

ÇOKLU İLAÇ DİRENCİNDE BAKTERİ HÜCRE DUVARI ORGANİZASYONU VE AKTİF POMPA SİSTEMLERİNİN ROLÜ

THE ROLE OF CELL WALL ORGANIZATION AND ACTIVE EFFLUX PUMP SYSTEMS IN MULTIDRUG RESISTANCE OF BACTERIA

Ufuk HASDEMİR¹

ÖZET: Klinik önemi olan bakterilerdeki çoklu ilaç direnci, bugün tıbbın karşı karşıya olduğu en önemli sorunlardan biridir. Antimikrobiyal ilacın hedefinde ortaya çıkan değişiklikler veya enzimatik yolla antimikrobiyalin inaktivasyonu, bakterilerde ilaç direncine yol açan mekanizmaların iyi bilinenlerindendir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, bakteriyel transport proteinlerinden bazılarının toksik antimikrobiyal bileşikleri aktif olarak hücre dışına pompaladığını ve bunun, klinikte tehdit oluşturan çoklu ilaç direncinde oldukça etkin rol oynayan bir başka mekanizma olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. İlaç pompa proteinleri bakterilerde beş büyük protein süper ailesinin [ATP binding cassette super family (ABC), Major facilitator super family (MFS), Small multidrug resistance super family (SMR), Multidrug and toxic compound extrusion (MATE) super family, Resistance-nodulation-cell division (RND) super family] üyeleri olup çoğunluğu kromozomal genler tarafından kodlanmaktadır. Bunlar arasında RND tipi pompa proteinlerinin substrat profilleri oldukça geniştir ve yaygın olarak bulundukları Gram negatif bakterilerin hem doğal, hem de kazanılmış çoklu ilaç direncinde etkin role sahiptirler. RND tipi aktif pompa proteinleri, genellikle bir dış membran kanal proteini (DMP) ve bir membran füzyon proteini (MFP) ile üçlü kompleks oluşturarak ilaç pompalama fonksiyonunu yerine getirmektedir. *Escherichia coli*'deki AcrAB-TolC ve *Pseudomonas aeruginosa*'daki MexAB-OprM, bu üç komponentli aktif pompa sistemlerinin tipik örnekleri olup yapısal olarak belirli düzeyde sentezlenmeleri, doğal dirençte çok etkin rol oynamaktadır. Klinikte esas tehditi oluşturan çoklu ilaç direnci ise, bu pompa sistemlerinin ekspresyonlarının mutasyon sonucu artmasıyla ortaya çıkmakta ve böylece florokinolonlar, beta-laktamlar, tetrasiklinler, kloramfenikol, trimetoprim ve aminoglikozidler gibi farklı sınıftan birçok antimikrobiyal ilaca ve toksik bileşiğe karşı yüksek düzeyde direnç gelişebilmektedir. RND tipi pompa proteinlerinin ekspresyonu, kompleks genetik mekanizmalar tarafından regüle edilmekte olup global aktivatör proteinler (MarA, SoxS, Rob), bu pompa sistemlerinin sentezini indüklemektedir. Gram negatif bakterilerin dış membranı da lipopolisakkaritten zengin özel yapısıyla, ilaç moleküllerinin hücreye girişi hızını yavaşlatarak antimikrobiyal ilaç direncinin gelişiminde ilaç pompa sistemlerine ve diğer direnç mekanizmalarına katkıda bulunan önemli bir hücre komponentidir. Gram pozitif bakterilerde ve mikobakterilerde bulunan ilaç pompa proteinleri, RND dışındaki diğer protein süper ailelerinin üyeleri olup substrat profilleri daha sınırlıdır. Bunlardan

¹ Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul. (ufukhasdemir@marmara.edu.tr)

bazıları (*Staphylococcus aureus*'ta NorA, MsrA, QacA; pnömokoklarda PmrA ve EmeE), florokinolonlar ve makrolidler gibi antibiyotiklere ve dörtlü amonyum bileşikler gibi toksik maddelere karşı dirençte etkin rol oynayarak klinikte sorun oluşturmaktadır. Bu derleme yazıda, çoklu ilaç direncinde bakteri hücre duvarı organizasyonunun ve aktif pompa sistemlerinin rolü tartışılmaktadır.

Anahtar sözcükler: Aktif ilaç pompası, çoklu ilaç direnci, dış membran.

ABSTRACT: Multiple antibiotic resistance of clinically important bacteria are of major concern worldwide. Alterations of drug targets or enzymatic inactivation of antimicrobial agents are the well known mechanisms of antimicrobial drug resistance. Besides these well known mechanisms, recent studies have shown that a further resistance mechanism, active drug efflux, has become increasingly important in the current threat of multidrug resistance. It involves certain bacterial transport proteins which pump out toxic antimicrobial compounds from the cell. Drug efflux pump proteins in bacteria fall into five distinct protein super families [ATP binding cassette super family (ABC), Major facilitator super family (MFS), Small multidrug resistance super family (SMR), Multidrug and toxic compound extrusion (MATE) super family, Resistance-nodulation-cell division (RND) super family] and are mostly encoded by chromosomal genes. Among them, the members of RND protein super family are widely distributed in Gram negative bacteria and play significant role in both, intrinsic and acquired multidrug resistance of these bacteria with very wide substrate specificity. RND type multidrug efflux proteins usually function together with an outer membrane canal protein (OMP) and a membrane fusion protein (MFP) to pump out drugs. AcrAB-TolC of *Escherichia coli* and MexAB-OprM of *Pseudomonas aeruginosa* are the typical examples of these tripartite systems. They are constitutively expressed in wild type cells and play significant role in intrinsic resistance of these bacteria. However, multidrug resistance which is of major clinical significance, rises as a result of overexpression of these pump systems due to mutations and elevated levels of resistance are recorded to structurally unrelated antimicrobial drugs such as fluoroquinolones, beta-lactams, tetracyclines, chloramphenicol, trimethoprim, aminoglycosides and toxic compounds. Synthesis of RND type pump proteins are regulated by complex genetic mechanisms and global activator proteins (MarA, SoxS, Rob) are significant in the induction of overexpression of these efflux pump systems. Outer membrane of Gram negative bacteria with its unique lipopolysaccharide rich structure also contributes to drug efflux and other antimicrobial resistance mechanisms by reducing the influx rate of toxic antimicrobial compounds. Multidrug efflux pump proteins found in Gram positive bacteria and mycobacteria are usually the members of protein super families other than RND family and their substrate profiles are more limited. However, some of these efflux proteins (NorA, MsrA, QacA in *Staphylococcus aureus*; PmrA and EmeA in *Streptococcus pneumoniae*) have clinical significance in the resistance to several antimicrobial agents (fluoroquinolones, macrolids) and toxic substances (quaternary ammonium compounds). In this review article, the role of cell wall organization and active efflux pump systems in multidrug resistance of bacteria have been discussed.

Key words: Active drug efflux, multidrug resistance, outer membrane.

GİRİŞ

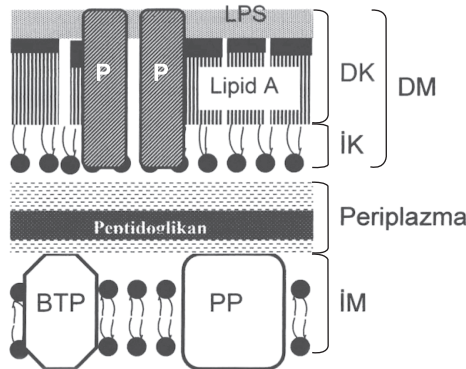
Çevreleri ile doğrudan temasta olan bakteriler evrimsel süreçte kazandıkları çeşitli yapısal organizasyonlar sayesinde zararlı bileşiklerin toksik etkilerinden kendilerini büyük ölçüde korumayı başarmışlardır. Gram negatif bakterilerin hücre duvarına özgü dış membran (DM) ve mikobakterilerin mikolik asit

yönünden zengin hücre duvarları bu yapısal organizasyonların uzun zamandan beri bilinen tipik örnekleridir¹. Dış membranın sitoplazmik membrandan farklılık gösteren lipopolisakkaritten (LPS) zengin özel yapısı, aşırı lipofilik (hidrofobik) moleküllerin hücreye giriş hızını belirgin şekilde yavaşlatırken; porin kanal proteinlerinin kaybı, sayısal olarak azalması ya da değişikliği de, hidrofilik moleküllerin hücreye girişinde bir engel oluşturmaktadır^{1,2}. Ancak son 10 yıldan bu yana yapılan çalışmalar, doğal dirençte etkili esas mekanizmanın, sitoplazmik membranda yerleşim gösteren aktif pompa proteinleri olduğunu ve bunların Gram pozitifler dahil bakterilerin büyük bir bölümünde yaygın olarak bulunduğu göstermektedir^{1,3}. Yapısal (konstitütif) düzeyde sentezlendiklerinde bakterinin doğal direncine etkin katkıda bulunan bu proteinlerin, yüksek düzeyde sentezi ise farklı sınıftan antimikrobiyal ilaçların, dezenfektanların, boyaların da içinde bulunduğu çok sayıda bileşiğe karşı tek bir adımda yüksek düzey çoklu ilaç direncinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır^{3,4}.

Bu derleme yazının amacı, çoklu antimikrobiyal ilaç direncinin enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde büyük bir sorun oluşturduğu günümüzde, aktif pompa proteinlerinin ve belirli bakteri gruplarındaki (Gram negatifler ve mikobakteriler) hücre duvarı organizasyonunun, doğal ve kazanılmış çoklu antimikrobiyal ilaç direncindeki rollerine dikkat çekmektir.

GRAM NEGATİF BAKTERİLERDE HÜCRE DUVARININ ANTİMİKROBİYAL İLAÇ DİRENCİNE KATKISI

Bütün Gram negatif bakteriler, iki tabakalı bir membran sistemine (diderm) sahip olup sitoplazmik membrana (iç membran) ek olarak, en dışta bir dış membran (DM) ile çevrilidir. İki katmanlı olan DM'in iç katmanı sitoplazmik membran gibi fosfolipid yapıdadır (Şekil 1). Dış ortama bakan katmanı ise, lipopolisakkarit (LPS) bakımından zengin yapısı ve doymamış yağ asitlerinden yoksunluğu ile sitoplazmik membrandan farklılık gösterir^{1,2} (Şekil 1). Yapılan çalışmalar, hücreye girişte LPS yolunu tercih eden makrolid,



Şekil 1. Gram negatif bakterilerde hücre yüzeyi organizasyonu ve bu bölgede yer alan bazı proteinler. (BTP: basit transport proteini, DM: dış membran, DK: dış katman, İK: iç katman, İM: iç membran, LPS: lipopolisakkarit, P: porin, PP: pompa proteini).

rifamisin, novobiyosin, fusidik asit gibi aşırı lipofilik (hidrofobik) antibiyotiklerin bu katmandan geçiş hızlarının, sitoplazmik membrana kıyasla çok daha yavaş olduğunu göstermektedir. Bu yavaşlamada; LPS'in anyonik özelliğinin, LPS molekülleri arasındaki kuvvetli yan bağlantıların, mutasyon sonucu LPS'de ortaya çıkan değişimlerin ve bu bölgedeki doymamış yağ asidi eksikliğinin etkili olduğu ileri sürülmektedir^{1,2,5}. *Pseudomonas aeruginosa*'daki LPS katmanı, *Escherichia coli*'ninkinden farklılıklar göstermekte olup, hidrofobik moleküllerin bu katmandan geçiş hızları *E.coli* LPS'ine göre daha yavaştır.

Aşırı lipofilik moleküllerin aksine, küçük, hidrofilik veya görece olarak hidrofobitesisi düşük olan moleküller (çoğu besin molekülleri, beta-laktamlar, tetrasiklin, kloramfenikol, florokinolonlar), hücreye girişte DM'da yerleşik olan porin proteinlerinin oluşturduğu içi su dolu kanalları tercih etmektedir^{1,2}. Kimyasal organizasyonları farklılık gösteren çeşitli porinler vardır. Bakteri hücresine besin girişini sağlayan porinlerin büyük çoğunluğu trimerik yapıda olup "ana" porinler olarak adlandırılır. Bu porinler, Gram negatif bakteriler ve *Corynebacterium*, *Nocardia* ve *Mycobacterium* grubu bakterilerin bütün üyelerinde bulunurlar. Nikaido² tarafından "klasik porinler" olarak da isimlendirilen ve belirgin dizi benzerliği gösteren OmpC, OmpF ve PhoE, *E.coli*'nin üç ana porini olup, diğer Gram negatif bakterilerdeki besin girişini sağlayan porinlerle de homoloji göstermektedir⁶. Substrat profilleri oldukça geniş olan ana porinler, sadece içlerinden geçecek molekülün iyon yükü ve büyüklüğü yönünden seçicilik gösterirler. OmpF'nin, OmpC'den biraz daha geniş bir kanal oluşturması (ağız kısmının genişliği: 7-11 Å) nedeniyle, besin moleküllerinden daha büyük olan katyonik ya da hafif anyonik antibiyotikler (monoanyonik ve "zwitterionic" sefalosporinler) ve safra tuzları hücreye girişte bu porin kanalını kullanırlar^{1,2,7}. *E.coli*'de OmpF porin üretimi, çeşitli fizyolojik faktörlerin (yüksek osmolarite, yüksek sıcaklık, asidik pH, oksidatif stres) ve ortamda safra tuzları, salisilat gibi bileşiklerin varlığında baskılanmaktadır^{2,8}. Yapılan çalışmalar, safra tuzları, salisilat ve oksidatif stresin, *E.coli*'de gen ekspresyonunu düzenleyen aktivatör proteinlerden bazılarının (MarA, SoxS, Rob) sentezini indüklediğini ve bunların da OmpF porin üretimini baskıladığını, böylelikle *E.coli*'nin hem kendini doğal ortamında bulunan safra tuzları gibi toksik bileşiklerin etkisinden koruduğunu, hem de çeşitli antimikrobiyal ilaçların MİK değerlerinde 1-2 katlık artışlara neden olduğunu ortaya koymaktadır^{2,4,8,9}. Klasik porinlerin sentezinin baskılanması, zararlı bileşiklere karşı hücreyi koruyan bir mekanizma olmakla birlikte, besin moleküllerinin hücreye girişi de bu yolla engelleneceğinden, bakteri hücresi için aynı zamanda bir dezavantaj oluşturmaktadır. Bakteriler bu riski, besin moleküllerinin geçişine izin veren, ancak antimikrobiyal ilaçların ya da toksik bileşiklerin geçişini engelleyen farklı porin proteinleri üreterek bertaraf etmektedirler^{1,2}. *E.coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *S.enterica* serovar Typhi, *Haemophilus influenzae* ve *Neisseria meningitidis*'in klinik izolatlarında, farklı porin üreten böyle mutantların varlığı gösterilmiş olup, bu mutantlarda hidrofilik beta-laktamlar, kloramfenikol, tetrasiklin, aminoglikozidler gibi antibiyotiklere karşı direncin arttığı ortaya konmuştur^{2,10-12}. *E.coli*'nin aksine,

P. aeruginosa'da trimerik yapıda porinlerin olmaması nedeniyle, hidrofilik besin molekülleri hücreye, yavaş porin olarak adlandırılan farklı bir porin (OprF) yoluyla girer^{2,13}. OprF, *P. aeruginosa* dış membranında çoğunlukla kapalı konformasyonda bulunmaktadır. *P. aeruginosa*'da gerek dış membran lipopolisakkaritlerindeki farklılıklar, gerekse ana porin OprF'in çoğunlukla kapalı konformasyonda bulunması, bu bakterinin yüksek düzey doğal direncine önemli katkıda bulunmaktadır. Bu ana porinlerin dışında, Gram negatif bakterilerin dış membranında sadece belirli yapıdaki besin moleküllerinin geçişine izin veren özgül kanallar da yer almaktadır. Bunların tipik örneği *E.coli*'de maltoz girişine izin veren ve lambda fajı reseptörü olan LamB kanalıdır². Bunun dışında *E.coli* ve *Enterobacteriaceae* ailesinin diğer üyelerinde bir çok özgül kanalın (ScrY, FadL, BglH, CymA) varlığı ortaya konmuştur. Yüksek geçirgenlik gösteren trimerik yapıdaki klasik porinlerden yoksun olan *P. aeruginosa* da bu özgül kanal proteinleri bakımından oldukça zengindir. Bunlardan OprB (eski adı: OprD1), monosakkarit (D-glukoz, D-ksiloz) girişine izin verirken; OprD (eski adı: OprD2), bazik amino asit ve peptidlerin difüzyonuna olanak tanıyan özgül bir kanaldır². OprD, son yıllarda imipenem direnciyle olan ilişkisinin ortaya konmasıyla dikkatleri üzerinde toplayan bir kanal proteindir ve imipenem, bazik amino asitleri taklit ederek bu kanaldan hücre içine girmektedir². Klinikte *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının imipenemle tedavisi sırasında, OprD kanalı taşımayan mutantların baskın hale gelmesi, tedavi başarısızlığına yol açmaktadır¹⁴. *P. aeruginosa*'nın diğer özgül kanallarından OprE ve E2'nin mutasyon sonucu sayıca azalması da sefalosporin ve florokinolon direnciyle ilişkili bulunmuştur². Başta besin molekülleri olmak üzere çeşitli bileşiklerin hücreye girişini sağlayan bu özgül ve özgül olmayan porinlere ilaveten, Gram negatif bakterilerin dış membranında çeşitli bakteriyel ürünlerin (hemolizin, kolisin V, alkali proteaz) hücre dışına atılmasını sağlayan kanallar da yer almaktadır. Bu kanallardan bazıları (*E.coli*'de TolC ve *P. aeruginosa*'da OprM), çoklu ilaç pompa sistemlerinin bir komponenti olarak davranıp, özellikle lipofilik antimikrobiyal ilaçların hücre dışına pompalanmasında etkin rol almaktadırlar. Derlemenin ileriki bölümlerinde, bu kanalların çoklu antimikrobiyal ilaç direncindeki rollerine daha detaylı olarak değinilecektir.

BAKTERİLERİN DOĞAL VE KAZANILMIŞ ÇOKLU ANTİMİKROBİYAL İLAÇ DİRENCİNDE AKTİF POMPA SİSTEMLERİ

Antimikrobiyal ilacın enzimatik yolla hidrolizi ya da modifikasyonu ve ilacın hedefi olan molekülde mutasyon sonucu ortaya çıkan değişim, bugüne değin üzerinde en çok çalışılan ve en iyi bilinen antibiyotik direnç mekanizmalarıdır. Bunlardan bir kısmı, intrinsik olarak bakterinin doğal direncine (Gram negatif bakterilerin penisiline doğal direncinde rol oynayan beta-laktamazlar) katkıda bulunurken; önemli bir bölümü, mutasyon sonucu ya da direnç determinantlarının ekzojen yolla kazanılması sonucu ortaya çıkmakta ve bugün klinikte sorun oluşturan antimikrobiyal direncinde önemli rol oynamaktadır. Bu mekanizmalar, genellikle yapısal olarak benzerlik gösteren antimikrobiyal ilaçlara karşı etkin olup, substrat profilleri bu nedenle sınırlıdır. Aminoglikozid modifikasyon

enzimlerinin, aminoglikozid antibiyotiklere; penisilin bağlayan proteinlerde ortaya çıkan bir mutasyonun, beta-laktam grubu antibiyotiklere; DNA giraz'da ortaya çıkan bir mutasyonun ise sadece kinolon grubu antibiyotiklere dirence yol açması, bu özgül direnç mekanizmalarının tipik örnekleridir⁵. Son 15-20 yıldan bu yana yapılan çalışmalar, bakterilerin doğal ve kazanılmış çoklu ilaç direncinde etkin bir başka mekanizmanın varlığını açıkça ortaya koymaktadır. İlk kez 1976'da, memeli hücre membranında yer alan P-glikoproteininin kanser ilaçlarına, daha sonra bakteri hücre membranında yer alan Tet pompa proteininin tetrasiklin direncine yol açtığına gösterilmesini takiben yapılan çalışmalar, çoklu ilaç direncine yol açan aktif pompa genlerinin bakterilerde ve diğer bir çok patojen mikroorganizmada (*Candida albicans*, *Plasmodium falciparum*) yaygın olarak bulunduğunu göstermektedir^{1,3,5,15,16}. Bakterilerde aktif pompa sistemlerini yöneten proteinler aslında besinlerin ve iyonların hücreye alınmasını, metabolik son ürünlerin ve zararlı maddelerin hücre dışına atılmasını, bakterilerin birbirleri ve çevreleriyle olan ilişkilerini düzenleyen çok sayıda proteini içine alan büyük bir protein ailesinin üyeleridir. Sitoplazmik membranda yerleşim gösteren bu proteinlerin aralarında belirgin homoloji mevcuttur. Amino asit dizilimlerindeki homoloji baz alınarak bu proteinler, beş süper protein ailesinde toplanmaktadır: "ATP binding cassette" süper ailesi (ABC), "Major facilitator" süper ailesi (MFS), "Small multidrug resistance" süper ailesi (SMR), "Multidrug and toxic compound extrusion" (MATE) süper ailesi, "Resistance-nodulation-cell division" (RND) süper ailesi^{1,3,5} (Tablo I). ABC ailesi üyesi olan pompa proteinleri bakterilerde pek yaygın bulunmamakla birlikte, *Lactococcus lactis*'te çoklu ilaç direncine yol açan LmrA, bu ailenin bakterilerdeki tipik örneğidir. *Staphylococcus aureus*'ta florokinolon direncine yol açan NorA ise, MFS ailesinin tipik bir örneğini oluşturmaktadır⁵. İlk başta sadece bakterilere özgü oldukları düşünülen, ancak ökaryotlarda da varlıkları gösterilen RND süper ailesi üyeleri, Gram negatif bakterilerde yaygın olarak bulunmakta olup intrinsik olarak belirli düzeyde sentezlendiklerinde bakterilerin doğal direncinde etkili olan bu proteinlerin yüksek düzeyde ifadesi, tek bir adımda yüksek düzey çoklu ilaç direncine yol açması bakımından büyük önem taşımaktadır (Tablo II).

Gram Negatif Bakterilerde Aktif İlaç Pompa Sistemleri

Gram negatif bakterilerin Gram pozitiflere kıyasla, antimikrobiyal ilaçlara ve çeşitli toksik bileşiklere karşı doğal direncinin daha fazla olduğu uzun zamandan beri bilinmektedir. Bu dirençte, dış membranın katkısı bir yana bırakılacak olursa, etkili esas mekanizma, bu bakterilerde yaygın olarak bulunan çoklu ilaç pompa sistemleriyle antimikrobiyal ilaçların ve zararlı bileşiklerin hücre dışına pompalanmasıdır^{1,3,5,15,16}. Çoklu ilaç pompa sistemlerinin büyük çoğunluğu RND süper ailesine ait olup, genellikle periplazmada yer alan bir membran füzyon proteini (MFP) ve dış membranda yer alan bir kanal proteini (DMP) ile kompleks oluştururlar^{1,3} (Şekil 2). *E.coli*'nin AcrB'si, *P.aeruginosa*'nın MexB'si ve *Neisseria meningitidis*'in MtrD'si, RND tipi çoklu ilaç pompa proteinlerinin en iyi bilinen örnekleridir⁵. RND tipi pompa proteinlerinin substratlarını periplazmik

Tablo I. Bakterilerde Aktif İlaç Transportundan Sorumlu Proteinlerin Bağlı Olduğu Süper Protein Aileleri ve Özellikleri

Protein Ailesi*	Kullandıkları Enerji Kaynağı	Membran Topolojisi	Tipik Protein	Bakteri Türü
ABC süper ailesi	ATP	12 (6+6) transmembran segmenti olan α -helikal simetrik bir protein	LmrA	<i>L.lactis</i>
MFS süper ailesi	PMF*	12 veya 14 transmembran segmenti olan bir protein	NorA EmrB	<i>S.aureus</i> <i>E.coli</i>
MATE süper ailesi	Na ⁺ gradient	MFS'ye benzer	YdhE	<i>E.coli</i>
SMR süper ailesi	PMF*	4 transmembran segmenti olan bir protein	Smr EmrE	<i>S.aureus</i> <i>E.coli</i>
RND süper ailesi	PMF*	iki büyük eksternal çıkıntısı olan 12 transmembran segmentli bir protein	AcrB MexB	<i>E.coli</i> <i>P.aeruginosa</i>

*ABC: ATP binding cassette, MFS: Major facilitator, MATE: Multidrug and toxic compound extrusion, SMR: Small multidrug resistance, RND: Resistance-nodulation-cell division, PMF: proton motivasyon kuvveti.

Tablo II. Gram Negatif Bakterilerde RND Tipi Çoklu İlaç Pompa Sistemleri

Bakteri türleri	MFP ^a	RND ^b proteini	DMP ^c	İfade ^d düzeyi	Substrat(lar) ^e
<i>E.coli</i>	AcrA	AcrB	TolC	wt/+; marR/+ + ^f ; acrR/+ +	BL,C,FK,ML,TS,NO,FU,LN,STz, YA, OÇ,SDS,TX,BA,M,OÇ, EB,AK,KV
	AcrA	AcrD	TolC	wt/+;	BL,FU,NO,AG,DK,SDS
	AcrE	AcrF	TolC	wt/-; mutant/+	BL,FK,TS,ML,TMP,LN,STz, OÇ,SDS,RD,AK
	MdtA	MdtBC	TolC	wt/-	BI, NO, DK, SDS
	YhiU	YhiV	TolC	wt/-	BL,E,NO,DO,DK,SDS,STz,BA,EB,KV,RD
<i>Enterobacter aerogenes</i>	AcrA	AcrB	TolC	wt/?; mutant/+ +	FK,C,NO,TS,STz,SDS,AK,A Kr,MS
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AcrA	AcrB	?	wt/?; mutant/+	FQ
<i>Proteus vulgaris</i>	AcrA	AcrB	?	wt/+	TG, MN, CIP, NO, C, E, TMP, EB, SDS, AK
<i>S.enterica</i> serovar Typhimurium	AcrA	AcrB	TolC	wt/+; mutant;+ + +; soxR/+ +	BL, FK, C, TS, NOR, NA, E, RF, NO, TX, KV, SDS, STz, DK, YA, AK
<i>Campylobacter jejuni</i>	CmeA	CmeB	CmeC	wt/+; mutant/?	FK, TS, AMP, C, NA, CTX, GN, RF, EB, AKr, PR, SDS, DK
<i>Serratia marcescens</i>	AcrA	AcrB	?	?	FK

Tablo II. Gram Negatif Bakterilerde RND Tipi Çoklu İlaç Pompa Sistemleri (Devamı)

<i>Vibrio cholerae</i>	?	?	TolC	wt/+; mutant/++	E, NO, EB, TX
<i>Haemophilus influenzae</i>	AcrA	AcrB	TolC	wt/+	E, NO, RF, AK, KV, EB, SDS
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	MtrC	MtrD	MtrE	wt/+; mtrR/++	CIP, AZ, ML, RF, PN, EB, KV, YA, TX
<i>Acinetobacter baumannii</i>	AdeA	AdeB	AdeC	wt/+	FK, AG, C, CTX, T, E, TMP, NO, EB
<i>Burkholderia cepacia</i>	CeoA	CeoB	OpcM	wt/-; mutant/+	C, FK, TMP
<i>B. pseudomallei</i>	AmrA	AmrB	OprA	wt/+	AG, ML
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	SmeA	SmeB	SmeC	?	FK, BL, AG
	SmeD	SmeE	SmeF	wt/+	FK, E, T, OÇ
<i>P.aeruginosa</i>	MexA	MexB	OprM	wt/+; nalB/+++; nalC/++	BL ^a ,FK,C,NO,TMP,TG,SF,AG, ML,TR,AK, KV,EB,RD,OÇ,SD S,IR,CL,HL ^h ,TPP
	MexC	MexD	OprJ	wt/-; nfxB/++	BL ⁱ , C, FK, NO, TMP, TG, SF, EB, AK, RD, SDS, OÇ, SL, TR, SP, TPP
	MexE	MexF	OprN	wt/-; nfxC/++	FK, C, TMP, TR, OÇ,
	MexX	MexY	OprM	wt/+	BL, FK, AG, T, ML, TG
	MexJ	MexK	OprM	wt/-; mutant/+	E, CIP, T, TR
	MexH	MexI	OpmD	wt/?; mutant/+	NOR, VA, EB, RD, AK
	MexV	MexW	OprM	wt/?; mutant/+	FK, C, T, E, EB, AK
<i>P. putida</i>	ArpA	ArpB	ArpC	wt/+	CB, C, T, S, E, NO
	MepA	MepB	MepC	?	BL, T, NO, E, OÇ
	SrpA	SrpB	SrpC	wt/+	OÇ
	TgtA	TgtB	TgtC	Wt/+	AMP, CB, OÇ

^a Membran füzyon proteini.^b Resistance-nodulation-cell division süper ailesi.^c Dış membran kanal proteini.^d wt/+, pompa sistemi sokak tipi hücrelerde ifade ediliyor; wt/+ mutant/++, pompa sistemi sokak tipi hücrelerde ifade edilmekle birlikte dirençli izolatlarda sentezi artıyor; wt/- mutant/+, pompa sistemi sokak tipi hücrelerde ifade edilmez ama dirençli izolatlarda ifade edilir. Pompa geni ifadesine yol açan mutasyon tipinin bilindiği durumlarda, ilgili gen ve ifade düzeyi ayrıca belirtilmiştir.^e AG: aminoglikozid, AK: akriflavin, AKr: akridin, AMP: ampisilin, AZ: azitromisin, BA: benzalkonyum, BL: β-laktamlar, C: kloramfenikol, CB: karbenisilin, CIP: siprofloksasin, CTX: sefotaksim, DK: deoksikolat, DMP: dış membran proteini, DO: doksorubisin, E: eritromisin, EB: etidyum bromür, FK: florokinolon, FU: fusidik asit, GN: gentamisin, HL: homoserin laktanlar, IR: irgasan,

KB: karbenisilin, KV: kristal viyole, LN: linezolid, M: metotreksat, MFP: membran füzyon proteini, ML: makrolidler, MN: minosiklin, MS: mitomisin, NA: nalidiksik asit, NO: novobiyosin, OÇ: organik çözücüler, PR: protamin, PU: puromisin, RD: rodamin, RF: rifampisin, S: streptomisin, SDS: sodyum dodesil sulfat, SL: serulenin, SF: sulfonamidler, SP: sefalosporinler, STz: safra tuzları, T: tetrasiklin, TR: triklosan, TG: tigesiklin, TMP: trimetoprim, TPP: tetrafenil fosfonyum, TX: triton X-100, VA: vanadyum, YA: yağ asitleri.

^f MarR, marA gen ekspresyonunu negatif regüle eder. marR'deki mutasyonlar, MarA sentezinde ve dolayısıyla acrAB ekspresyonunda artışa neden olur.

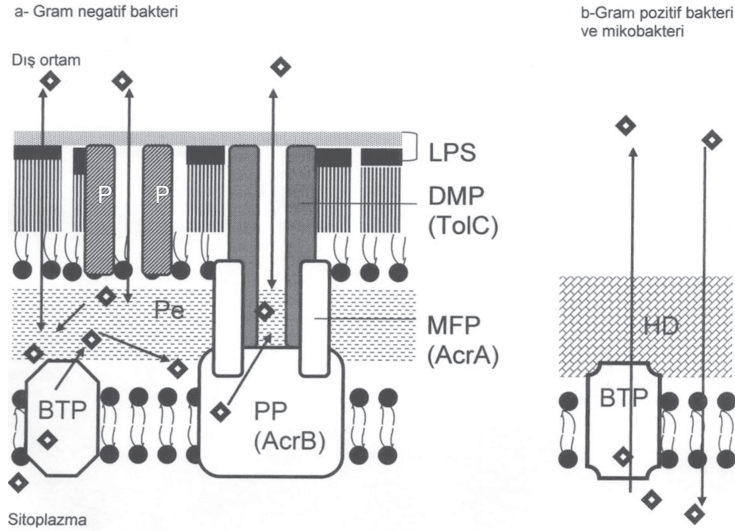
^g MexAB-OprM, çoğu penisilin ve sefalosporinlere ek olarak karbapenemlerden meropenem ve panipeneme dirence en belirgin pompa sistemidir. Ancak imipeneme etkili değildir. Yeni olarak tigesiklin direncine yol açtığı da bildirilmiştir.

^h Homoserin laktonlar "quorum-sensing"de rol alan moleküllerdir.

ⁱ MexCD-OprJ normal koşullarda ifade edilmezken; bilinen substratları (etidyum bromür, akriflavin, rodamin 6G, benzalkonyum klorid, klorheksidin ve tetrafenilfosfonyum klorid) tarafından indüklenebilir.

^j MexCD-OprJ ancak MexAB-OprM'nin yokluğunda penem grubu antibiyotiklere dirence neden olur.

boşluk ya da sitoplazmik membranın dış katmanından yakalayarak hücre dışına pompaladığı ileri sürülmektedir³ (Şekil 2). RND tipi pompa proteinlerinin büyük çoğunluğu kromozomal genlerin kontrolü altında olmakla birlikte ağır metal pompa proteinleri plazmidler tarafından kodlanmaktadır^{3,4}.



Şekil 2. Bakterilerde ilaç pompa sistemi sayesinde bir ilaç molekülünün hücre dışına atılışının şematik modeli. İlaç pompa sistemlerinin Gram negatif (a) ve Gram pozitif (b) bakterilerde organizasyonu. Gram negatif bakterilerde ilaç molekülü dış membranı, porin yolunu ya da LPS yolunu kullanarak geçer. İlaç molekülü periplazmik boşluğa ulaştığında pompa proteini (AcrB) tarafından yakalanıp, MFP (AcrA) ve DMKP (TolC)'nin de yardımıyla hücre dışına pompalanır.

Sitoplazmaya geçmeyi başaran bazı ilaç molekülleri de, önce sitoplazmik membrandaki BTP'ler tarafından yakalanıp periplazmik boşluğa atılır. Daha sonra pompa proteini tarafından yakalanarak hücre dışına pompalanır. Gram pozitif bakterilerde basit transport proteinleri, ilaç molekülünü dış ortama doğrudan pompalar. (BTP: basit transport proteini, DMP: dış membran kanal proteini, LPS: lipopolisakkarit, MFP: membran füzyon proteini, P: porin, Pe: periplazma, PP: pompa proteini) (3 no.'lu kaynaktan uyarlanmıştır).

Bugüne kadar *E.coli*'de RND ve diğer protein süper ailelerine mensup en az 37 transport proteinini kodlayan gen saptanmıştır³. Bunların bir kısmı, 1980'de tanımlanan plazmid kaynaklı ilk pompa proteini olan Tet gibi ilaca özgü proteinleri kodlarken, önemli bir kısmı da çoklu ilaç direncine yol açan transport proteinlerini kodlamaktadır^{3,15} (Tablo II ve III). Bunlar arasında RND tipi çoklu ilaç pompa proteinlerinin *E.coli*'deki en tipik örneği AcrB olup, bu pompa proteini, periplazmik boşlukta yer alan AcrA adlı bir membran füzyon proteini ve dış membrandaki TolC adlı bir kanal proteini ile kompleks oluşturarak ilaç pompalama işlevini yerine getirir (Şekil 2). AcrAB-TolC'nin substrat profili Tablo II'de görüldüğü gibi çok geniş olup, tetrasiklin, kloramfenikol, beta-laktamlar, novobiyosin, makrolidler, fusidik asit gibi yapısal olarak benzerlik göstermeyen antibiyotikleri, boyaları, deterjanları ve organik çözücülerini kapsamaktadır. Bu pompanın homologları diğer bir çok Gram negatif bakteride de (*Enterobacter aerogenes*, *S.enterica* serovar Typhimurium, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*) yaygın olarak bulunmaktadır^{3,12,15,17} (Tablo II). Normalde yapısal olarak belirli düzeyde ifade edilen AcrAB-TolC pompasının günümüzdeki esas önemi, mutasyon sonucu sentezinin artmasıyla ortaya çıkmaktadır. Örneğin, ekspresyondaki artışın bir çok Gram negatif bakteride florokinolon antibiyotiklere karşı yüksek düzey dirence yol açtığı gösterilmiştir^{12,18-20}. Benzer şekilde *Neisseria gonorrhoeae*'de de üç komponentli RND tipi bir pompa sistemi olan MtrCDE'nin ifadesindeki artış, çeşitli hidrofobik bileşiklere (penisilinler, makrolidler, rifamisinler, deterjanlar, safra tuzları ve steroid hormonlar) dirençten sorumludur³ (Tablo II). MtrCDE homologlarının varlığı *N.meningitidis*'te de gösterilmiştir. *E.coli*'de AcrB dışında altı tane daha RND tipi aktif pompa proteini bulunmaktadır; bunlardan AcrF, YhiV, MdtBC pompalama işlevinde, AcrB'ye benzer şekilde bir membran füzyon proteini ve bir DMP (TolC) ile işbirliğine gereksinim duymaktadır (AcrEF-TolC, YhiUV-TolC ve MdtABC-TolC) (Tablo II). Bu pompa sistemleri AcrAB-TolC'nin aksine yapısal olarak ifade edilmezler. Ancak mutasyon sonucu sentezlerinin artışı, çeşitli antimikrobiyal ilaçlara karşı direnç gelişimi ile sonuçlanmaktadır^{3,4} (Tablo II). Bir diğer RND tipi transport proteini olan AcrD, normalde MFP ve DMP ile işbirliğine ihtiyaç duymayan ve tek başına aminoglikozidler hücre dışına pompalayan bir transport proteindir. Ancak bazı durumlarda AcrA ve TolC ile işbirliği yaparak, novobiyosin ve safra tuzlarına dirence yol açabilmektedir^{3,5}.

Escherichia coli ve diğer Gram negatif bakterilerde MFS, MATE, SMR protein süper ailelerine ait pompa proteinleri de yaygın olarak bulunmaktadır (Tablo III). Substrat profilleri, RND tipi proteinlere kıyasla genellikle daha sınırlı olan bu proteinlerden *E. coli*'deki EmrE dörtlü amonyum bileşiklerine, EmrB ise nalidiksik asite dirençle ilişkilidir. Yüksek düzey kloramfenikol direncine yol açan MdfA'nın homoloğu da *S.enterica* serovar Typhimurium'da bulunmuştur. *Vibrio cholerae*'de varlığı gösterilen VceB ve Vcma pompa proteinlerinin de *E.coli*'de eksprese edildiklerinde florokinolon ve diğer bazı antimikrobiyal ilaçları etkin olarak hücre dışına pompaladıkları gösterilmiştir⁶ (Tablo III). Makrolid direncine yol açan MacB de 2001 yılında *E.coli*'de varlığı gösterilen ABC süper ailesine mensup ilk pompa proteindir^{3,21}.

Tablo III. Gram Pozitif ve Gram Negatif Bakterilerde RND Ailesi Üyesi Olmayan İlaç Pompa Proteinleri

Mikroorganizma Cinsi	Protein Ailesi	Pompa Protein	Substrat(lar) ^a
Gram Pozitif Bakteriler			
<i>Bacillus subtilis</i>	MFS	Bmr	FK, DO, AKr, EB, RD, SD, TTP
<i>Enterococcus faecalis</i>	ABC	ABC7	OFX, DO, DA, EB
	ABC	ABC11	PT, KH
	ABC	ABC16	E, AZ, CLA
	ABC	ABC23	QD, VM
	ABC	Lsa	CL, QD
	MFS	EmeA	C, E, FK, CL, NO, AK, EB
<i>L.lactis</i>	ABC	LmrA	DA, DO, EB, OL, RD, VB, VK
<i>Listeria monocytogenes</i>	MFS	MdrL	S, ML, EB
<i>S.aureus</i>	ABC	MsrA	ML
	MFS	NorA	FK
	MFS	QacA	C, AK, KV, EB, DD, DAB
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	MFS	PmrA	FK
	MFS	MefE	ML
<i>S.pyogenes</i>	MFS	MefA	ML
<i>S.agalactiae</i>	MFS	MreA	C, ML
Gram negatif bakteriler			
<i>E.coli</i>	ABC	MacAB-TolC	ML
	MFS	EmrAB-TolC ^b	NA, CCCP, EB, TL
	MFS	MdfA/Cmr/CmlA	C, PU, RF, T, EB, RD, TPP, IPTG
	MFS	Tet	TS
	MATE	YdhE	FK, AK, TTP
	SMR	EmrE	AK, EB, DAB, MV
<i>V.cholerae</i>	MFS	VceAB	NA, DK, PKP, CCCP, PMA
	MATE	VcmA	FK, C, S, AK, DA, DO, EB
<i>V.parahaemolyticus</i>	MATE	NorM	FK, C, S, EB
<i>P.aeruginosa</i>	SMR	EmrE	AG, AK, EB
<i>Burkholderia cepacia</i>	MFS	BcrA	T, NA
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	MATE	BexA	FK, EB
<i>B.fragilis</i>	MFS	NorA	NOR, EB, PM

^aAG: aminoglikozid, AK: akriflavin, AKr: akridin boyalar, AZ: azitromisin, CLA: klaritromisin, C: kloramfenikol, CCCP: carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazon, CL: klindamisin, DA: daunorubisin, DAB: dörtlü amonyum bileşikler, DD: diamidin, DK: deoksikolat, DO: doksorubisin, EB: etidyum bromür, E: eritromisin, FK: florokinolon, IPTG: izopröril-β-D-tyogalaktopiranozid, KH: klorheksidin, ML: makrolidler, MV: metilviyolejen, NA: nalidiksik asit, NO: novobiyosin, NOR: norfloksasin, OFX: ofloksasin, OL: olkisin, PKP: pentaklorofenol, PM: puromisin, PMA: fenilmerkürük asetat, PG: ptogramin, PT: pentamidin, QD: quinipristin-dalfopristin, RD: rodamin, S: streptomisin, SD: spermidin, ST: sefotaksim, T: tetrasiklin, TL: tiyolaktomisin, TPP: tetrafenilfosfonyum, VB: vinblastin, VK: vinkristin, VM: virginiamycin.

^bGram negatif bakterilerdeki MFS tipi proteinlerden bazıları, RND tipi proteinler gibi, bir membran füzyon proteini ve bir dış membran proteiniyle işbirliği halinde pompalama işlevini yerine getirirler.

Hastane enfeksiyonlarında etken olarak en sık izole edilen Gram negatif bakteriler arasında, çoklu ilaç direnci denince hiç kuşkusuz akla ilk gelen mikroorganizma *P.aeruginosa*'dır. Bu mikroorganizmanın dış membran ve porinlerinin, bakterinin doğal direncine yaptığı katkıya önceki bölümlerde detaylı olarak değinilmiştir. Son on yıldan bu yana yapılan çalışmalar, *P.aeruginosa*'nın

klinikte sorun teşkil eden yüksek düzey çoklu ilaç direncinde etkili esas mekanizmanın diğer Gram negatif bakterilerdeki gibi RND tipi pompa sistemleri olduğunu açıkça göstermektedir. MexAB-OprM, *P.aeruginosa*'da varlığı gösterilen ilk RND tipi pompa sistemi olup, bu mikroorganizmanın hem doğal hem de yüksek düzey antimikrobiyal ilaç direncinde çok etkin rol oynamaktadır^{5,15}. Bu pompa sistemi *E.coli*'nin AcrAB-TolC'si gibi üç komponentli olup MexB pompa proteini, bir MFP olan MexA ve bir DMP olan OprM ile ilişki halindedir. Yapısal olarak belirli düzeyde ifade edilen ve substrat profili oldukça geniş olan MexAB-OprM'nin bazı mutasyonlar sonucu substrat spektrumu daha da genişlemektedir. Bu tip mutantların (*nalB*, *nalC*) varlığı in vivo ve in vitro gösterilmiş olup bunlar; beta-laktamlar (beta-laktamaz inhibitörleri dahil), kinolonlar, makrolidler, tetrasiklinler (tigesiklin dahil), kloramfenikol, novobiyosin, sulfonamidler, trimetoprim gibi antimikrobiyal ilaçlara, akridin oranj, akriflavin, kristal viyole, etidyum bromür gibi boyalara, çeşitli deterjanlara ve organik çözücülere yüksek düzeyde direnç göstermektedir^{3,15,22} (Tablo II). İlginç olarak bu mutantlar karbapenem grubu antibiyotiklerden meropenem ve panipeneme karşı yüksek düzey direnç gösterirken; imipeneme duyarlılıklarında bir değişim olmamaktadır. Bunun nedeni bazik amino asitleri taklit ederek OprD kanalı yoluyla hücreye hızla penetre olan imipenemin, MexAB-OprM pompa sisteminin substrat spektrumuna girmemesidir. Son yıllarda MexAB-OprM'nin antimikrobiyal ilaçlar ve toksik bileşikler dışında bazı hücresel ürünleri de etkin şekilde hücre dışına pompaladığının gösterilmesi, bu tip pompaların fizyolojik rolleri üzerine olan ilginin artmasına neden olmuştur. Örneğin bir "quorum-sensing" sinyal proteini olan N-açıl homoserin lakton, *P.aeruginosa*'da MexAB-OprM sistemi ile hücre dışına pompalanmaktadır. Bilindiği gibi bu sinyal molekülü, diğer hücrelere girerek çeşitli mekanizmaları aktive etmekte ve bu hücrelerin piyosyanin, elastaz gibi enzimleri üretmesine neden olmaktadır³. MexAB-OprM gibi yapısal düzeyde sentezlenen RND tipi diğer bir pompa sistemi, MexXY-OprM *P.aeruginosa*'nın aminoglikozid grubu antibiyotiklere karşı gösterdiği doğal dirençte rol oynamaktadır. Ancak MexXY, OprM olmaksızın da işlevsel olabilen bir pompa sistemidir. MexXY'nin bu şekilde bir dış membran kanal proteini olmaksızın işlevsel olduğu durumlarda, florokinolon ve makrolid grubu antibiyotiklere karşı belirgin direncin ortaya çıktığı gösterilmiştir^{5,15}. *P.aeruginosa*'da yapısal düzeyde ifade edilmeyen bazı sessiz RND tipi pompa sistemleri de mevcuttur. Bunlardan MexCD-OprJ'nin yüksek düzeyde ifadesine yol açan *nfxB*-tipi mutasyon; kinolonlar ve dördüncü kuşak sefalosporinlere (sefepim, sefpirom) karşı direnci belirgin olarak artırması nedeniyle klinikte önem taşımaktadır. Bu mutasyonun bir diğer dikkat çekici sonucu, bu mutantların bazı antibiyotiklere (karbenisilin, aztreonam, imipenem, aminoglikozidler) duyarlılıklarında artış olmasıdır. Bu tip mutantlarda, *P.aeruginosa*'nın esas pompa sistemi olan MexAB-OprM ve kromozomal bir beta-laktamaz olan AmpC sentezinin baskılandığı ve böylece yukarıda adı geçen antimikrobiyal ilaçlara duyarlılığın arttığı ileri sürülmektedir³. Bir diğer sessiz pompa sistemi olan MexEF-OprN'yi yüksek düzeyde ifade eden *nfxC* mutantlarında, imipenem dahil çeşitli antimikrobiyal ilaçlara belirgin direnç ortaya çıkmaktadır. Ancak bu

mutantlardaki imipenem direnci, MexEF-OprN pompasının bu karbapenemi hücre dışına pompalamasıyla ilişkili değildir. Buradaki etkili mekanizma *nfxC* mutasyonunun aynı zamanda OprD kanal proteini üretiminde baskılanmaya yol açması ve böylece imipenemin hücreye penetre olamamasıdır^{2,3,14,23}.

P.aeruginosa gibi çoklu ilaç dirençleri nedeniyle klinikte sorun oluşturan *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter baumannii*'de de RND tipi pompa sistemleri yaygın olarak bulunmaktadır. Bunlardan *A.baumannii*'deki AdeAB-AdeC, *S.maltophilia*'daki SmeAB-SmeC, *B.cepacia*'daki CeoAB-OpcM, üç komponentli pompa sistemleri olup, substrat spektrumları oldukça geniştir^{3,5,15} (Tablo II).

Gram Pozitif Bakterilerde Aktif İlaç Pompa Sistemleri

Aktif pompa proteinleri Gram pozitif bakterilerde de yaygın olarak bulunmakta olup, son yıllarda yoğunlaşan çalışmalar stafilokok, streptokok, enterokok gibi klinik önemi olan bakterilerin çoklu ilaç direncinde bu proteinlerin etkin rol oynadığını ortaya koymaktadır^{1,3,5,16}. Hücre duvarı yapısının farklılığı nedeniyle Gram pozitif bakterilerde bulunan aktif ilaç pompa sistemlerinin organizasyonu daha basit olup, hücre membranındaki bir aktif pompa proteini ile bu fonksiyon yerine getirilmektedir (Şekil 2). *S.aureus*'ta sentezi plazmid kontrolündeki QacA ve Smr pompa proteinlerinin, antiseptik ve dezenfektanlara; sentezi kromozomal genlerin kontrolünde olan NorA'nın ise hidrofilik kinolonlara yüksek düzey dirence yol açması, hastane enfeksiyonlarının kontrolü açısından önem taşımaktadır^{3,24} (Tablo III). Varlığı ilk kez *S.epidermidis*'te gösterilen ABC ailesine ait MsrA proteininin homoloğu, *S.aureus*'un klinik izolatlarında da gösterilmiş olup makrolid ve streptogramin B direnciyle ilişkili bulunmuştur³. Çok yeni olarak, ilk kez bir MATE tipi pompa proteininin de (MepA), *S.aureus*'ta biyosid ve florokinolon direnciyle ilişkili olduğu bildirilmiştir²⁵.

Penisilin direnciyle gündemde olan bir diğer Gram pozitif bakteri de *Streptococcus pneumoniae*'dir. Bu bakterinin klinik izolatlarında varlığı gösterilen MefE proteini, penisiline dirençli pnömokok enfeksiyonlarının tedavisinde tercih edilen makrolid antibiyotiklere karşı dirence yol açması bakımından önem taşımaktadır²⁶ (Tablo III). MefE ilginç olarak, 14- ve 15- üyeli makrolidlere karşı etkinlik gösterirken, 16- üyeli makrolidlere, linkozamidlere ve streptogramin B analoglarına etkisizdir. Bu özellik, rutin tanı laboratuvarlarında kolaylıkla ayırt edilebilecek tipik bir fenotipin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Pnömokokların diğer bir pompa proteini, PmrA, *S.aureus*'taki NorA'nın bir homoloğu olup florokinolon direnciyle ilişkilidir^{5,16}. Tipik olarak intestinal kanal ve deride kolonize olan, ancak fırsatçı bir patojen olarak ciddi enfeksiyonlara yol açan enterokoklar da, Gram pozitifler arasında yüksek düzey ilaç direnci ile ön plana çıkan bir mikroorganizma grubu olup *Enterococcus faecalis* ve *E.faecium*'da kloramfenikol ve florokinolonların aktif olarak hücre dışına pompalandığı gösterilmiştir. Çok yeni olarak *E.faecalis*'te varlığı ortaya konan ve bir NorA homoloğu olan EmeA proteini, norfloksasin ve etidyum bromür direncine yol açmaktadır²⁷ (Tablo III).

Mikobakterilerde Hücre Duvarı Organizasyonu ve Aktif İlaç Pompa Sistemleri

Mikobakteriler, hücre duvar yapılarının eşsiz organizasyonu ile diğer bakterilerden belirgin biçimde farklılık gösterirler. Bu yapının ana komponentlerinden mikolik asitler, peptidoglikanla ilişkili arabinogalakthan tabakasına kovalan bağlarla bağlanmışlardır. Mikobakteri hücre duvarında, Gram negatif bakterilerdekine benzer şekilde hidrofilik moleküllerin geçişine izin veren porinler de bulunur, ancak bunlar sayısal olarak Gram negatif bakterilere kıyasla azdır. Hücre duvarının bu yapısı, belirgin bir geçirgenlik engeli oluşturarak mikobakterilerin doğal direncine önemli katkıda bulunmaktadır^{1,28}. Mikobakterilerin doğal direncinde pompa proteinlerinin rolleri de son yıllarda yapılan çalışmalarla yavaş yavaş ortaya çıkmaktadır (Tablo IV). Bunlardan *Mycobacterium smegmatis*'te florokinolon direnciyle ilişkili bulunan LfrA proteini, varlığı gösterilen ilk mikobakteriyel aktif pompa proteinidir^{3,16,29}. Çoklu ilaç direnciyle tüm dünyada tehdit oluşturan *M.tuberculosis*'te de pompa proteinlerinin bu dirençteki rolleri son zamanlarda yoğun şekilde araştırılmaktadır. Aminoglikozid ve tetrasiklin direnciyle ilişkili MFS tipi Tap ve P55 proteinlerine ilaveten izoniyazid direnciyle olan ilişkisi nedeniyle dikkatleri üzerine çeken bir diğer MFS tipi protein EfpA bunların örnekleri arasındadır^{3,16,30} (Tablo IV). *M.tuberculosis*'in izoniyazid içeren kültür pasajlarındaki izolatlarının, bu ilaca yüksek düzey direnç gösterdiği ve bu direncin pompa inhibitörü olan bir bileşiğin (rezepin) kültür ortamına ilavesiyle ortadan kalktığı gösterilmiştir³¹.

Tablo IV. Mikobakterilerde Aktif Pompa Proteinleri

Mikobakteri türü	Protein ailesi ^a	Pompa proteini	Substrat(lar) ^a
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ABC	DrrAB	DA, DO, EB
	MFS	EfpA	?
	MFS	P55	AG, T
	MFS	Tap	T
	SMR	Mmr	E, AK, EB, TPP
<i>M.smegmatis</i>	MFS	LfrA	FK, EB
	?	?	Izoniazid
<i>M.fortuitum</i>	MFS	Tap	AG, T

^aMFS; Major facilitator süper ailesi, ABC; ATP binding cassette süper ailesi.

^bAG: aminoglikozid, DA: daunorubisin, DO: doksorubisin, E: eritromisin, EB: etidyumbromid, FK: florokinolon, T: tetrasiklin, TPP: tetrafenilfosfonyum.

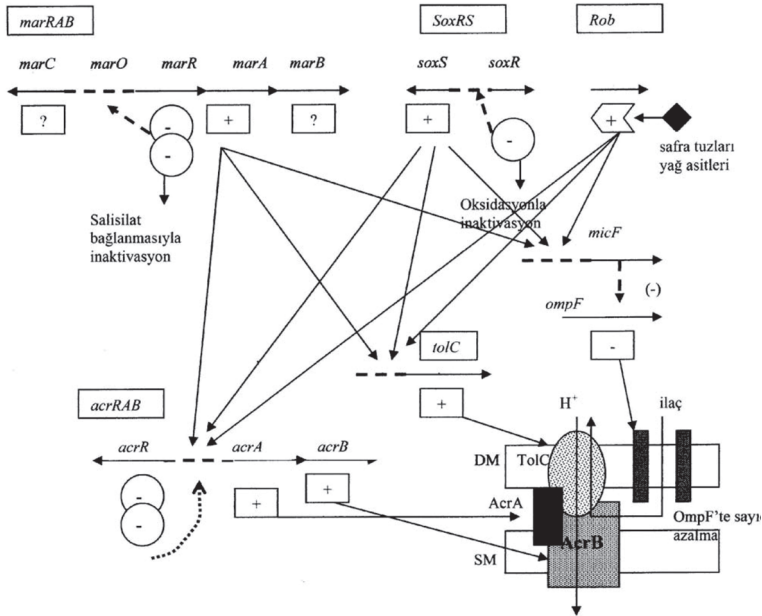
ÇOKLU İLAÇ POMPA SİSTEMLERİNİN İFADESİNİN GENETİK REGÜLASYONU

Çoklu ilaç pompa sistemlerinin substrat profillerinin çok geniş olması, bu tip pompa sistemlerinin sürekli olarak yüksek düzeyde ifadesinin, hücrenin normal metabolitlerinin de hücre dışına pompalanmasına neden olabileceğini ve bunun da hücreye zararlı olabileceğini düşündürmektedir. *E.coli*'de yapılan çalışmalar,

AcrAB'nin yüksek düzeyde ifadesinin bakteri hücrelerine toksik etkisi olduğunu ortaya koymuştur³. Bakterilerde özellikle RND ve MFS tipi transport proteinlerinin sentezi, transkripsiyon seviyesinde kontrol edilmektedir. Bilindiği gibi bu protein süper aileleri, çoklu ilaç pompa proteinlerinin büyük çoğunluğunun bağlı olduğu ailelerdir (Tablo II, III). *E.coli*'de *acrAB* ve *tolC* transkripsiyonu hem lokal hem de global mekanizmalarla kontrol edilmektedir. Lokal represör gen *acrR*, *acrA* ve *acrB* genleri ile aynı kromozomal lokusta bulunmakta olup bu genin ürünü olan AcrR represör proteini, *acrAB*'nin promotor bölgesine bağlanarak, *acrAB*'nin yüksek düzeyde transkripsiyonunu önlemektedir⁴ (Şekil 3). *E.coli*'nin tetrasikline özgü MFS tipi TetA pompa proteininin ifadesi de transkripsiyon seviyesinde TetR represör proteini tarafından lokal olarak kontrol edilmektedir. Normalde *tetA* geninin promotor bölgesine bağlanan ve *tetA* transkripsiyonunu engelleyen bu represör protein, ortamda tetrasiklin olduğunda, promotordan ayrılarak bu ilaca bağlanır. Promotor bölgenin serbest kalmasıyla *tetA* transkripsiyonu başlar ve tetrasiklini hücre dışına pompalayan TetA proteini sentezi artar³. Antimikrobiyal ilaç ve organik çözücüler gibi toksik bileşiklerin lokal represör proteine bağlanmasıyla sentezleri indüklenen diğer pompa sistemlerine örnek olarak, *P.aeruginosa*'nın MexXY'si ve *P.putida*'nın toluenle indüklenen TgtABC'si örnek olarak verilebilir (Tablo II). *P.aeruginosa*'daki MexAB-OprM sisteminin genleri olan *mexA*, *mexB* ve *oprM* aynı operonda bulunur ve bu operonun üst kısmında (upstream region) yer alan *mexR* geninin ürünü (MexR) pompa proteinlerinin transkripsiyonunu kontrol eder⁴. Bu bakterinin nalidiksik aside dirençli *nalB* mutantlarında, *mexR* geninde bir mutasyon olduğu ve bu genin ürünü olan proteinin etkin bir biçimde *mexAB-oprM* promotoruna bağlanamaması sonucu, MexAB-OprM pompa sisteminin ifadesinin arttığı gösterilmiştir. *P.aeruginosa*'nın normalde sessiz pompa sistemlerinden olan MexCD-OprJ de, represör geni *nfxB*'deki mutasyon sonucu yüksek düzeyde ifade edilmektedir. Diğer bir sessiz pompa sistemi olan MexEF-OprN'nin diğerlerinden farklılık gösteren transkripsiyon seviyesindeki regülasyonu ise *nfxC* mutantlarında gösterilmiştir. Şöyle ki; *mexEF-OprN* transkripsiyonunu indükleyen pozitif regülatör protein, MexT, normal koşullarda sentezlenmemekte ve dolayısıyla MexEF-OprN pompa sistemi sessiz kalmaktadır. Ancak *nfxC* mutantlarında, MexT sentezi artmakta, bu da MexEF-OprN pompa sisteminin ekspresyonunu artırmaktadır. MexT aynı zamanda imipenemin hücreye girişini sağlayan OprD porininin sentezini baskılayarak (negatif regülasyon), bu tip mutantlarda görülen yüksek düzey karbapenem direncine yol açmaktadır^{3,4}.

Çoklu ilaç pompa sistemlerinin ekspresyonunda, global regülasyon mekanizmaları çok etkin rol oynamaktadır. Örneğin *E.coli*'de AcrAB-TolC pompa sisteminin ekspresyonunu transkripsiyon seviyesinde artıran dört protein (global aktivatör) bulunmuştur: MarA, SoxS, Rob ve SdiA. MarA bir yandan *acrR* transkripsiyonunu baskılayarak AcrAB pompa proteinlerinin sentezini artırırken, diğer yandan farklı bir kromozomal lokusta bulunan *tolC* geninin transkripsiyonunu da indükleyerek TolC kanal proteini ifadesini artırmaktadır⁴ (Şekil 3). Ayrıca MarA, *E.coli*'nin ana porinlerinden biri olan OmpF'nin üretimini de baskılamaktadır. Salisilat, *marA* transkripsiyonunu indükleyen dolayısıyla

AcrAB-tolC pompa ifadesinde artışa yol açan bir ajandır. *E.coli*'deki MarA'nın homologları *K.pneumoniae*, *N.gonorrhoeae*, *M.smegmatis*'te de gösterilmiştir. Diğer global aktivatörlerden SoxR ve Rob da, *acrAB* ve *tolC*'nin transkripsiyonunu indüklemektedir (Şekil 3). Rob global aktivatör proteininin sentezinin, yağ asitleri ve safra tuzları tarafından indüklenmesi, *E.coli*'nin doğal ortamında bulunan bazı bileşiklerin nasıl olup da çoklu ilaç pompa sistemlerinin ifadesini artırabileceğini göstermesi bakımından dikkat çekicidir^{3,4,8}.



Şekil 3. AcrAB-TolC ekspresyonunun regülasyonu. *acrAB* operonu AcrR represör proteinini tarafından negatif regüle edilmekte ve böylece pompa sisteminin yüksek düzeyde ifadesi engellenmektedir (sol alt). *acrAB* ve *tolC* genleri global aktivatörler tarafından ise pozitif regüle edilmektedir (Şeklin üst kısmında gösterilen MarA, SoxS ve Rob aktivatörleri). Aktivatörler dikdörtgen içinde (+) işaretiyle; represörler ise daire içinde (-) işaretiyle gösterilmiştir. MarA ve SoxS ekspresyonu, MarR ve SoxR represörleri ile, Rob ise safra tuzları gibi küçük ligandlarla regüle edilmektedir. Bu üç aktivatör aynı zamanda *micF* transkriptini artırarak, OmpF porin mRNA'sının transkripsiyonunu inhibe eder, böylece porin sayısı azalır. Sonuçta bu üç aktivatör protein hem AcrAB-TolC pompa sisteminin ekspresyonunu artırarak hem de aynı zamanda OmpF porin sentezini inhibe ederek çoklu ilaç direncinin ortaya çıkmasına neden olur (3 no.'lu kaynaktan uyarlanmıştır).

ÇOKLU İLAÇ POMPA SİSTEMLERİNİN İNHİBİTÖRLERİ

Son yıllarda bu pompa sistemlerinin üstesinden gelebilecek ve böylelikle neden oldukları çoklu ilaç direncini ortadan kaldıracak bileşikler yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Bakterilerde ve ökaryot hücrelerdeki bu sistemleri inhibe eden çeşitli bileşikler bulunmuş olup bunlardan kalsiyum kanal

antagonisti olan verapamil, memeli kanser hücreleri ve *P.falciparum*'da çoklu ilaç direncine yol açan pompa sistemlerini inhibe etmektedir³. Bir diğer bileşik, rezerpin de, hem memeli hücrelerinde hem de Gram pozitif bakterilerdeki, NorA ve Bmr çoklu ilaç pompa proteinlerinin fonksiyonunu inhibe etmektedir. Son zamanlarda bulunan bir diğer NorA inhibitörü de *Berberis fremontii* adlı bitkinin yapraklarından elde edilen bir flavonoid olan "5'-methoxyhydnocarpine"dir³³. Gram negatif bakterilerde en sık çoklu ilaç direncine yol açan RND tipi pompa sistemlerini de inhibe eden çeşitli moleküller bulunmuş olup, bunlardan "phenylalanyl-arginyl- β -naphthylamide"ın (MC-207,110) *P.aeruginosa*'da MexAB ekspresyonunu baskılayarak bakterinin florokinolonlar başta olmak üzere çeşitli antimikrobiyal ilaçlara duyarlı hale gelmesine yol açtığı gösterilmiştir^{3,33}. Pompa inhibitörlerinin etkinlikleri hayvan modelleri üzerinde de denenmektedir. Çoklu ilaç pompaları üzerindeki inhibitör etkileri yüksek, buna karşın toksik etkileri az ya da hiç olmayan pompa inhibitörlerinin bulunması ya da geliştirilmesi, çoklu ilaç direnci olan bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarla mücadelede önemli bir adım olacaktır.

TEŞEKKÜR

Bu derlemenin hazırlanış aşamasında değerli katkılarıyla beni yönlendiren Prof. Dr. Güner Söyletir'e ve ayrıca titiz ve analitik geribildirimleri için Dr. Pınar Sağıroğlu ve Dr. Onur Karatuna'ya içten teşekkürlerimi sunarım.

KAYNAKLAR

1. Nikaido H. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Semin Cell Dev Biol* 2001; 12: 215-23.
2. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Bio Rev* 2003; 67: 593-656.
3. Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 2004; 64: 159-204.
4. Grkovic S, Brown MH, Skurray RA. Regulation of bacterial drug efflux systems. *Microbiol Mol Bio Rew* 2002; 66: 671-701.
5. Nikaido H. The role of outer membrane and efflux pumps in the resistance of gram-negative bacteria. Can we improve drug access? *Drug Resistance Updates* 1998; 1: 93-8.
6. Jeanteur D, Lakey JH, Pattus F. The bacterial porin super-family: sequence alignment and structure prediction. *Mol Microbiol* 1994; 5: 2153-64.
7. Nikaido H, Rosenberg EY, Foulds J. Porin channels in *Escherichia coli*: studies with β -lactams in intact cells. *J Bacteriol* 1983; 153: 232-40.
8. Rosenberg E, Bertenthal D, Nilles ML, Bertrand KP, Nikaido H. Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein. *Mol Microbiol* 2003; 48: 1609-19.
9. Rosner JL, Chai KJ, Foulds J. Regulation of OmpF porin expression by salicylate in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1991; 173: 5631-8.
10. Yoshimura F, Nikaido H. Diffusion of β -lactam antibiotics through porin channels of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 27: 84-92.
11. Charrel RN, Pagès J-M, de Micco P, Malléa M. Prevalence of outer membrane porin alteration in β -lactam-antibiotic-resistant *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2854-8.

12. Hasdemir UO, Chevalier J, Nordmann P, Pagès JM. Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. J Clin Microbiol 2004; 42: 2701-06.
13. Nikaido H, Nikaido K, Harayama S. Identification and characterization of porins in *Pseudomonas aeruginosa*. J Biol Chem 1991; 266: 770-9.
14. Quinne JP, Dudek EJ, Divincenzo CA, Lucks DA, Lerner SA. Emergence of resistance to imipenem during therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections. J Infect Dis 1986; 154: 289-94.
15. Poole K. Efflux mediated resistance in gram-negative bacteria. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 12-24.
16. Poole K. Efflux mediated resistance to fluoroquinolones in gram positive bacteria and mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 2595-9.
17. Pradel E, Pagès JM. The AcrAB-TolC efflux pump contributes to multidrug resistance in the nosocomial pathogen *Enterobacter aerogenes*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 2640-3.
18. Poole K. Efflux mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 2233-41.
19. Mazzariol A, Tokue Y, Kanegawa TM, Cornaglia G, Nikaido H. High-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein AcrA. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 3441-3.
20. Schneiders T, Amyes SGB, Levy SB. Role of AcrR and RamA in fluoroquinolone resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Singapore. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 2831-7.
21. Kobayashi N, Nishino K, Yamaguchi A. Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. J Bacteriol 2001; 183: 5639-44.
22. Zih-Zarifi I, Llanes C, Köhler T, et al. In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 287-91.
23. Ochs MM, McCusker MP, Bains M, et al. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1085-90.
24. Tennent JM, Lyon BR, Midgley M, et al. Physical and biochemical characterization of the *qacA* gene encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. J Gen Microbiol 1989; 135 (pt 1): 1-10.
25. Kaatz GW, McAleese F, Seo SM. Multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* due to overexpression of a novel multidrug and toxin extrusion (MATE) transport protein. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 1857-64.
26. Tait-Kamradt A, Clancy J, Cronan M, et al. *mefE* is necessary for the erythromycin-resistance M phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 2251-5.
27. Jonas BM, Murray BE, Weinstock GM. Characterization of *emeA*, a *norA* homolog and multidrug resistance efflux pump in *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 3574-9.
28. Jarlier V, Nikaido H. Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. J Bacteriol 1990; 172: 1418-23.
29. Takiff HE, Cimino M, Musso MC, et al. Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93: 362-6.
30. Silva PE, Bigi F, de la Paz santagelo M, et al. Characterization of P55, a multidrug efflux pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 800-4.

31. Viveiros M, Portugal I, Bettencourt R, et al. Isoniazid-induced transient high-level resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 2804-10.
32. Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 105-16.
33. Stermitz FR, Lorenz P, Tawara JN. Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97: 1433-7.