

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky a mikrobiologie



## **Efluxové systémy v antimikrobní rezistenci**

### ***Acinetobacter baumannii***

Bakalářská práce

**Lucie Kladivová**

**Školitel: Doc. RNDr. Alexandr Nemeč, PhD.**

Praha 2010

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Efluxové systémy v antimikrobní rezistenci *Acinetobacter baumannii* vypracovala samostatně s pomocí citované literatury a konzultací se školitelem.

Praha 2010

Lucie Kladivová

Děkuji školiteli Doc. RNDr. Alexandru Nemcovi, PhD. za cenné rady a pomoc při psaní bakalářské práce. Poděkování patří i mé rodině a příteli za podporu při studiu.

## **Abstrakt**

*Acinetobacter baumannii* je významný nemocniční patogen, který zahrnuje kmeny rezistentní k většině nebo i všem terapeuticky využitelným antibiotikům. Tato rezistence je výsledkem řady buněčných mechanismů, mezi nimiž hrají zásadní roli systémy aktivního efluxu antimikrobních látek. Tato práce podává přehled jednotlivých rodin efluxových systémů a jejich dosud známých zástupců u rodu *Acinetobacter*. Zaměřuje se na efluxový systém AdeABC náležející do rodiny RND (*resistance-nodulation-cell division family*). Tento systém je přítomen u většiny kmenů *A. baumannii* a tvoří jej tři strukturní proteiny, jež jsou regulovány dvousložkovým regulačním systémem. Nadprodukce AdeABC způsobuje rezistenci nebo snížení citlivosti k řadě antibiotik a je obvykle spojená s dalšími mechanismy rezistence.

## **Klíčová slova:**

Rezistence, efluxové systémy, *Acinetobacter baumannii*, RND, AdeABC

## **Abstract**

*Acinetobacter baumannii* is an important nosocomial pathogen which includes also strains resistant to majority or all therapeutically relevant drugs. This resistance is a result of the activities of many cellular mechanisms, among which systems of active efflux of antimicrobial agents play an important role. This study describes all main families of bacterial efflux systems and their known representatives described in the genus *Acinetobacter*. It focuses on the efflux system AdeABC belonging to the RND family (resistance-nodulation-cell division family). This system is present in the majority of *A. baumannii* strains and it is formed by three structural proteins regulated by a two-component system. Overexpression of AdeABC results in resistance or decreased susceptibility to many drugs and is usually associated with other resistance mechanisms.

## **Keywords:**

Resistance, efflux systems, *Acinetobacter baumannii*, RND, AdeABC

## Obsah:

Abstrakt .....	4
Klíčová slova.....	4
Abstract .....	5
Keywords .....	5
Obsah.....	6
Seznam použitých zkratk.....	7
Úvod.....	8
1 Antimikrobní rezistence.....	9
1.1 Obecné mechanismy antimikrobní rezistence.....	9
2 <i>Acinetobacter</i> .....	10
2.1 Taxonomie a populační genetik.....	10
2.2 Multirezistence .....	12
3 Efluxové systémy u rodu <i>Acinetobacter</i> .....	13
3.1 Rodina ABC .....	14
3.2 Rodina MATE .....	14
3.3 Rodina SMR .....	14
3.4 Rodina MFS.....	14
3.5 Rodina RND .....	15
3.5.1 AdeABC .....	16
3.5.1.1 Struktura AdeABC.....	16
3.5.1.2 Geny pro AdeABC.....	17
3.5.1.3 Regulace AdeABC.....	18
3.5.2 AdeDE.....	18
3.5.3 AdeFGH .....	19
3.5.4 AdeIJK .....	19
3.5.5 AdeXYZ.....	19
3.6 Další (přirozené) funkce efluxů.....	20
Závěr.....	21
Seznam použité literatury .....	22

## **Seznam použitých zkratk**

ABC – rodina efluxových systémů využívající energii uvolněnou při hydrolýze ATP (*ATP-binding cassette superfamily*)

Komplex ACB – komplex *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii*

IMP – protein vnitřní membrány (*inner membrane protein*)

MFP – fúzní membránový protein (*membrane fusion protein*)

MIK – minimální inhibiční koncentrace

OMP – protein vnější membrány (*outer membrane protein*)

RND – rodina efluxových systémů gramnegativních bakterií (*resistance-nodulation-cell division family*)

TMS – transmembránový segment (*transmembrane segment*)

## Úvod

Rezistence bakterií k antibiotikům je závažný problém současné medicíny, jehož význam se zvyšuje spolu s pokračujícím vývojem obranných mechanismů bakterií, šířením kmenů rezistentních k většině terapeuticky použitelných léků a omezeným spektrem nových látek s antimikrobním účinkem. Fenomén rezistence je výsledkem interakcí mezi bakteriálním patogenem s genetickou plasticitou získávat, vyvíjet a šířit mechanismy rezistence a selekčním tlakem plynoucím z plošného a často neuváženého používání velkého spektra antimikrobních látek. Přestože se s problémem antibiotické rezistence lze setkat u většiny významných lidských patogenů, existuje skupina bakterií, u nichž vývoj multirezistence vede k reálným obavám ze selhání konvenční antimikrobní terapie. Do této skupiny patří organizmy představující nebezpečí zejména pro pacienty v nemocniční péči: *Staphylococcus aureus* rezistentní k meticilinu (MRSA), enterokoky rezistentní ke glykopeptidům, některé druhy enterobakterií, zvláště *Klebsiella pneumoniae*, dále pak *Pseudomonas aeruginosa* a *Acinetobacter baumannii*. Poslední tři jmenované organizmy pak představují největší problém týkající se existence a šíření kmenů rezistentních ke všem dostupným lékům a velmi omezených možností ohledně nových antibiotik účinných na tyto kmeny. Antimikrobní multirezistence je výsledkem celé řady buněčných mechanismů, mezi nimiž hrají významnou roli systémy aktivního transportu (efluxu) antimikrobních látek vně bakteriální buňky. Předložená práce se zaměřuje na antimikrobní rezistenci bakterie *A. baumannii* způsobenou těmito systémy.



# 1 Antimikrobní rezistence

Pro antimikrobní rezistenci neexistuje jednotná definice a její hraniční hodnoty jsou předmětem pokračujících diskuzí. EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) vymezuje klinickou rezistenci jako stav, kdy infekce neodpovídá ani na maximální dávky antibiotika (ESCMID, 2000). Mikrobiologickou rezistenci pak definuje jako stav, kdy bakterie disponuje některým mechanismem rezistence projevujícím se na fenotypové úrovni. Rezistence se určuje vyšetřením citlivosti bakteriálního kmene na antimikrobní látky a vymezuje se obvykle podle zjištěné výše minimální inhibiční koncentrace (MIK), což je nejnižší koncentrace látky inhibující viditelný růst mikroorganismu po kultivaci ve vztahu k doporučeným hraničním hodnotám MIK pro daný bakteriální druh a antimikrobní látku.

## 1.1 Obecné mechanismy antimikrobní rezistence

Rezistence původně citlivých bakterií na antimikrobní látky vzniká v důsledku změn ve struktuře nebo expresi již existujících systémů nebo získáním preformovaných mechanismů rezistence genetickým horizontálním přenosem.

Lze rozlišit pět hlavních mechanismů, kterými bakterie získávají rezistenci na antimikrobní látky:

- Inaktivace antibiotika bakteriálním enzymem před nebo po vstupu do buňky
- Snížená propustnost buněčné stěny pro antibiotikum
- Modifikace zásahového místa pro antibiotikum a tudíž snížení afinity antibiotika k tomuto místu
- Získání alternativního zásahového místa
- Aktivní vyloučení antibiotika z buňky transmembránovými efluxovými systémy

Tato práce se věnuje posledně zmíněnému mechanismu rezistence u *A. baumannii* a to s ohledem na dosud ne zcela objasněnou roli těchto systémů ve vzniku multirezistence u této klinicky a epidemiologicky významné bakterie.

## 2 Acinetobacter

Bakterie rodu *Acinetobacter* jsou nefermentující, nepohyblivé, striktně aerobní gramnegativní bakterie tyčinkovitého nebo kokovitého tvaru, většinou uspořádané ve dvojicích. Jsou značně rozšířené v přírodě, především v půdě a vodě. Patří též mezi významné podmíněné patogeny uplatňující se zvláště při kolonizaci a infekcích pacientů v intenzivní nemocniční péči. Mezi tyto infekce patří především pneumonie, septikémie, endokarditidy, meningitidy a infekce kůže, ran a močového traktu (Bergogne-Bérézin, 1996). Během posledních desetiletí dramaticky vzrostl klinický a epidemiologický význam acinetobakterů a to především v důsledku objevení se a šíření kmenů rezistentních k většině nebo i ke všem terapeuticky dostupným antimikrobním látkám (Dijkshoorn *et al.*, 2007). Tyto kmeny mohou vyvolávat epidemie nemocničních infekcí a významně přispívat ke zvyšování nemocnosti, mortality, délky hospitalizace a nákladů na léčbu. K šíření těchto organismů v nemocničním prostředí významně přispívá i jejich schopnost dlouhodobě přežívat v nepříznivých podmínkách, např. suchém prostředí.

### 2.1 Taxonomie a populační genetika

Druhová klasifikace acinetobakterů je založena na podobnosti genomové DNA a fenotypových vlastností (Dijkshoorn *et al.*, 2007). V současnosti rod *Acinetobacter* zahrnuje 22 druhů s taxonomicky platnými jmény (tabulka 1) a nejméně 10 genomových skupin (genomovarů) s provizorním označením.

*Acinetobacter baumannii* je klinicky a epidemiologicky nejvýznamnější druh, který převažuje mezi kmeny acinetobakterů izolovanými z nemocničních infekcí (Dijkshoorn *et al.*, 2007). Epidemické, mutirezistentní a zvláště panrezistentní kmeny patří téměř výlučně do tohoto druhu a proto je *A. baumannii* věnována největší odborná pozornost.

Nemocniční infekce vyvolávají i některé další skupiny acinetobakterů, především genomovar 3 a genomovar 13TU. Tyto genomovary jsou evolučně příbuzné *A. baumannii*, od něhož je nelze spolehlivě odlišit pomocí fenotypových diagnostických testů. Proto se *A. baumannii* a genomovary 3 a 13TU řadí do tzv. komplexu *Acinetobacter calcoaceticus* – *A. baumannii* (ACB), který zahrnuje navíc půdní organizmus *A. calcoaceticus*. Od hospitalizovaných pacientů mohou být izolovány i *Acinetobacter ursingii*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter schindleri*, *Acinetobacter lwoffii* a některé další druhy nebo genomovary (Peleg *et al.*, 2008).

Nedávné populačně-genetické studie ukázaly, že *A. baumannii* má převážně klonální strukturu (Diancourt *et al.*, 2010). Podstatné bylo zjištění, že multirezistence je u *A. baumannii* významně asociována pouze s několika epidemickými klony (klonálními komplexy definovanými metodou multilokusové sekvenční typizace), zatímco kmeny plně citlivé k antimikrobním látkám jsou genotypově (klonálně) vysoce heterogenní. Nejvýznamnějšími epidemickými klony jsou Evropský epidemický klon (EU klon) I, EU klon II (Dijkshoorn *et al.*, 1996) a EU klon III (van Dessel *et al.*, 2004). K EU klonům I a II patří i převážná většina multirezistentních kmenů rodu *Acinetobacter* izolovaných v České republice v letech 1991-2005 (Nemec *et al.*, 2008).

Tabulka 1: Dosud popsané druhy rodu *Acinetobacter* s taxonomicky platnými jmény.

Platná jména druhů	Zdroj izolace
<i>A. calcoaceticus</i>	Půda
<i>A. baumannii</i>	Člověk, živočichové
<i>A. haemolyticus</i>	Člověk
<i>A. junii</i>	Člověk
<i>A. johnsonii</i>	Člověk, živočichové
<i>A. lwoffii</i>	Člověk, živočichové
<i>A. radioresistens</i>	Člověk, půda, bavlna
<i>A. ursingii</i>	Člověk
<i>A. schindleri</i>	Člověk
<i>A. parvus</i>	Člověk, živočichové
<i>A. baylyi</i>	Půda
<i>A. bouvetii</i>	Aktivovaný kal
<i>A. townneri</i>	Aktivovaný kal
<i>A. tandoi</i>	Aktivovaný kal
<i>A. grimontii</i> (= <i>A. junii</i> )	Aktivovaný kal
<i>A. tjernbergiae</i>	Aktivovaný kal
<i>A. gernerii</i>	Aktivovaný kal
<i>A. beijerinckii</i>	Člověk, živočichové, půda, voda
<i>A. gyllenbergii</i>	Člověk
<i>A. venetianus</i>	Mořská voda
<i>A. soli</i>	Půda
<i>A. bereziniae</i>	Člověk
<i>A. guillouiae</i>	Člověk, půda

## 2.2 Multirezistence

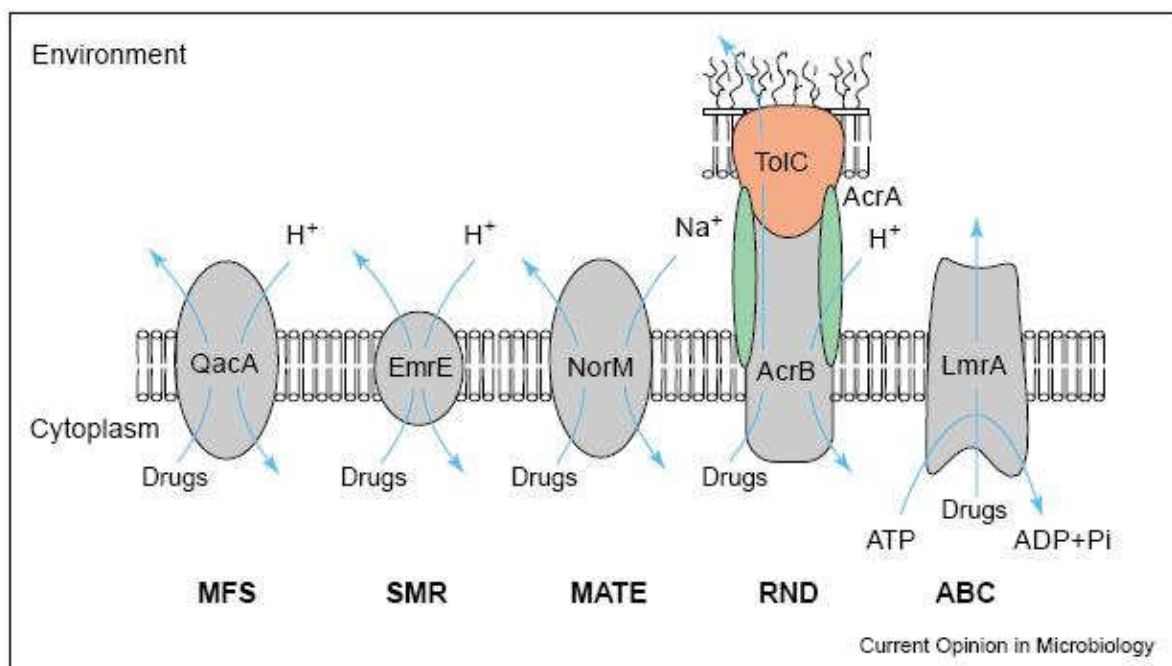
*A. baumannii* je přirozeně rezistentní k řadě antibiotik účinných na jiné gramnegativní patogeny i ostatní druhy acinetobakterů, např. k ampicilinu, cefalosporinům první a druhé generace nebo chloramfenikolu. Antimikrobní látky primárně účinné na *A. baumannii* zahrnují aminoglykozidy, ureidopeniciliny, cefalosporiny třetí a čtvrté generace, sulbaktam, karbapenemy, fluorochinolony, tetracykliny, glycylycykliny, trimetoprim a polymyxiny. S postupným zaváděním těchto antibiotik do klinické praxe se však u *A. baumannii* objevily mechanismy rezistence ke všem těmto antimikrobním látkám. Tyto mechanismy se u některých kmenů kombinují, což vede k multirezistenci až panrezistenci. Léčba infekcí vyvolaných takovými kmeny je obtížná a další šíření multirezistence a panrezistence *A. baumannii* je zdrojem nemalých obav.

Na multirezistenci *A. baumannii* se podílejí všechny obecné mechanismy rezistence známé u gramnegativních bakterií (viz. 1.1.). Nejpočetnější skupinou mechanismů rezistence jsou  $\beta$ -laktamázy, jichž bylo u *A. baumannii* popsáno více než 50 (Dijkshoorn *et al.*, 1996). Aminoglykzidovou rezistenci této bakterie zajišťují především modifikující enzymy ze skupin fosfotransferáz, nukleotidyltransferáz nebo acetyltransferáz (Seward *et al.*, 1998). Bodové mutace genů kódujících DNA gyrázu a topoizomerázu IV jsou spojeny s rezistencí k fluorochinolonům (Vila *et al.*, 1997). Většina genů kódujících inaktivující enzymy jsou získané horizontálním přenosem. K mechanismům založeným na aktivaci již přítomných, druhově specifických genů patří konstitutivní nadprodukce chromozomálních  $\beta$ -laktamáz typu AmpC nebo OXA-51, k níž dochází např. inzercí sekvence *ISAbal* nesoucí silný promotor před kódující oblastí těchto genů (Héritier *et al.*, 2006). Zatímco nadprodukce AmpC vede k rezistenci k cefalosporinům třetí generace, aktivace OXA-51 snižuje citlivost ke karbapenemům (Turton *et al.*, 2006). Mezi chromozomálně kódované a pravděpodobně pouze vertikálně přenosné systémy rezistence *A. baumannii* patří také efluxové systémy (viz. dále). Výjimku tvoří efluxy kódované horizontálně přenášenými geny *tet* a *cmlA* (viz. 3.4).

### 3 Efluxové systémy u rodu *Acinetobacter*

Efluxové systémy jsou složkami bakteriální membrány, jež se podílejí na udržování homeostáze buňky a odstraňování toxických látek (Piddock, 2006). Mohou být též zapojeny do mezibuněčné komunikace skrze systémy *quorum sensing* (Kohler *et al.*, 2001) a hrát roli v bakteriální patogenitě (Piddock, 2006).

Efluxové systémy se často nalézají u mikroorganismů, kterým udělují rezistenci na různé látky včetně antibiotik. Mechanismus jejich účinku spočívá v aktivním vylučování látek ven z buňky. Zdrojem energie pro tento proces je ATP (v případě rodiny ABC) nebo chemiosmotický membránový gradient, který umožňuje antiport  $H^+$ /antibiotikum (rodiny RND, MFS a SMR) nebo antiport  $Na^+$ /antibiotikum (rodina MATE). Posledně čtyři zmíněné rodiny se označují jako sekundární transportéry využívající chemický gradient na membráně. Schéma jednotlivých rodin je na obr. 1.



Obr. 1: Zástupci pěti rodin efluxových pump. Rodinu MFS tvoří sekundární transportéry poháněné chemiosmotickou energií (antiportér  $H^+$ /antibiotikum); příkladem je QacA u *Staphylococcus aureus*. Rodiny SMR a RND obsahují protonovou efluxovou pumpu, např. AcrB a EmrE u *E. coli*. AcrB je několikajednotkový komplex funkčně asociovaný s kanálem vnější membrány TolC a membránovým fúzním proteinem AcrA. Rodina MATE je složena z efluxových pump poháněných sodíkovými ionty, příkladem je NorM z bakterie *Vibrio parahaemolyticus*. Rodina ABC je poháněná energií ze štěpení ATP, příkladem je P-glykoprotein a LmrA z *Lactococcus lactis*. Převzato z Paulsen (2003).

### 3.1 Rodina ABC

Transportéry rodiny ABC (*ATP-binding cassette superfamily*) využívají energii uvolněnou při hydrolýze ATP. Transportér ABC je obvykle složen z integrálního membránového proteinu se šesti transmembránovými segmenty (TMSs) a z podjednotky vážící ATP. Často dimerizuje. ABC systémy transportují mnoho substrátů včetně cukrů, aminokyselin, iontů, toxických látek, komplexů železa, polysacharidů a proteinů (Fath & Kolter, 1993). Příkladem je pumpa LmrA bakterie *Lactococcus lactis* (Bolhuis *et al.*, 1996) a MacAB u *Escherichia coli* (Kobayashi *et al.*, 2001). U rodu *Acinetobacter* nebyl transportér ABC dosud popsán.

### 3.2 Rodina MATE

Rodina MATE (*multidrug and toxic compound extrusion superfamily*) je u *A. baumannii* zastoupena efluxovým proteinem AbeM tvořeným 446 aminokyselinovými zbytky. Struktura je bohatá na hydrofobní aminokyseliny a obsahuje 12 hydrofobních oblastí. AbeM snižuje citlivost na norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin, gentamicin, 4,6-diamino-2-fenylindol, triklosan, akriflavin, Hoechst 33342, daunorubicin, doxorubicin, rhodamin 6G a ethidium bromid, v menší míře pak i na kanamycin, erytromycin, chloramfenikol, tetrafenylfosfonium chlorid a trimetoprim (Su *et al.*, 2005).

### 3.3 Rodina SMR

Efluxové pumpy rodiny SMR (*small multidrug resistance superfamily*) závisí na energii protonového gradientu. Jsou tvořeny transportním proteinem vnitřní membrány (Paulsen *et al.*, 1996), který má délku 110 aminokyselinových zbytků a obsahuje čtyři transmembránové podjednotky (Schuldiner, 2007). Příkladem této rodiny u *A. baumannii* je systém AbeS, který způsobuje rezistenci k antibiotikům erytromycinu a novobiocinu, barvivům akridin oranž, akriflavinu a benzalkonium chloridu, detergentům deoxycholátu a sodium dodecyl sulfátu a desinfekčním prostředkům (Srinivasan *et al.*, 2009).

### 3.4 Rodina MFS

Rodina MFS (*major facilitator superfamily*) se podílí na transportu cukrů, metabolitů, aniontů a malých toxických molekul. V loňském roce byl u *A. baumannii* popsán efluxový systém s vysokou sekvenční podobností s proteinem MFS u *E. coli*. Tento systém je

odpovědný za přirozenou chloramfenikolovou rezistenci *A. baumannii* a byl proto nazván CraA (Roca *et al.*, 2009). CraA je tvořen 409 aminokyselinovými zbytky a obsahuje 12 transmembránových domén.

K horizontálně přenosným genům pro efluxové systémy patří *tet* geny zodpovědné za rezistenci k tetracyklinu. U *A. baumannii* byly popsány geny *tet(A)* a *tet(B)*. Tet(B) uděluje také rezistenci k minocyklinu (Huys *et al.*, 2005).

V genomovém ostrově AbaR1 u multirezistentního kmene *A. baumannii* byl navíc nalezen horizontálně přenosný gen *cmlA*, který kóduje efluxový systém rodiny MFS způsobující rezistenci k chloramfenikolu (Fournier *et al.*, 2006).

Nově byla u *A. baumannii* popsána další efluxová pumpa typu MFS nazvaná AmvA. Snižuje citlivost na široké spektrum substrátů, zejména karbapenemy, cefalosporiny, aminoglykozidy a fluorochinolony (Rajamohan *et al.*, 2010).

### 3.5 Rodina RND

Rodina RND (*resistance-nodulation-cell division family*) zahrnuje hlavní efluxové systémy přispívající k multirezistentnímu fenotypu gramnegativních bakterií. Rezistence k antimikrobním látkám je obvykle důsledkem nadměrné exprese RND pump způsobené mutacemi v regulačních genech. V mnoha případech je však úroveň vyvolané rezistence nízká a nedosahuje klinicky významných hodnot. Nicméně snížení intracelulární koncentrace antibiotika poskytuje čas pro selekci kvantitativně vyššího stupně rezistence, např. skrze akvizici mechanismů inaktivujících antibiotikum nebo mutační změnou jeho cílové struktury. Zvýšená exprese efluxových systémů tak může být jedním z předpokladů vzniku kvantitativně vysoké úrovně rezistence u původně plně citlivých kmenů (Poole, 2004).

Transportéry patřící do rodiny RND jsou proteiny vnitřní membrány (IMP – *inner membrane protein*), které aktivně transportují a vylučují určité látky. Funkčně jsou asociovány s fúzním membránovým proteinem (MFP – *membrane fusion protein*) a proteinem vnější membrány (OMP – *outer membrane protein*), což umožňuje transport antibiotika skrze obě membrány gramnegativní bakterie (Zgurskaya & Nikaido, 2000). Tyto tři komponenty jsou pro funkci pumpy esenciální a jejich geny jsou obvykle uspořádány jako operony, jako například u AdeABC systému (Magnet *et al.*, 2001). Strukturální gen pro OMP však někdy nemusí být součástí genového klastru (Chau *et al.*, 2004) nebo může být funkčně nahrazen jiným OMP (Marchand *et al.*, 2004).

Sekundární struktura transportérů rodiny RND je tvořena 12 transmembránovými segmenty (TMSs). Mezi TMSs 1 a TMSs 2 a mezi TMSs 7 a TMSs 8 jsou dvě dlouhé smyčky (Putman *et al.*, 2000; Damier-Piolle *et al.*, 2008). Terciární struktura OMP tvoří kanál prostupující vnější membránou a periplazmatickým prostorem (Wong *et al.*, 2001). MFP přibližuje vnitřní a vnější membránu a stabilizuje OMP (Zgurskaya & Nikaido, 2000).

### 3.5.1 AdeABC

Efluxový systém AdeABC patřící do rodiny RND se vyskytuje u většiny kmenů *A. baumannii* (Nemec *et al.*, 2007). Představuje významný mechanismus mnohonásobné antibiotické rezistence u této bakterie. AdeABC má široké spektrum substrátové specifity: způsobuje rezistenci nebo sníženou citlivost k aminoglykozidům, cefotaximu, tetracyklinům, erytromycinu, chloramfenikolu, trimetoprimu, fluorochinolonom ale i k ethidium bromidu (Magnet *et al.*, 2001). Novější práce ukázaly, že substrátem pro AdeABC je i tigecyklin, nové glycylycyklinové antibiotikum se slibným účinkem na citlivé i některé multirezistentní kmeny *A. baumannii* (Peleg *et al.*, 2007; Ruzin *et al.*, 2007). Zvýšená exprese AdeABC se může kombinovat s dalšími mechanismy rezistence, což vede ke kvantitativně vysoké rezistenci k některým antibiotikům. Příkladem je synergický účinek AdeABC a oxacilináz na rezistenci k  $\beta$ -laktamům včetně karbapenemů (Heritier *et al.*, 2005). Jiným příkladem je rezistence k fluorochinolonom způsobená mutacemi v *gyrA* a *parC* a současnou nadměrnou expresí pumpy AdeB (Higgins *et al.*, 2004).

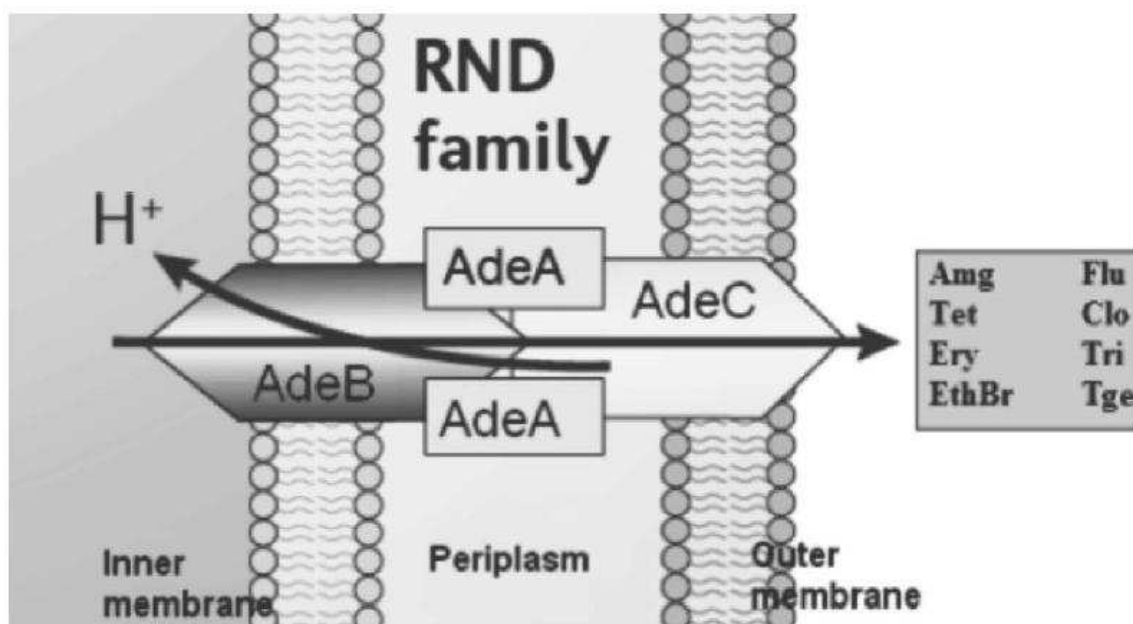
#### 3.5.1.1 Struktura AdeABC

Strukturu systému tvoří tři komponenty. Protein AdeA je fúzní membránový protein. AdeB je vlastní transportér, který je umístěn v cytoplazmatické membráně a obsahuje 12 transmembránových podjednotek (Magnet *et al.*, 2001). Jednotka AdeC je protein vnější membrány a slouží k exportu látek přes tuto membránu. Přítomnost AdeC není pro funkci efluxového systému nezbytná (Marchand *et al.*, 2004). Komponenty AdeA a AdeB mohou pravděpodobně využít i jiné proteiny vnější membrány. Např. AdeK spojený s efluxovým systémem AdeIJK.

Předpokládá se, že AdeB, podobně jako dosud prostudované transportéry, zachycuje substrát z cytoplazmy i fosfolipidové dvojvrstvy cytoplazmatické membrány. Pak jej transportuje prostřednictvím OMP (AdeC) vně buňky. Periplazmatický protein (AdeA)



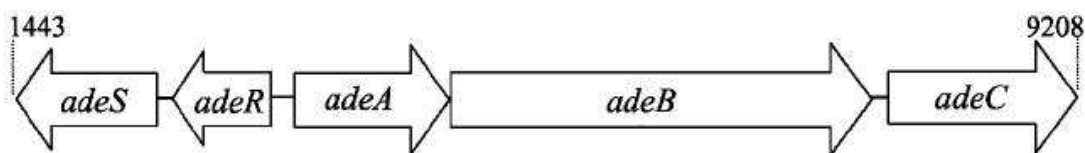
zprostředkovává kooperaci obou jednotek. Předpokládaná funkce AdeA je přiblížení obou membrán pro usnadnění transportu a stabilizace OMP struktury (Zgurskaya & Nikaido, 2000). Energie k transportu je poskytována protonovým gradientem, tedy současným antiportem jednoho iontu  $H^+$  a jedné molekuly substrátu (Eswaran *et al.*, 2004). Schéma struktury AdeABC uvádí obr. 2.



Obr.2: Uspořádání složek efluxového systému AdeABC v buněčné stěně *A. baumannii*. Vyznačen je antiport protonu a antibiotika skrze membránu. Amg – aminoglykozidy, Flu – fluorochinolony, Tet – tetracykliny, Clo – chloramfenikol, Ery – erytromycin, Tri – trimetoprim, EthBr – ethidium bromid, Tge – tigecyklin. Převzato z Wiczorek *et al.* (2008).

### 3.5.1.2 Geny pro AdeABC

Geny kódující strukturní a regulační složky systému AdeABC jsou umístěny na bakteriálním chromozomu. Strukturní geny *adeA*, *adeB* a *adeC* jsou umístěny za sebou ve formě operonu (Marchand *et al.*, 2004). Regulační geny *adeR* a *adeS* leží před genem *adeA* a jsou oproti genům pro AdeABC prepisovány v opačném směru (Marchand *et al.*, 2004).



Obr. 3: Uspořádání strukturních a regulačních genů systému AdeABC u *A. baumannii* BM4454. Šipky odpovídají kódujícím sekvencím a ukazují směr transkripce. Upraveno podle Marchand *et al.* (2004).

### 3.5.1.3 Regulace AdeABC

Regulační systém je dvousložkový (Magnet *et al.*, 2001) a předpokládá se tudíž, že zprostředkovává adaptivní odpověď bakteriální buňky na podněty z okolního prostředí. Transkripčním regulátorem je AdeR, tvořený 228 aminokyselinami. AdeS je o 100 aminokyselin kratší a má histidin kinázovou aktivitu (Marchand *et al.*, 2004). Senzorický protein AdeS kontroluje okolní podmínky a aktivuje nebo inaktivuje expresi efluxové pumpy (Magnet *et al.*, 2001; Marchand *et al.*, 2004). Odpovědí senzor kinázy AdeS na podnět je autofosforylace vlastního histidinu (H box) a tato fosfátová skupina je z histidinu pak přenesena na aspartátový zbytek regulátoru AdeR. Tento proces je vratný aktivitou AdeS. Tyto procesy vedou k přepínání mezi fosforylací a defosforylací, což mění aktivitu regulátorů, které kontrolují expresi strukturních genů. AdeS gen je pro expresi *adeABC* operonu esenciální (Marchand *et al.*, 2004). Nadměrná exprese AdeABC systému může být vyvolána mutací v genech regulačního systému (Marchand *et al.*, 2004) nebo inzercí sekvence *ISAbal* do oblasti předcházející operon *adeABC* (Ruzin *et al.*, 2007). Nedávná studie nicméně naznačuje, že regulace AdeABC je komplexnější a zahrnuje dosud neznámé regulační složky (Hornsey *et al.*, 2010).

### 3.5.2 AdeDE

AdeDE systém je hlavním efluxem u genomovaru 3 rodu *Acinetobacter* (Chu *et al.*, 2006). Snižuje citlivost na amikacin, ceftazidim, chloramfenikol, ciprofloxacin, erytromycin, meropenem, rifampin a tetracyklin. Zvláštností tohoto systému je, že za geny *adeD* a *adeE* nenásleduje ORF pro protein vnější membrány. Je možné, že gen pro tento protein se vyskytuje jinde v genomu a není regulován spolu s geny *adeD* a *adeE*. Jeho funkci by mohly přebírat i jiné proteiny vnější membrány (Chau *et al.*, 2004).

### 3.5.3 AdeFGH

Coyne *et al.* (2010) se zmiňují o novém efluxovém systému, AdeFGH, který byl objeven při selekci chloramfenikolem. Jde o nový systém rodiny RND, který se v současnosti studuje.

### 3.5.4 AdeIJK

Efluxový systém AdeIJK, strukturálně podobný AdeABC, je přítomen ve většině populace *A. baumannii* (Damier-Piolle *et al.*, 2008). Snižuje citlivost na  $\beta$ -laktamy, chloramfenikol, tetracyklin, erytromycin, linkosamidy, fluorochinolony, kyselinu fusidovou, novobiocin, rifampin a trimetoprim. AdeIJK pumpa navíc vylučuje aktidin, pyronin, safranin a sodium dodecyl sulfát (SDS), avšak nikoli ethidium bromid (Damier-Piolle *et al.*, 2008). Chemická struktura těchto molekul ukazuje, že preferovanými jsou amfipatické substráty. Spolu s pumpou AdeABC je AdeIJK významným mechanismem tetracyklinové, minocyklinové a tigecyklinové rezistence. Exprese AdeIJK je striktně regulovaná a k nadprodukci systému může docházet jen v úzké oblasti. Hladina exprese *adeIJK* je nižší než u *adeABC* (Coyne *et al.*, 2010).

Studie autorů Damier-Piolle *et al.* (2008) naznačily, že AdeIJK může přispívat k přirozené rezistenci *A. baumannii*.

### 3.5.5 AdeXYZ

Efluxový systém AdeYXZ se vyskytuje u genomovaru 3. Předpokládá se, že hraje roli v esenciálních buněčných procesech spíše než v antimikrobní rezistenci (Chu *et al.*, 2006).

### 3.6 Přirozené funkce efluxových systémů

Přirozené funkce efluxových pump jsou stále diskutovaným tématem. Nejznámější rolí těchto mechanismů v bakteriích je odstraňování toxických látek, které vstoupily do buňky z okolního prostředí. Jiné pumpy odstraňují produkty metabolismu jako například konečné produkty fermentace či látky namířené proti jiným organizmům (Helling *et al.*, 2002). Jednu z možných funkcí představuje také eflux signálních molekul potřebný pro *quorum sensing* (Rahmati *et al.*, 2002). Uvažuje se též o roli efluxových pump RND v invazi, adherenci a kolonizaci eukaryotické buňky bakteriemi (Hirakata *et al.*, 2002). Efluxové systémy zajišťují ochranu střevních kmenů *E. coli* proti žlučovým solím (Thanassi *et al.*, 1997). AcrAB-TolC systém také může hrát roli v transportu komponent vápenného kanálu v membráně *E. coli* (Jones *et al.*, 2003) či v exportu steroidních hormonů, ke kterému dochází v důsledku komenzálního či patogenního způsobu života bakterií (Elkins & Mullis, 2006). Přirozené funkce efluxových systémů objevených v souvislosti s antimikrobní rezistencí jsou nicméně většinou neznámé. Výjimkou není ani systém AdeABC, u něhož nebyl dosud identifikován žádný induktor přechodně zvyšující aktivitu systému.

## **Závěr**

Efluxové systémy hrají významnou roli při vzniku bakteriální rezistence. Ve své práci jsem se věnovala problematice těchto systémů u *A. baumannii*, podmíněně patogenního organismu, který zahrnuje též kmeny s kvantitativně i kvalitativně extrémním stupněm rezistence. Práce shrnuje taxonomii rodu *Acinetobacter*, podává přehled rodin efluxových systémů a jejich zástupců u rodu *Acinetobacter* a zaměřuje na rodinu RND. Důraz je položen na efluxový systém AdeABC, popisuje jeho strukturu, genetickou organizaci a regulaci. Věnuje se i diskutovanému tématu přirozených funkcí efluxů.

Dosavadní poznatky o efluxových systémech *A. baumannii* jsou fragmentární a představují výzvu pro další studie věnované jejich biologické roli a významu v přirozené a zvláště získané rezistenci k antimikrobním látkám a biocidům. Ve své budoucí experimentální práci se chci zaměřit na prohloubení našich znalostí ohledně funkce a genetiky systému AdeABC a jeho významu při vzniku multirezistence v obecné populaci *A. baumannii*.

## Seznam použité literatury

- (Escmid), E.C.F.A.S.T.E.O.T.E.S.O.C.M.A.I.D. (2000) EUCAST Definitive Document E.Def 1.2, May 2000: Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clin Microbiol Infect*, 6, 503-8.
- Bolhuis, H., Vanveen, H.W., Brands, J.R., Putman, M., Poolman, B., Driessen, A.J.M. & Konings, W.N. (1996) Energetics and mechanism of drug transport mediated by the lactococcal multidrug transporter LmrP. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 24123-24128.
- Chau, S.L., Chu, Y.W. & Houang, E.T.S. (2004) Novel resistance-nodulation-cell division efflux system AdeDE in Acinetobacter genomic DNA group 3. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 4054-4055.
- Chu, Y.W., Chau, S.L. & Houang, E.T.S. (2006) Presence of active efflux systems AdeABC, AdeDE and AdeXYZ in different Acinetobacter genomic DNA groups. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 477-478.
- Coyne, S., Guigon, G., Courvalin, P. & Perichon, B. (2010) Screening and Quantification of the Expression of Antibiotic Resistance Genes in Acinetobacter baumannii with a Microarray. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 333-340.
- Damier-Piolle, L., Magnet, S., Bremont, S., Lambert, T. & Courvalin, P. (2008) AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in Acinetobacter baumannii. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 557-562.
- Diancourt, L., Passet, V., Nemec, A., Dijkshoorn, L. & Brisse, S. (2010) The population structure of Acinetobacter baumannii: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One*, 5, e10034.
- Dijkshoorn, L., Aucken, H., Gernersmidt, P., Janssen, P., Kaufmann, M.E., Garaizar, J., Ursing, J. & Pitt, T.L. (1996) Comparison of outbreak and nonoutbreak Acinetobacter baumannii strains by genotypic and phenotypic methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 1519-1525.
- Dijkshoorn, L., Nemec, A. & Seifert, H. (2007) An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. *Nature Reviews Microbiology*, 5, 939-951.
- Elkins, C.A. & Mullis, L.B. (2006) Mammalian steroid hormones are substrates for the major RND- and MFS-type tripartite multidrug efflux pumps of Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 188, 1191-1195.
- Eswaran, J., Koronakis, E., Higgins, M.K., Hughes, C. & Koronakis, V. (2004) Three's company: component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps. *Current Opinion in Structural Biology*, 14, 741-747.
- Fath, M.J. & Kolter, R. (1993) ABC TRANSPORTERS - BACTERIAL EXPORTERS. *Microbiological Reviews*, 57, 995-1017.
- Fournier, P.E., Vallenet, D., Barbe, V., Audic, S., Ogata, H., Poirel, L., Richet, H., Robert, C., Mangenot, S., Abergel, C., Nordmann, P., Weissenbach, J., Raoult, D. & Claverie, J.M. (2006) Comparative genomics of multidrug resistance in Acinetobacter baumannii. *Plos Genetics*, 2, 62-72.
- Helling, R.B., Janes, B.K., Kimball, H., Tran, T., Bundesmann, M., Check, P., Phelan, D. & Miller, C. (2002) Toxic waste disposal in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 184, 3699-3703.

- Heritier, C., Poirel, L., Lambert, T. & Nordmann, P. (2005) Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 3198-3202.
- Higgins, P., Wisplinghoff, H., Stefanik, D. & Seifert, H. (2004) Selection of topoisomerase mutations and overexpression of *adeB* mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*, 54, 821-3.
- Hirakata, Y., Srikumar, R., Poole, K., Gotoh, N., Suematsu, T., Kohno, S., Kamihira, S., Hancock, R.E.W. & Speert, D.P. (2002) Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Experimental Medicine*, 196, 109-118.
- Hornsey, M., Ellington, M., Doumith, M., Thomas, C., Gordon, N., Wareham, D., Quinn, J., Lolans, K., Livermore, D. & Woodford, N. (2010) AdeABC-mediated efflux and tigecycline MICs for epidemic clones of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*, 65, 1589-93.
- Huys, G., Cnockaert, M., Vanechoutte, M., Woodford, N., Nemec, A., Dijkshoorn, L. & Swings, J. (2005) Distribution of tetracycline resistance genes in genotypically related and unrelated multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains from different European hospitals. *Res Microbiol*, 156, 348-55.
- Héritier, C., Poirel, L. & Nordmann, P. (2006) Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of IS<sub>Aba1</sub> in *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect*, 12, 123-30.
- Jones, H.E., Holland, I.B., Jacq, A., Wall, T. & Campbell, A.K. (2003) *Escherichia coli* lacking the AcrAB multidrug efflux pump also lacks nonproteinaceous, PHB-polyphosphate Ca<sup>2+</sup> channels in the membrane. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1612, 90-97.
- Kobayashi, N., Nishino, K. & Yamaguchi, A. (2001) Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183, 5639-5644.
- Kohler, T., Van Delden, C., Curty, L.K., Hamzehpour, M.M. & Pechere, J.C. (2001) Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 183, 5213-5222.
- Magnet, S., Courvalin, P. & Lambert, T. (2001) Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 3375-3380.
- Marchand, I., Damier-Piolle, L., Courvalin, P. & Lambert, T. (2004) Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 3298-3304.
- Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., Diancourt, L., Van Der Reijden, T.J.K., Brisse, S., Van Den Broek, P. & Dijkshoorn, L. (2008) Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62, 484-489.
- Nemec, A., Maixnerova, M., Van Der Reijden, T.J.K., Van Den Broek, P.J. & Dijkshoorn, L. (2007) Relationship between the AdeABC efflux system gene content, netilmicin susceptibility and multidrug resistance in a genotypically diverse collection of *Acinetobacter baumannii* strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, 483-489.
- Paulsen, I.T., Skurray, R.A., Tam, R., Saler, M.H., Turner, R.J., Weiner, J.H., Goldberg, E.B. & Grinius, L.L. (1996) The SMR family: A novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Molecular Microbiology*, 19, 1167-1175.

- Peleg, A.Y., Potoski, B.A., Rea, R., Adams, J., Sethi, J., Capitano, B., Husain, S., Kwak, E.J., Bhat, S.V. & Paterson, D.L. (2007) *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection while receiving tigecycline: a cautionary report. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 128-131.
- Peleg, A.Y., Seifert, H. & Paterson, D.L. (2008) *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21, 538-582.
- Piddock, L.J.V. (2006) Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 629-636.
- Poole, K. (2004) Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 12-26.
- Putman, M., Van Veen, H.W. & Konings, W.N. (2000) Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 672-+.
- Rahmati, S., Yang, S., Davidson, A.L. & Zechiedrich, E.L. (2002) Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA. *Molecular Microbiology*, 43, 677-685.
- Rajamohan, G., Srinivasan, V. & Gebreyes, W. (2010) Molecular and functional characterization of a novel efflux pump, AmvA, mediating antimicrobial and disinfectant resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.*
- Roca, I., Marti, S., Espinal, P., Martinez, P., Gibert, I. & Vila, J. (2009) CraA, a Major Facilitator Superfamily Efflux Pump Associated with Chloramphenicol Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 4013-4014.
- Ruzin, A., Keeney, D. & Bradford, P.A. (2007) AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 1001-1004.
- Schuldiner, S. (2007) When biochemistry meets structural biology: the cautionary tale of EmrE (vol 32, pg 252, 2007). *Trends in Biochemical Sciences*, 32, 300-300.
- Seward, R.J., Lambert, T. & Towner, K.J. (1998) Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp. *Journal of Medical Microbiology*, 47, 455-462.
- Srinivasan, V.B., Rajamohan, G. & Gebreyes, W.A. (2009) Role of AbeS, a Novel Efflux Pump of the SMR Family of Transporters, in Resistance to Antimicrobial Agents in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 5312-5316.
- Su, X.Z., Chen, J., Mizushima, T., Kuroda, T. & Tsuchiya, T. (2005) AbeM, an H<sup>+</sup>-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 4362-4364.
- Thanassi, D.G., Cheng, L.W. & Nikaido, H. (1997) Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 179, 2512-2518.
- Turton, J., Ward, M., Woodford, N., Kaufmann, M., Pike, R., Livermore, D. & Pitt, T. (2006) The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett*, 258, 72-7.
- Van Dessel, H., Dijkshoorn, L., Van Der Reijden, T., Bakker, N., Paauw, A., Van Den Broek, P., Verhoef, J. & Bricse, S. (2004) Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Research in Microbiology*, 155, 105-112.
- Vila, J., Ruiz, J., Goñi, P. & Jimenez De Anta, T. (1997) Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV parC gene of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*, 39, 757-62.



- Wong, K.K.Y., Brinkman, F.S.L., Benz, R.S. & Hancock, R.E.W. (2001) Evaluation of a structural model of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprM, an efflux component involved in intrinsic antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*, 183, 367-374.
- Zgurskaya, H.I. & Nikaido, H. (2000) Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Molecular Microbiology*, 37, 219-225.