA3. Pierwsza z wymienionych obejmuje białka mające 12

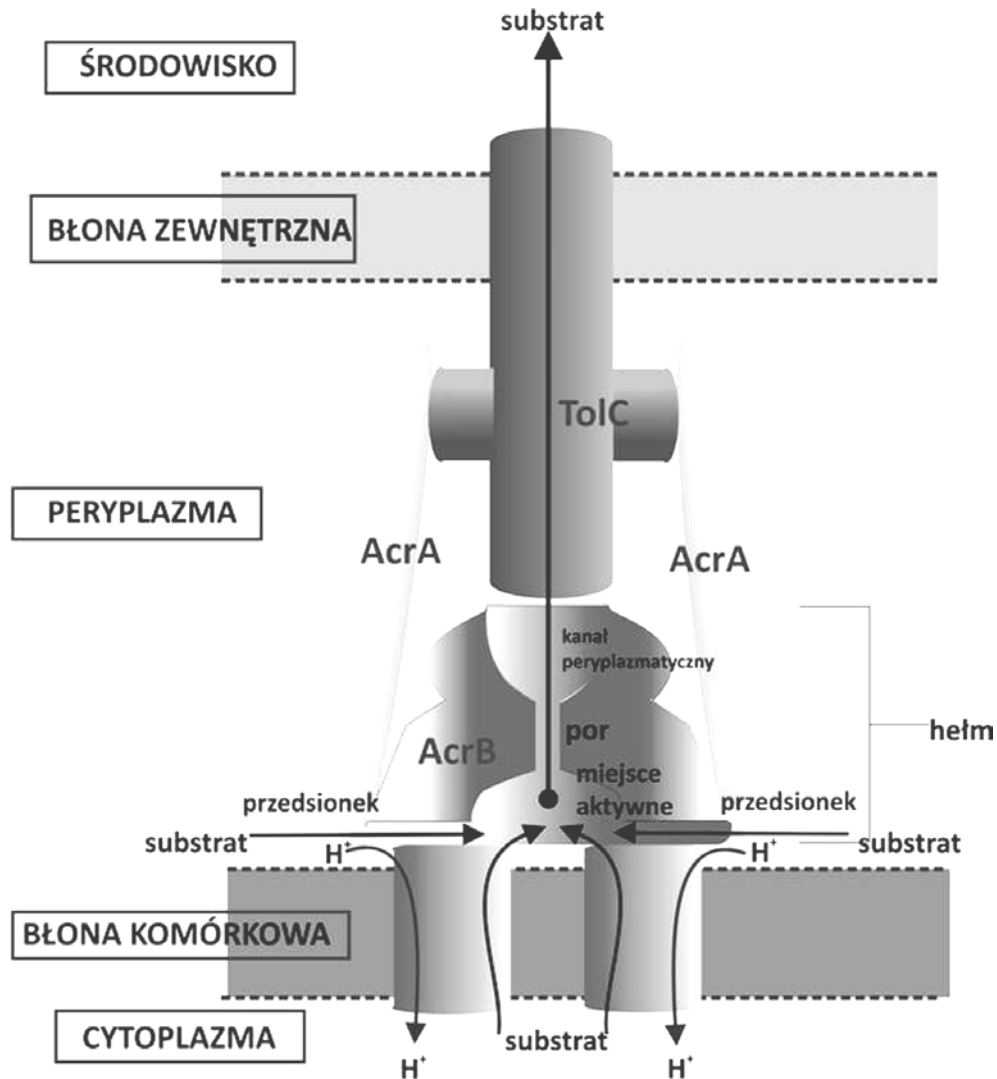
transbłonowych regionów, np. występujące u *Bacillus subtilis* białko Bmr. Wykazują one zdolność do eksportu zróżnicowanych substratów, np. poliamin, monoamin, cukrów, acetylocholin, tetracyklin, chloramfenikolu. Natomiast białka rodziny DHA2 mają 14 transbłonowych regionów i charakteryzują się większą specyficznością substratową. Oprócz antybiotyków transportują m.in. sole żółciowe i barwniki. Białka należące do rodzin DHA1 i DHA2 są spotykane zarówno u prokariotów, jak i u eukariotów, natomiast białka rodziny DHA3 (mające 12 transbłonowych regionów) zaobserwowano jedynie w komórkach prokariotycznych [15].

RODZINA RND

Białka z rodziny RND (*Resistance - Nodulation - Cell Division*) występują wyłącznie u bakterii Gram-ujemnych. Wechodzą one w skład trójskładnikowego systemu (także nazywanego RND) umożliwiającego eksport substancji z komórki bakterii Gram-ujemnej na zewnątrz błony zewnętrznej. System ten (ryc. 2) zbudowany jest z zakotwiczonego w błonie komórkowej białka transportującego RND (*resistance - nodulation - division protein*), peryplazmatycznego białka fuzyjnego MFP (*periplasmic membrane fusion protein*) oraz znajdującego się w błonie zewnętrznej kanału białkowego OMP (*outer-membrane protein*). Geny kodujące system RND zazwyczaj zorganizowane są w operonie. Jednym z lepiej poznanych systemów RND jest występujący u *E. coli* system zbudowany z należącego do rodziny RND białka transportującego AcrB, białka fuzyjnego AcrA i kanału białkowego TolC [28]. Warunkuje on oporność na szeroką gamę antybiotyków, chemioterapeutyków przeciwnowotworowych, antyseptyków, a także wielu innych związków toksycznych [23].

Funkcjonalna jednostka białka transportującego AcrB składa się z trzech monomerów, z których każdy ma 12 helis α przenikających przez błonę komórkową oraz dużej peryplazmatycznej domeny. W obrębie białka AcrB obecna jest specyficzna struktura – hełm (*headpiece*), która tworzy peryplazmatyczny kanał (*funnel*), umożliwiający kontakt AcrB z kanałem białkowym TolC, homotrimerem występującym w błonie wewnętrznej *E. coli*. Kanał ten obejmujący błonę zewnętrzną (monomery zbudowane z 4 segmentów tworzących beczułkę β) i peryplazmę jest otwarty od strony zewnątrzkomórkowej i zwęża się prawie do całkowitego zamknięcia od strony peryplazmatycznej [31].

Trzy helisy α AcrB formują otwór (*pore*) między dużą przestrzenią (*central cavity*) zlokalizowaną na dnie hełmu na wysokości peryplazmatycznej strony błony cytoplazmatycznej, która zawiera miejsce przyłączenia transportowanych substratów (miejsce aktywne), a peryplazmatycznym kanałem, przez który związki transportowane są do białka OMP (TolC) (ryc. 2). Od strony hełmu miejsce aktywne otoczone jest przez trzy struktury formowane przez każdy z monomerów budujących AcrB zwane przedsionkami (*vestibules*), które ułatwiają dostarczenie substratów do miejsca aktywnego. W regionie transbłonowym każdy monomer zbudowany jest z



RYCINA 2. Schematyczny układ białek należących do systemu RND
 FIGURE 2. Diagrammatic arrangement of proteins in RND system

12 transbłonowych helis α . Taka budowa wskazuje na transport substratu z cytoplazmy przez transbłonowy region oraz z peryplazmy przez przedzimek. Następnie substrat jest aktywnie transportowany przez otwór i kanał peryplazmatyczny do białka formującego kanał TolC w błonie zewnętrznej [28, 31].

Na przyłączenie cząsteczki do AcrB ma wpływ częściowe związanie ze składnikami dwuwarstwowej fosfolipidowej błony, które jest zależne od lipofilności molekuly i jej ładunku. Dalej dochodzi do dyfuzji cząsteczki przez błonę komórkową dzięki przedzimekowi AcrB. Substrat przyłącza się do miejsca aktywnego i stąd jest wypompowywany przy

wykorzystaniu gradientu protonów. Podejrzewa się, że dwie transbłonowe domeny TM4 oraz TM10 odgrywają kluczową rolę w transporcie protonów [28, 31].

W kompleksie z AcrB funkcjonuje białko AcrA zakotwiczone najczęściej za pomocą pojedynczej helisy w błonie cytoplazmatycznej. U *P. aeruginos* spotyka się homologiczną strukturę MexA, która tworzy pochwę wokół białka OMP [43]. Udowodniono, że obecność AcrB nie jest konieczna do umożliwienia interakcji między TolC a AcrA [11].

RODZINA MATE

Rodzina MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*), niedawno odkryta rodzina białek związanych z wielolekową opornością, początkowo wzbudzała wiele emocji. W 1998 roku Morita i wsp. [22] wykazali, że białko NorM wyizolowane z *Vibrio parahaemolyticus* to zbudowane z 456 aminokwasów białko transbłonowe zawierające 12 regionów hydrofobowych. Opisano, że białko NorM ma 12 regionów transbłonowych i należy do superrodziny MFS. Transformacja szczepów wrażliwych z wykorzystaniem genu *norM* wywołała oporność tych szczepów na norfloksacyne, cyprofloksacyne oraz strukturalnie odmienne etydyne, kanamycyne i streptomycyne. Wykazano również homologię białka NorM z pochodzącą od *E. coli* pompą YdhE [16].

Wkrótce Brown i wsp. (1999) [3] na podstawie analizy sekwencji genu *norM* zakwestionowali przynależność białka NorM do superrodziny MFS. Ze względu na brak podobieństwa sekwencji genu *norM* i *ydhE* do sekwencji genu kodującego jakiegokolwiek znane białko transportujące zaproponowali utworzenie nowej rodziny transporterów, którą nazwali MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*). Do rodziny tej należą białka chroniące komórkę przed antybiotykami oraz innymi toksycznymi związkami. W obrębie rodziny MATE utworzono odpowiednio trzy podrodziny: 1 – bakteryjne białka najczęściej odpowiedzialne za wielolekową oporność (NorM i homologi); 2 – podrodzina obejmująca białka eukariotyczne, np. występujące u drożdży białko Erc1; 3 – białka DinF występujące u *E. coli*, *S. pneumoniae* oraz ich homologi u eubakterii i archeonów [3, 16].

Morita i wsp. (2000) [21] wykazali, że NorM jest pierwszym poznanym bakteryjnym białkiem transportującym warunkującym oporność wielolekową, który do transportu wykorzystuje gradient jonów Na⁺ (Na⁺/antybiotyk antyporter). W 2002 roku Rouquette-Loughlin i wsp. [33] odkryli w genomie *Neisseria gonorrhoeae* i *N. meningitidis* gen kodujący białko homologiczne do NorM. Ze względu na podobieństwo nadano mu tę samą nazwę. Ekspresja genu *norM* powoduje oporność na takie związki, jak: bromek etydyny, chlorowodorek akryflawiny, berberyna czy metylowana pochodna elliptycyny. Cechą wspólną tych wszystkich substratów jest obecność ładunku dodatniego. Wykazano, że jest on niezbędny do rozpoznania fluorochinolonów przez pompę NorM u *N. gonorrhoeae*.

Bardzo niewiele informacji zdobyto na temat molekularnego mechanizmu działania systemów eksportu z rodziny MATE. NorM u *N. gonorrhoeae* podobnie jak NorM

u *V. parahaemolyticus* rozpoznaje dodatnio naładowane substraty. W związku z tym można wnioskować o obecności kwasowych reszt w łańcuchu polipeptydowym pompy. Analiza sekwencji aminokwasowej wykazała obecność dwóch ujemnie naładowanych reszt w regionie transbłonowym. Wymienione reszty mogą potencjalnie znajdować się w miejscu odpowiedzialnym za wiązanie substratu [18]. Badania nad NorM u *V. parahaemolyticus* wskazują, że trzy reszty Asp32, Glu251 i Asp367 są zaangażowane w eksport antybiotyków [26].

Homologiczne do NorM białko VcmA wyizolowano z *Vibrio cholerae*. Ma ono podobny profil specyficzności substratowej. Dodatkowym substratem dla VcmA jest m.in. streptomycyna, ciproflaksyna czy ofloksacyna [25].

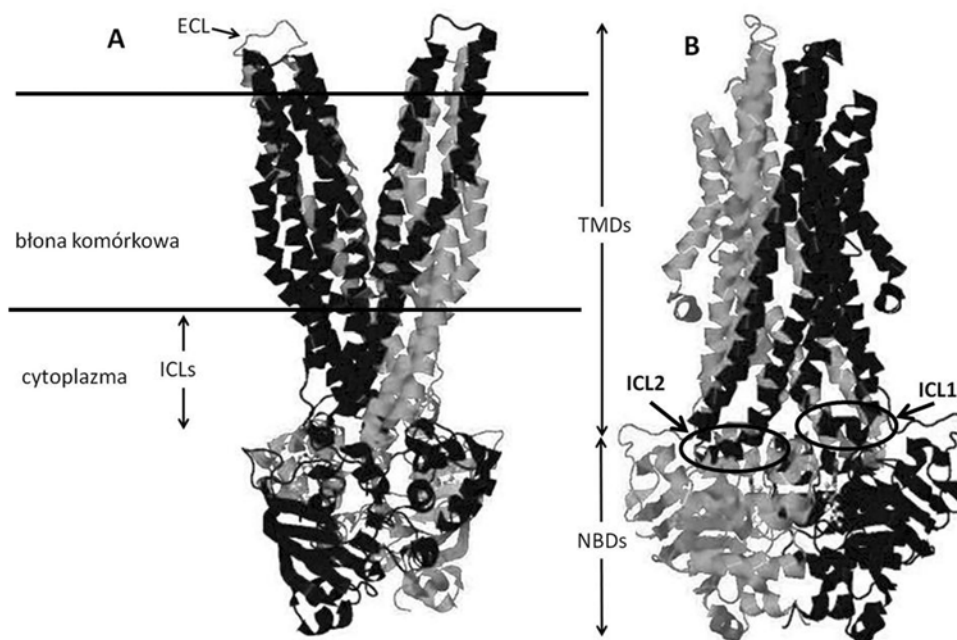
Kolejnym bakteryjnym antyporterem wykorzystującym gradient sodowy jest odkryte u *V. parahaemolyticus*, zbudowane z 447 aminokwasów i przypuszczalnie mające 12 transbłonowych domen białko VmrA (*vibrio's multidrug resistance*). Jednak ze względu na jego odrębność zaklasyfikowano go do trzeciej podrodziny – DinF [4, 25].

U *P. aeruginosa* wykryto transporter PmpM eksportujący chlorek benzalkonowy, fluorochinolony, bromek etydyny, akryflawinę oraz chlorek tetrafenylofosfonium. Jego unikatowość polega tym, iż jest napędzany nie sodowomotoryczną, a protonomotoryczną siłą. Ten fakt pozwala założyć, że inni członkowie omawianej rodziny do transportu substancji przez błonę mogą wykorzystywać również gradient protonów [12].

SUPERRODZINA TRANSPORTERÓW ABC

Białka należące do superrodziny transporterów ABC (*ATP-Binding Cassette*) jako jedyne z bakteryjnych białek transportowych eksportują antybiotyki z komórki na zasadzie pierwotnego transportu aktywnego, wykorzystując energię hydrolizy ATP. W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie tą grupą pomp, obecnych m.in. w ludzkich komórkach nowotworowych, z powodu ich udziału w oporności na chemioterapeutyki przeciwnowotworowe. Badania wskazują, że niektóre prokariotyczne transportery ABC wykazują duży stopień homologii z pompami występującymi w komórkach nowotworowych u ludzi. Poznanie mechanizmów działania tychże białek dałoby zatem nadzieję na znalezienie bardziej skutecznych sposobów walki z nowotworami [5].

Transporterem ABC wykazującym duże podobieństwo do pomp warunkujących lekooporność w ludzkich komórkach nowotworowych jest białko Sav1866 odkryte u *S. aureus*. W strukturze typowej dla transporterów ABC można wyróżnić cztery białkowe domeny: dwie domeny transbłonowe o charakterze hydrofobowym i dwie domeny hydrofilowe wiążące nukleotyd – NBD (*nucleotide-binding domain*). Domena transbłonowa i domena wiążąca nukleotyd łączą się tworząc monomer. Powstałe w ten sposób dwa monomery tworzą razem funkcjonalne białko transportowe (dimer), w którym domeny transbłonowe tworzą kanał translokacyjny dla substratu, natomiast domeny wiążące nukleotyd są odpowiedzialne za wiązanie i hydrolizę ATP (ryc. 3) [6, 13].



RYCINA 3. A: Budowa strukturalna pompy Sav1866 (monomery zaznaczono różnymi kolorami), B – obraz białka obrócony o 90°. Objaśnienie skrótów: TMDs – domeny transbłonowe; NBDs – domeny wiążące nukleotydy; ICLs – pętle wewnątrzkomórkowe; ECL – pętla zewnątrzkomórkowa, [5] zmienione
 FIGURE 3. Structure of the Sav 1866 efflux pump (monomers marked with different colours), B – efflux pump structure rotated by 90°. Abbreviations: TMDs – transmembrane domains; NBDs – nucleotide-binding domains; ICLs – intracellular loops; ECL – extracellular loop, [5] changed

Funkcjonalny dimer ma długość 120 Å, szerokość 65 Å i głębokość 55 Å. Każdy monomer ma N-końcową domenę transbłonową (zawierającą reszty aminokwasowe 1–320) i C-końcową domenę wiążącą nukleotydy (zawierającą reszty aminokwasowe 337–578). Wykazano, że monomery te są skręcone i wzajemnie się obejmują, co jest związane z oddziaływaniem dwóch typów domen. Natomiast utworzenie monomeru z domeny transbłonowej i domeny wiążącej nukleotydy umożliwia polipeptyd (zawierający reszty aminokwasowe 321–336) wywodzący się z domeny transbłonowej (z szóstej helisy transbłonowej), który owija dystalną stronę domeny wiążącej nukleotydy [5].

Każda z domen hydrofobowych ma sześć transbłonowych regionów, co daje dwanaście helis transbłonowych przypadających na jeden dimer, zgodnie z kanonem przyjętym dla transporterów ABC. W pobliżu środka błony komórkowej pęczek helis rozdziela się na dwa skrzydła zwrócone w kierunku zewnętrznej strony błony komórkowej. Każde skrzydło tworzy pierwsza i druga transbłonowa helisa jednego monomeru oraz cztery transbłonowe helisy TM3–TM6 z drugiego monomeru. Transbłonowe segmenty są połączone za pomocą długich wewnątrzkomórkowych lub krótkich zewnątrzkomórkowych pętli: ICLs (*intracellular loops*) i ECLs (*extracellular loops*). Pętle wewnątrzkomórkowe mają helikalną strukturę i wystają do cytoplazmy [5].

Zmiany konformacyjne wywoływane przyłączeniem i hydrolizą ATP są przenoszone od domen wiążących nukleotydy do domen transbłonowych przez oddziaływania niekowalencyjne na obszarze oddziaływania między tymi dwiema domenami. Elementami domen transbłonowych wchodzącym w skład obszaru oddziaływania są pierwsza i druga wewnątrzkomórkowa pętla (ICL1 i ICL2). Obie pętle zbudowane są z krótkich helis zorientowanych w przybliżeniu równolegle do płaszczyzny błony, co zwiększa powierzchnię kontaktu. Helisy te przechodząc przez błonę kontaktują się z domenami wiążącymi nukleotydy. Helisa pierwsza oddziałuje z domenami wiążącymi nukleotydy obu monomerów, natomiast helisa druga tylko z domeną wiążącą nukleotydy przeciwnego monomeru. W związku z takimi oddziaływaniami przypuszcza się, że omawiane helisy odgrywają istotną rolę w przekazywaniu zmian konformacyjnych, dlatego nazwano je helisami sprzęgającymi (*coupling helices*) [5].

Część domeny wiążącej nukleotydy odpowiedzialna za kontakt z domeną transbłonową jest głównie związana z resztami aminokwasowymi w obrębie tzw. pętli C. Dwa znaczące wyjątki dotyczą konserwatywnych reszt Tyr391 i Glu473. Ta ostatnia oddziałuje z obiema wewnątrzkomórkowymi pętlami domeny transbłonowej [5].

Mechanizm transportu substratu jest związany z dwoma stanami konformacyjnymi białka: stanem, w którym miejsce wiązania substratu jest dostępne od strony wewnątrzkomórkowej oraz stanem konformacyjnym, w którym miejsce wiązania substratu jest eksponowane w stronę środowiska zewnętrznego. Związanie ATP przez domeny wiążące nukleotydy powoduje przejście domen transbłonowych w konformację eksponującą substrat na zewnątrz, która umożliwia, w zależności od hydrofobowości cząsteczki, uwolnienie substratu do zewnętrznej warstwy fosfolipidowej błony lub do wodnego środowiska. Przypuszcza się, że hydroliza ATP pozwala na powrót transportera do wyjściowej konformacji. Ustalono, że jeżeli jednocześnie są transportowane dwie niewielkie cząsteczki, to stosunek stechiometryczny tej reakcji wynosi 1 cząsteczka ATP : 1 cząsteczka substratu. Natomiast przy usuwaniu jednej dużej cząsteczki ten sam stosunek wynosi 2 : 1 [5,6].

Badania nad ortologicznymi białkami MsbA pochodzącymi z *V. cholerae* oraz *S. typhimurium*, warunkującymi oporność na erytromycynę, wykazały istnienie podobnych stanów konformacyjnych do zaobserwowanych w pompie Sav1866 [40]. Ponadto porównanie trzech ortologicznych transporterów pochodzących z *E. coli*, *V. cholerae* i *S. typhimurium* wykazało, że białka domeny wiążącej nukleotydy, gdy nie są związane z nukleotydem, występują w dwóch konformacjach: otwartej w kierunku środowiska wewnątrzkomórkowego i zamkniętej od strony cytoplazmatycznej, co razem ze stanem konformacyjnym powstałym w odpowiedzi na związanie nukleotydu daje trzy możliwe stany konformacyjne [41].

Na podstawie dobrze poznanej struktury Sav1866 utworzono model transportera LmrA, pochodzącego z bakterii *Lactococcus lactis*. Wykazano bardzo duże podobieństwo między tymi białkami. Dwie znaczące różnice w budowie transportera LmrA są związane z 22-aminokwasowym przedłużeniem N-końca zlokalizowanego w cytozolu oraz krótszą o 11 aminokwasów pętlą zewnątrzkomórkową między

pierwszą i drugą helisą transmembranową. Pozostałe różnice dotyczą delecji lub insercji jednego lub dwóch aminokwasów w obrębie innych pętli [8].

Opisane białka Sav1866, MsbA i LmrA są homodimerami. Natomiast pierwszą pompą o strukturze heterodimeru, będącą członkiem superrodziny ABC, jest białko YheI/YheH pochodzące z *B. subtilis*. Jego aktywność jest indukowana obecnością wielu różnorodnych strukturalnie antybiotyków, takich jak: doksycylina, erytromycyna, linezolid oraz chloramfenikol [39].

W komórce *Streptomyces peucetius* funkcjonuje kompleks dwóch białek DrrA i DrrB chroniący te bakterie przed produkowanymi przez nie doksorubicyną oraz daunorubicyną (antybiotykami stosowanymi w terapiach przeciwnowotworowych). Pompa DrrAB należy do typowych przedstawicieli transporterów ABC, ale może wiązać ATP tylko w obecności białka DrrB. Białko to ma budowę nieco odmienną od budowy typowych transporterów ABC, gdyż w jego skład wchodzi osiem regionów transbłonowych, cztery pętle peryplazmatyczne i trzy cytoplazmatyczne [10]. Oba białka tworzą funkcjonalną pompę, brak jednego z nich znosi jej aktywność [32].

INHIBITORY SYSTEMÓW WYRZUTU ANTYBIOTYKÓW – PRZYSZŁOŚĆ WALKI Z ANTYBIOTYKOOPORNOŚCIĄ

System eksportu jest jednym z głównych mechanizmów oporności bakterii na antybiotyki. Możliwość poznania sposobu jego działania, a zwłaszcza oddziaływań z substratem – antybiotykiem, daje nadzieje na skonstruowanie takich związków hamujących, względem których transportery wykazywałyby większe powinowactwo niż do antybiotyków. Zablockowanie aktywności omawianych białek transportowych zwiększy wrażliwość szczepów opornych oraz przywróci aktywność antybiotyków obecnie nieskutecznych w terapiach. Ponadto ustalenie podobieństwa między substratami a związkami hamującymi pozwala na zaprojektowanie odpowiedniej struktury antybiotyków, które nie będą rozpoznawane przez białkowe transportery. Innym sposobem blokady systemu eksportu może być regulacja ekspresji genów kodujących te systemy [27].

W związku z trudnościami we wprowadzaniu do leczenia nowych antybiotyków, możliwość zastosowania związków hamujących działanie bakteryjnych systemów eksportu nabiera coraz większego znaczenia klinicznego. Co więcej, jeśli spośród stosowanych w terapii związków uda się wyodrębnić takie, które dodatkowo wykazują właściwości hamujące względem systemów transportujących, to dojdzie do minimalizacji ryzyka związanego z wystąpieniem nieprzewidzianej toksyczności nowo wprowadzonych substancji [17].

Szczególnym wyzwaniem jest hamowanie bardzo rozbudowanego systemu eksportu u bakterii Gram-ujemnych, gdyż u tej grupy mikroorganizmów często blokowanie jednego systemu kompensowane jest przez pozostałe działające w komórce systemy oporności [44]. Ponadto identyfikacja bakterii opornych na wiele leków za pomocą diagnostycznych testów wykorzystujących związki hamujące systemy eksportu umożliwi dobranie odpowiedniej terapii [27].

Bardzo ważną kwestią jest rozsądne określenie zasięgu blokady systemów eksportu. Przed wprowadzeniem związków hamujących działanie białek transportowych do terapii należy ustalić, czy powinno się blokować eksport wszystkich antybiotyków, czy też skierować blokadę przeciwko konkretnej grupie tych związków. Niewłaściwe wykorzystanie związków hamujących spowoduje ponowne powstanie presji selekcyjnej, faworyzującej mutanty odporne na nie [27]. Wtedy powtórzy się błąd, który wytrąci z rąk ludzkości kolejną broń w walce z mikroorganizmami.

PODSUMOWANIE

Białkowe systemy transportujące odgrywają zasadniczą rolę w oporności bakterii na antybiotyki. Z poznaniem molekularnych podstaw działania tych systemów wiąże się nadzieję na znalezienie sposobu zablokowania ich funkcjonowania. To z kolei pozwoliłoby na zwiększenie wrażliwości opornych patogenów, a nawet powrót do stosowania w terapiach obecnie już nieskutecznych antybiotyków. Wykazano również znaczną homologię między bakteryjnymi transporterami ABC a pompami w ludzkich komórkach nowotworowych niewrażliwych na chemioterapeutyki. Wiele wskazuje zatem, że umiejętność blokowania tego typu systemów eksportujących mogłaby znaleźć zastosowanie w terapiach przeciwnowotworowych.

Jednakże zakres obecnie posiadanej w tym zakresie wiedzy jest nadal niewystarczający, aby móc ją wykorzystać we współczesnej medycynie. Niezbędne są dalsze badania dotyczące zwalczania bakteryjnej antybiotykooporności. Istotne jest odnalezienie takich celów działania związków hamujących, które będą specyficzne tylko dla prokariotycznych systemów eksportu, dzięki temu możliwe będzie uniknięcie skutków ubocznych towarzyszących niespecyficznym terapiom związkami blokującymi działanie systemów wyrzutu u eukariontów.

LITERATURA

- [1] BAY DC, ROMMENS KL, TURNER RJ. Small multidrug resistance proteins: a multidrug transporter family that continues to grow. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1778**: 1814–1838.
- [2] BONOMO J, GILL RT. Antibiotic resistance as a model for strain engineering. *Comput Chem Eng* 2005; **29**: 509–517.
- [3] BROWN MH, PAULSEN IT, SKURRAY RA. The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Mol Microbiol* 1999; **31**(1): 393–395.
- [4] CHEN J, MORITA Y, HUDA MN, KUROMA T, MIZUSHIMA T, TSUCHIYA T. VmrA, a member of a novel class of Na⁺-coupled multidrug efflux pumps from *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* 2002; **184**(2): 572–576.
- [5] DAWSON RJP, LOCHER KL. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* 2006; **443**(14): 180–185.
- [6] DAWSON RJP, LOCHER KL. Structure of the multidrug ABC transporter Sav1866 from *Staphylococcus aureus* in complex with AMP-PNP. *FEBS Lett* 2007; **581**: 935–938.
- [7] DŽIDIĆ S, ŠUŠKOVIĆ J, KOS B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technol Biotech* 2008; **46** (1): 11–21.

- [8] FEDERICI L, WOEBKING B, VELAMAKANNI S, SHILLING RA, LUISI B, VAN VEEN HW. New structure model for the ATP-binding cassette multidrug transporter LmrA. *Biochem Pharmacol* 2007; **74**: 672–678.
- [9] FLEISHMAN SJ, HARRINGTON SE, ENOSHA, HALPERIN D, TATE CG, BEN-TAL N. Quasi-symmetry in the cryo-EM structure of EmrE provides the key to modeling its transmembrane domain. *J Mol Biol* 2006; **364**: 54–67.
- [10] GANDLUR SM, WEIL L, LEVINE J, RUSSELL J, KAUR P. Membrane topology of the DrrB protein of the doxorubicin transporter of *Streptomyces peucetius*. *J Biol Chem* 2004; **279**(26): 27799–27806.
- [11] GERKEN H, MISRA R. Genetic evidence for functional interactions between TolC and AcrA proteins of a major antibiotic efflux pump of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2004; **54**: 620–631.
- [12] HE GX, KURODA T, MIMA T, MORITA Y, MIZUSHIMA T, TSUCHIYA T. An H⁺-coupled multidrug efflux pump, PmpM, a member of the MATE family of transporters, from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2004; **186**(1): 262–265.
- [13] HOLLENSTEIN K, DAWSON RJP, LOCHER KP. Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr Opin Struct Biol* 2007; **17**: 412–418.
- [14] KORKHOV VM, TATE CG. Electron crystallography reveals plasticity within the drug binding site of the small multidrug transporter EmrE. *J Mol Biol* 2008; **377**: 1094–1103.
- [15] KUMARA A, SCHWEITZER HP. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliver Rev* 2005; **57**: 1486–1513.
- [16] KURODA T, TSUCHIYA T. Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1794**: 763–768.
- [17] LOMOVSKAYA O, BOSTIAN KA. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic – A vision for applied use. *Biochem Pharmacol* 2006; **71**: 910–918.
- [18] LONG F, ROUQUETTE-LOUGHLIN C, SHAFER WM, YU EW. Functional cloning and characterization of the multidrug efflux pumps NorM from *Neisseria gonorrhoeae* and YdhE from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**(9): 3052–3060.
- [19] LOPEZ-ERRASQUIN E, GONZALEZ-JAEN MT, CALLEJAS C, VAZQUEZ C. A novel MFS transporter encoding gene in *Fusarium verticillioides* probably involved in iron-siderophore transport. *Mycol Res* 2006; **110**: 1102–1110.
- [20] MARKIEWICZ Z, KWIATKOWSKI ZA. Bakterie, antybiotyki, lekooporność. Wydawnictwo Naukowe PWN 2006: 11–12.
- [21] MORITA Y, KATAOKA A, SHIOTA S, MIZUSHIMA T, TSUCHIYA T. NorM of *Vibrio parahaemolyticus* is an Na⁺-driven multidrug efflux pump. *J Bacteriol* 2000; **182**(23): 6694–6697.
- [22] MORITA Y, KODAMA K, SHIOTA S, MINE T, KATAOKA A, MIZUSHIMA T, TSUCHIYA T. NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**(7): 1778–1782.
- [23] MURAKAMI S. Multidrug efflux transporter, AcrB – the pumping mechanism. *Curr Opin Struct Biol* 2008; **18**: 459–465.
- [24] NOGUCHI N, NAKAMINAMI H, NISHIJIMA S, KUROKAWA I, SO H, SASATSU M. Antimicrobial agent of susceptibilities and antiseptic resistance gene distribution among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from patients with impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. *J Clin Microbiol* 2006; **44**(6): 2119–2125.
- [25] 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**(11): 587–593.
- [26] OTSUKA M, YASUDA M, MORITA Y, OTSUKA CH, TSUCHIYA T, OMOTE H, MORIYAMA Y. Identification of essential amino acid residues of the NorM Na⁺/multidrug antiporter in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* 2005; **187**(5): 1552–1558.
- [27] PAGES JM, MASI M, BARBE J. Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. *Trends Mol Med* 2005; **11**(8): 382–389.
- [28] PIDDOCK LJV. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2006; **19**(2): 382–402.
- [29] PIDDOCK LJV. Multidrug-resistance efflux pumps? not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* 2006; **4**: 629–636.
- [30] PORNILLOS O, YEN-JU CH, CHEN AP, CHANG G. X-ray Structure of the EmrE multidrug transporter in complex with a substrate. *Science* 2005; **310**: 1950–1953.

- [31] POS KM. Drug transport mechanism of the AcrB efflux pump. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1794**: 782–793.
- [32] PRADHAN P, LI W, KAUR P. Translational coupling controls expression and function of the DrrAB drug efflux pump. *J Mol Biol* 2009; **385**: 831–842.
- [33] ROUQUETTE-LOUGHLIN C, DUNHAM SA, KUHN M, BALTHAZAR JT, SHAFER WM. The NorM efflux pump of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* recognizes antimicrobial cationic compounds. *J Bacteriol* 2002; **185**(3): 1101–1106.
- [34] SAIER MH. A functional-phylogenetic classification system for trans-membrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol R* 2000; **64**(2): 354–411.
- [35] SIKORA CW, TURNER RJ. SMR proteins SugE and EmrE bind ligand with affinity and stoichiometry. *Biochem Biophys Res Co* 2005; **335**(1): 105–111.
- [36] SOSKINE M, ADAM Y, SCHULDINER S. Direct evidence for substrate-induced proton release in detergent-solubilized EmrE, a multidrug transporter. *J Biol Chem* 2004; **279**: 9951–9955.
- [37] TATE CG, UBARRETXENA-BELANDIA I, BALDWIN JM. Conformational changes in the multidrug transporter EmrE associated with substrate binding. *J Mol Biol* 2003; **332**: 229–242.
- [38] TATE CG. Comparison of three structures of the multidrug transporter EmrE. *Curr Opin Struct Biol* 2006; **16**: 457–464.
- [39] TORRES C, GALIÁN C, FREIBERG CH, FANTINO JR, JAULT JM. The Yhel/YheH heterodimer from *Bacillus subtilis* is a multidrug ABC transporter. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1788**(3): 615–622.
- [40] WARD A, MULLIGAN S, CARRAGHER B, CHANG G, RONALD A, MILLIGAN RA. Nucleotide dependent packing differences in helical crystals of the ABC transporter MsbA. *J Struct Biol* 2009; **165**: 169–175.
- [41] WARD A, REYES CHL, YU J, ROTH CHB, CHANG G. Flexibility in the ABC transporter MsbA: alternating access with a twist. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**(48): 19005–19010.
- [42] YERUSHALMI H, SCHULDINER S. A common binding site for substrates and protons in EmrE, an ion-coupled multidrug transporter. *FEBS Lett* 2000; **476**: 93–97.
- [43] ZGURSKAYA HI, YAMADA Y, TIKHONOVA EB, GE Q, KRISHNAMOORTHY G. Structural and functional diversity of bacterial membrane fusion proteins. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1794**: 794–807.
- [44] ZHANEL GG, HOBAN DJ, SCHUREK K, KARLOVSKY JA. Role of efflux mechanisms on fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* 2004; **24**: 529–535.

Redaktor prowadzący – L. Hryniewiecka

Otrzymano: 03.01. 2011 r.

Przyjęto: 10.03. 2011 r.

Sławomir Sułowicz

*Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski
ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice*

e-mail: slawomir.sulowicz@us.edu.pl