



**Molekularne mechanizmy i procesy komórkowe  
odpowiedzialne za pojawianie się  
oraz rozsiewanie w środowiskach naturalnych  
szczepów bakterii opornych na antybiotyki**

Molecular Mechanisms and Cellular Processes  
Responsible for Appearance and Spread-out  
of Bacterial Species Resistant to Antibiotics  
in Natural Environment

Adam Jaworski<sup>1</sup>, Ireneusz Jurczak<sup>1</sup>, Jolanta Adamczyk<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instytut Nauk o Zdrowiu, Społeczna Akademia Nauk

<sup>1</sup> Institute of Health Sciences, University of Social Sciences

**Streszczenie**

W artykule przedstawiono dane zawarte w literaturze światowej na temat molekularnych mechanizmów i procesów komórkowych zaangażowanych w pojawienie się w populacjach bakterii szczepów opornych na antybiotyki. W kolejnych podrozdziałach artykułu scharakteryzowano dwie grupy głównych procesów i mechanizmów, z których jedne, determinowane genetycznie, są dziedziczne, drugie zaś mają charakter adaptacyjny – przejściowy – i stanowią system aktywnej odpowiedzi komórek bakterii na drastyczne zmiany środowiska w warunkach ewolucyjnej presji selekcyjnej. Do pierwszej grupy mechanizmów zaliczono procesy paraseksualne bakterii, to jest transformację, koniugację, transdukcję, które są odpowiedzialne za horyzontalny transfer genów lekooporności (HGT) oraz złożone systemy genów i kodowanych przez nie błonowych białek transportowych (*efflux pumps*), do drugiej zaś mechanizm duplikacji i amplifikacji genów (GDA) oraz zjawisko uśpienia metabolicznego (*persister cells*).

**Słowa kluczowe**

mechanizmy molekularne, bakterie, oporność, antybiotyki

**Summary**

*The article presents the world literature data in the field of molecular mechanisms and cellular processes, responsible for appearance of bacterial species resistant to antibiotics and other chemotherapeutics. The subsequent chapters of the article contain a detailed description of two groups of major processes and mechanisms, one of which is genetically determined and hereditary and the other is adaptive and transient and thus provide natural active response to extreme environmental changes under evolutionary selection pressure. The first group includes parasexual bacterial processes such as transformation, conjugation, transduction, which are responsible for horizontal genes transfer (HGT) and systems of efflux pumps. The second group contains gene duplication and amplification mechanisms (GDA) as well as persister cells phenomenon.*

**Key words**

molecular mechanisms, bacteria, resistance, antibiotics

## Wprowadzenie

Klasyczne rozumienie zjawiska ewolucyjnej zmienności bakterii zakłada, że pojawianie się i rozprzestrzenianie bakterii opornych na antybiotyki i inne antybakteryjne leki jest wynikiem selekcji przez te związki mutantów opornych, preegzystujących w różnych populacjach bakterii [1, 2, 3]. W świetle wyników z lat 60., potwierdzonych i ugruntowanych pod koniec ubiegłego wieku, okazało się, że antybiotyki selekcjonują nie tylko preegzystujące w populacjach spontaniczne mutanty odporne, lecz także pośrednio szczepy mutatorowe, charakteryzujące się bardzo wysokim tempem różnorodnych, bezkierunkowych mutacji, co znacznie zwiększa także częstość mutacji prowadzących do nabywania lekooporności [4, 5, 6, 7]. Pojawianie się w populacjach bakterii chorobotwórczych i środowiskowych szczepów mutatorowych jest bezpośrednio związane z mutacyjną inaktywacją genów systemu naprawy błędów replikacji DNA (*Mismatch Repair*, MMR), co w efekcie prowadzi do 100–400-krotnego wzrostu częstotliwości różnorodnych mutacji [8, 9, 10]. Współczesne osiągnięcia biologii molekularnej bakterii, w tym szczególnie genomiki i proteomiki, wskazują, że dominującym mechanizmem odpowiedzialnym za rozsiewanie się w populacjach i narastanie oporności na antybiotyki jest horyzontalny transfer genów lekooporności (*horizontal genes transfer*, HGT), zachodzący także pomiędzy odległymi taksonomicznie różnymi gatunkami bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych [11, 12, 13, 14]. Integracja pojedynczych genów lekooporności do genomów na drodze homologicznej i niehomologicznej rekombinacji jest jedną z przyczyn nabycia oporności wielorakiej [15, 16]. Dla różnych gatunków bakterii wykazano, że skokowe podwyższenie progu oporności na dany antybiotyk (MIC) może być rezultatem mutacji adaptacyjnych związanych z duplikacją lub amplifikacją określonych genów lekooporności (*gene duplication and amplification*, GDA) [17]. Ważnymi mechanizmami odpowiedzialnymi za pojawianie się szczepów z wieloraką opornością na antybiotyki są: a) nabycie naturalnych plazmidów R noszących różne geny lekooporności oraz b) indukcja/aktywacja ekspresji białek złożonych systemów aktywnego transportu (*Multidrug efflux pumps*), odpowiedzialnych za aktywne usuwanie z komórki różnych substancji toksycznych, w tym antybiotyków [15, 18, 19].

**Procesy transformacji, transdukcji fagowej i koniugacji bakterii oraz mechanizmy genetycznej rekombinacji i duplikacji genów są odpowiedzialne za rozsiewanie się genów lekooporności w populacjach bakterii.**

Wyniki licznych publikowanych w ostatnich latach prac z zakresu genomiki porównawczej bakterii chorobotwórczych i środowiskowych dowodzą, że w świecie bakterii wyewoluowały różnorodne, bardzo sprawne mechanizmy i systemy horyzontalnego transferu informacji genetycznej, w tym genów lekooporności i chorobotwórczości generujące ogromną zmienność genetyczną i adaptacyjną plastyczność bakterii. Jedne z tych mechanizmów są odpowiedzialne za nabywanie kompetencji pozwalającej komórkom w warunkach naturalnych na efektywne pobieranie fragmentów nagiego DNA ze środowiska na drodze transformacji i ich inkorporację do własnych genomów, inne warunkują wewnątrz- i międzygatunkowy transfer genów na drodze koniugacji, a jeszcze inne są związane z procesami transdukcji fagowej [16, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26].

Można zapytać, po pierwsze, czy w różnych środowiskach naturalnych są dostępne zasoby nagiego DNA, w tym fragmenty noszące determinanty lekooporności, i po drugie, jakie czynniki i mechanizmy komórkowe nadają bakteriom odpowiednią kompetencję, konieczną do ich pobrania w warunkach naturalnych. Nie ma dzisiaj żadnych wątpliwości, że znane i dotąd nieznanne bakteriofagi w warunkach naturalnych uwalniają ogromne ilości genomowego DNA bakterii, a równocześnie przenoszą na drodze transdukcji różne fragmenty, w tym geny lekooporności, do innych, bliżej i dalej spokrewnionych gatunków bakterii bytujących w danej niszy ekologicznej. Ocenia się, że na jeden gatunek bakterii żyjących w naturalnych środowiskach takich jak woda, gleba, osady sedymentacyjne, przewody pokarmowe zwierząt i ludzi przypada średnio 5–10 bakteriofagów, które infekują i zabijają każdego dnia 40–50% komórek każdej populacji bakterii [27, 28]. Zatem w każdym naturalnym środowisku bytowania bakterii – w wodach, glebach, osadach sedymentacyjnych, na skórze i w przewodach pokarmowych ludzi oraz zwierząt – znajdują się duże zasoby genomowego DNA jako produktów cyklu litycznego komórek bakterii. Należy w tym miejscu dodać, że w świetle danych metagenomiki 62% bakterii przewodu pokarmowego człowieka, zidentyfikowanych za pomocą sekwencjonowania różnych skonstruowa-

nych bibliotek metagenomowych, nie było uprzednio znanych, a 80% z nich należy do bakterii dotąd niehodowlanych [29]. Dla przykładu, w dolnym odcinku przewodu pokarmowego człowieka i w kale wykryto gatunki należące do 9 spośród 70 znanych typów bakterii, ale dominujące okazały się gatunki należące do dwóch typów *Firmicutes* (w tym ponad 100 gatunków należących do rodzaju *Lactobacillus*) oraz *Bacteroides* [30]. Dowiedziano także, że odmienne populacje niehodowlanych gatunków bakterii kolonizują poszczególne odcinki przewodu pokarmowego człowieka, układu moczowego, oddechowego czy różne regiony skóry [31, 32, 33, 34]. Szacuje się, że metagenom populacji wszystkich mikroorganizmów kolonizujących ciało człowieka zawiera 100 razy więcej genów niż jego własny genom o wielkości 2,85 mld par zasad [35]. Szacunkowe dane metagenomiki wskazują także, że w biosferze bytuje około 10 mln gatunków bakterii, w tym 6 mln gatunków wolno żyjących i 3-5 mln gatunków związanych różnymi zależnościami z organizmami eukariotycznymi [36]. Skoro każdy gatunek bakterii może być gospodarzem dla 5-10 różnych bakteriofagów, to przewidywana liczba różnych typów bakteriofagów, krążących w świecie hodowlanych i niehodowlanych bakterii, zamyka się liczbą około 100 mln. W świetle tych danych bakteriofagi stanowią więc najbardziej zróżnicowaną genetycznie i najliczniejszą grupę bytów biologicznych na naszej planecie, które poprzez stan lizogenii, cykl lityczny hodowlanych i niehodowlanych bakterii oraz proces transdukcji fragmentów DNA stanowią ważne ogniwo całego systemu HGT [37, 38].

Opisana przez Griffitha 82 lata temu zdolność pneumokoków do pobierania nagiego DNA ze środowiska i jego inkorporacji do genomu na drodze rekombinacji okazała się ważnym i szeroko rozpowszechnionym mechanizmem HGT w świecie bakterii [39]. W literaturze przedmiotu opisano dotychczas ponad 60 gatunków bakterii, które w warunkach naturalnych osiągają stan kompetencji i zdolność pobierania DNA ze środowiska oraz jego rekombinacyjnej inkorporacji do genomów [40]. Lista gatunków bakterii hodowlanych, dla których potwierdzono zdolność transformacji *in vivo*, nie jest jednak zamknięta, nie mówiąc o milionach gatunków bakterii dotąd niehodowlanych. Molekularne mechanizmy związane z nabywaniem kompetencji i zdolności pobierania nagiego DNA oraz z regulacją tych procesów okazały się niezwykle złożone. Czytelników zainteresowanych tą proble-

matyką odsyłamy do dwóch obszernych artykułów przeglądowych [40, 41]. W tym miejscu warto powiedzieć, że transkrypcja około 180 genów podlega istotnym zmianom w czasie poprzedzającym stan kompetencji *Streptococcus pneumoniae*, a 28 genów jest bezpośrednio zaangażowanych w nabywanie kompetencji i pobieranie DNA oraz jego integrację do genomu gospodarza na drodze homologicznej rekombinacji [42]. Niedawno odkryto nowy mechanizm, nazwany w języku angielskim *fratricide*. Polega on na tym, że kompetentne komórki *S. pneumoniae* zabijają i lizują w populacji komórki siostrzane, które stanu kompetencji nie nabyły. Co więcej, komórki kompetentne tego gatunku zabijają i lizują także niekompetentne komórki pokrewnych gatunków z rodzaju *Streptococcus*, uwalniając do środowiska duże ilości homologicznego DNA [41, 43]. Dowiedziono w warunkach *in vitro*, że zjawisko *fratricide* tysiącrotnie zwiększa wydajność transformacji markerów DNA, w tym determinant oporności na antybiotyki z zabijanych komórek niekompetentnych do komórek kompetentnych [44]. Zjawisko *fratricide* nabiera szczególnego znaczenia, zważywszy chociażby na fakt, że rozsiewanie się determinant oporności na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe wśród chorobotwórczych szczepów i gatunków z rodzaju *Streptococcus* odbywa się głównie przy udziale mechanizmu transformacji [24]. Pobieranie przez komórkę fragmentów obcego DNA ze środowiska, chociażby DNA wirusów i bakteriofagów, jest związane z różnymi zagrożeniami dla stabilności genomu oraz funkcjonowania komórki. Stąd w świecie bakterii wyewoluowały różne strategie i mechanizmy, które chronią komórkę przed tego typu zagrożeniami. Przykładami takiej kontroli jest np. indukcja stanu kompetencji poprzez system *quorum sensing*, kontrola pobieranego DNA poprzez enzymatyczny układ restrykcji/modyfikacji gospodarza, a wreszcie ścisła kontrola stopnia homologii DNA poprzez system rekombinacji homologicznej. Niektóre gatunki bakterii – jak np. *Neisseria sp.*, *Haemophilus influenzae* – pobierają ze środowiska jedynie homologiczne fragmenty obcego DNA, ponieważ mają zdolność rozpoznawania w obcym DNA krótkich, powtarzających się sekwencji, homologicznych do sekwencji obecnych we własnym genomie. Sekwencje te nazwano DUS (*DNA uptake sequence*) i USS (*uptake signal sequence*). Obecność tego typu sekwencji w pobieranych ze środowiska fragmentach DNA gwarantuje, że są one odpowiednimi substratami dla homologicznej rekombinacji [16, 45]. Jeszcze innym ostatnio postulowanym mechanizmem kontroli nabytych

genów jest przejściowe wyciszenie ich transkrypcji. W zjawisku tym, opisanym dla *Escherichia coli* i *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, za wyciszenie transkrypcji niektórych nabytych genów odpowiedzialne jest białko histonopodobne H-NS [46]. Zakłada się, że jest to mechanizm, który chroni komórkę gospodarza przed potencjalnie toksycznymi produktami nabywanych na drodze horyzontalnej transmisji obcych genów. Inny sposób transformacji związany z aktywnym transportem przez żywe komórki plazmidowego i chromosomalnego DNA na zewnątrz w membranowych pęcherzykach (*membrane vesicles*, MVs), odkryty dla różnych gatunków bakterii Gram-ujemnych, jest przykładem kolejnego mechanizmu, który wzbogaca pulę genomowego DNA dostępnego w środowisku życia bakterii i indukuje w ten sposób procesy HTG [47, 48].

Nie mniej ważnym mechanizmem zaangażowanym w HTG, w tym w horyzontalny transfer genów lekooporności, jest koniugacja. Molekularny mechanizm koniugacji był od lat badany głównie na modelu *Escherichia coli* noszących naturalne plazmidy grup niezgodności (*incompatibility*) FI, P (RP4) i W. W świetle wyników uzyskanych w ostatnich 5–6 latach okazało się, że transfer DNA w procesie koniugacji zachodzi przy udziale białek systemów T4S, które z kolei stanowią podrodziny białek wchodzących w skład bardzo złożonego, zróżnicowanego i szeroko rozpowszechnionego w świecie bakterii systemu sekrecyjnego typu IV [16, 49]. Dane genomiki porównawczej dowodzą, że geny systemu koniugacji T4S są homologiczne do genów znanego systemu *virB* *Agrobacterium tumefaciens*, który jest odpowiedzialny za transfer bakteryjnego DNA do jąder komórek drożdży, grzybów i roślin [50]. Systemy koniugacji typu T4S dla transferu plazmidów koniugacyjnych oraz genów chromosomalnych opisano dla wielu gatunków Gram-ujemnych bakterii patogennych takich jak: *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis* i *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, nie wykryto natomiast systemów koniugacji typu T4S u bakterii Gram-dodatnich, takich jak np.: *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* [15, 16, 20]. Wiadomo od dość dawna, że naturalne plazmidy R noszą wiele różnych genów oporności na antybiotyki i metale ciężkie. Dla przykładu plazmid R100 koduje oporność na tetracykliny (gen *tetA* w transpozonie Tn10), chloramfenikol (gen *cat* częścią transpozonu Tn9), sulfonamidy i miedź (geny *sul1* oraz *aadA1* częścią transpozonu Tn21), *gacE* (geny systemów białek

transportowych, ale zdecydowana większość cząsteczek tego plazmidu o wielkości 24,281 par zasad stanowią geny kodujące białka systemu koniugacji T4S) [15, 51]. Plazmid R100 jest przykładem wskazującym, że wiele genów lekooporności może być noszonych przez jeden duży plazmid. Na drodze jednostopniowej koniugacji mogą być przenoszone do kompetentnych komórek biorców. Należy dodać, że niskokopijne, naturalne plazmidy R są w komórkach bardzo stabilnie replikowane dzięki obecności genów zapewniających prawidłową ich segregację do komórek potomnych, a także elementów systemu zabijającego komórki, które utraciły plazmid (*killer system*). Mniejsze plazmidy lekooporności nie zawierają, co prawda, tak wielu genów systemu T4S jak plazmid R, ale ich koniugacyjny transfer do nowych gospodarzy może być łatwo mobilizowany przez inne plazmidy obecne w komórce. Identyfikacja w plazmidach R unikalnej, 59-nukleotydowej sekwencji *tag*, zlokalizowanej na końcach 3' genów oporności na antybiotyki doprowadziła do odkrycia integronów, nowych elementów genetycznych, niezwykle ważnych w procesie rozsiewania się w świecie bakterii wielorakiej oporności na antybiotyki [52]. Integrony kodują syntezę enzymu integrazy, która katalizuje insercję genów oporności na antybiotyki pod kontrolę silnego promotora. W platformę, to jest integron zerowy zawierający gen integrazy *intl*, promotor *Pant* i sekwencje *attI*, może zostać kolejno wbudowanych *in vivo* do ośmiu różnych genów oporności na antybiotyki, które przyjmują strukturę jednego operonu i podlegają ekspresji z jednego silnego promotora [53]. Najlepiej poznane integrony klasy I zidentyfikowano w 40–70% patogennych bakterii Gram-ujemnych, izolowanych od ludzi i zwierząt. Szybkie rozprzestrzenianie się integronów klasy I, obserwowane ostatnio także wśród bakterii Gram-dodatnich, jest związane z ich lokalizacją na mobilnych elementach genetycznych. Zwykle integrony tej klasy są wbudowane w duże, mobilne transpozony złożone lub duże plazmidy R, które umożliwiają transpozycję genów lekooporności do chromosomów danego gospodarza, jak również ich horyzontalny transfer pomiędzy różnymi szczepami i gatunkami bakterii. Skalę rozpowszechnienia integronów w świecie bakterii obrazuje fakt, że ich obecność zidentyfikowano w około 10% dotychczas zsekwencjonowanych genomów bakterii [54]. Opisano niedawno jeszcze inne niezwykle elementy genetyczne bakterii zwane ISCR (*downstream structures*), które są zlokalizowane przy końcu 3' integronów i zawierają gen



transpozazy. Postulowana rola biologiczna ISCR (*integrating conjugative elements*) polega prawdopodobnie na pułapkowaniu kolejnych genów lekooporności, a następnie ich wbudowywaniu w strukturę integronów [55]. W świecie bakterii Gram-dodatnich wyewoluowały odmienne od T4S systemy koniugacji, kodowane przez plazmidy oraz duże, złożone transpozony koniugacyjne [56, 57]. Transpozycja tych elementów w nowe miejsca w plazmidzie lub w chromosomie zachodzi przy udziale mechanizmu wykorzystywanego przez faga  $\lambda$ , to jest struktury pośredniej w postaci kolistego DNA. Co ciekawe, transpozony te, podobnie jak plazmidy koniugacyjne, mogą być przenoszone w procesie koniugacji do innych gatunków i rodzajów bakterii zarówno Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, a następnie integrowane w procesie rekombinacji do genomowego DNA. Złożone i dość różnorodne systemy horizontalnego transferu genów na drodze koniugacji są w świetle współczesnej wiedzy jednym z najważniejszych molekularnych mechanizmów ewolucji bakterii; odgrywają także niezwykle ważną rolę w rozsiewaniu się nie tylko genów lekooporności noszonych przez plazmidy, lecz także genów lekooporności obecnych w chromosomach jako częściach składowych transpozonów, integronów, wysp patogenności, elementów ICCR [20, 55, 58].

Od ponad 30 lat narasta wiedza na temat duplikacji i amplifikacji genów (*gene duplication*, *gene amplification*, GDA) jako jednego z ważnych mechanizmów adaptacyjnych bakterii w odpowiedzi na obecność w środowisku toksycznych leków, w tym antybiotyków. Zgodnie z danymi zawartymi w literaturze duplikacja i amplifikacja genów determinujących lekooporność bakterii może prowadzić – w zależności od rodzaju antybiotyku obecnego w środowisku wzrostu – do nadprodukcji białek odpowiedzialnych za jego modyfikację lub degradację, nadprodukcji białek stanowiących dla danych antybiotyków docelową tarczę molekularną bądź nadprodukcji białek błonowych systemów transportu [59]. Donoszono również o innych zmianach towarzyszących wzrostowi lekooporności bakterii związanych z omawianym fenomenem GDA. Duplikacja części genów *ermA* (25 par zasad u *Staphylococcus aureus* oraz 72 pary zasad u *Enterobacter faecalis*), kodujących oporność na erytromycynę, prowadzi do konstytutywnej ekspresji tego genu, ponieważ znosi kontrolę jego ekspresji na poziomie systemu atenuacji procesu translacji [60]. Podobna duplikacja niewielkiej części genu *rplV* *Streptococcus*

*pneumoniae* (18 par zasad), kodującego syntezę białka rybosomalnego L22 lub podjednostki wiążącej 23S RNA, jest odpowiedzialna za nabywanie przez ten szczep oporności na antybiotyki makrolidowe w wyniku zablokowania miejsca wiązania się tych antybiotyków do podjednostki 23S RNA. Wyniki badań z użyciem szczepów *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* dowiodły, że z wyjątkiem regionu terminatora replikacji duplikacja genów zachodzi z dużą częstością w każdym regionie chromosomu, a duplikowany region może obejmować od kilku tysięcy par zasad do kilku milionów. Ilość genomowego DNA może być w określonych warunkach presji selekcyjnej nawet podwojona, bowiem w genomach szybko rosnących bakterii aż w 10% komórek badanych populacji identyfikowano przynajmniej jedną duplikację. Wzrost poziomu lekooporności związanego bezpośrednio z amplifikacją genów lekooporności obserwowano po raz pierwszy 30 lat temu dla szczepów *P. mirabilis* noszących plazmidy R100 i R222, rosnących w obecności niskich stężeń antybiotyków. Wzrost poziomu lekooporności był rezultatem amplifikacji r-determinant plazmidów (*resistance determinant region*), zawierających geny oporności na chloramfenikol, streptomycynę, tetracyklinę i sulfonamidy [61]. Podobne rezultaty opisano dla szczepu *Enterococcus faecalis* z plazmidem pAMa1, rosnącego w obecności tetracykliny. W tym wypadku wzrost poziomu lekooporności był wynikiem tandemowej duplikacji ośmiu genów leżących w regionie r-determinanty tego plazmidu [62]. Od tamtego czasu wzrost oporności na antybiotyki spowodowanej duplikacją lub amplifikacją genów plazmidowych i chromosomalnych opisano dla wielu szczepów i gatunków bakterii, aczkolwiek większość bezpośrednich danych uzyskano w hodowlach laboratoryjnych, w warunkach presji selekcyjnej antybiotyków, bowiem identyfikacja zmian typu GDA w warunkach naturalnych była bardzo trudna z racji komplikacji metodycznych [17, 59]. Trzeba jednak zaznaczyć, że tego typu zmiany genetyczne nie są stabilne z powodu ponoszonych kosztów materiałowych i energetycznych komórki, a także potencjalnych zagrożeń dla fizjologii komórki związanych z nadprodukcją białek kodowanych przez duplikowane lub amplifikowane geny. Stąd większość opisanych zmian jest odwracalna w czasie wzrostu bakterii w nieobecności antybiotyków. Utrwalane mogą być zduplikowane bądź zamplifikowane te geny, których produkty przynoszą określone korzyści adaptacyjne i przewagę selekcyjną w da-

nych warunkach. Duplikacje genów są rezultatem RecA-zależnej rekombinacji homologicznej zachodzącej pomiędzy długimi sekwencjami powtórzonymi (sekwencjami insercyjnymi, transpozonomi, operonami RNA, sekwencjami palindromowymi), a także rekombinacji RecA-niezależnej, zachodzącej pomiędzy bardzo krótkimi różnymi sekwencjami powtórzonymi jako wynik mechanizmu łączenia końców DNA NHEJ (*non homologous end joining mechanism*) [59]. Mechanizm amplifikacji genów zachodzi zaś na drodze RecA-zależnej rekombinacji homologicznej pomiędzy wytworzonymi uprzednio produktami duplikacji genów lub alternatywnie przy udziale replikacji DNA zgodnej z mechanizmem toczącego się koła (*rolling circle replication, RCR*) [63].

### **Systemy pomp błonowych (*efflux pumps*) ważnym elementem oporności bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki**

Zgromadzona wiedza na temat mechanizmów mutagenyzy, transformacji, koniugacji i transdukcji oraz znaczenia tych procesów w pojawianiu się, selekcji i rozsiewaniu lekoopornych szczepów w świecie bakterii jest w literaturze światowej dobrze ugruntowana. Jednakże w dobie ogromnego postępu dokonanego w ostatnich latach w poznawczych badaniach bakterii, w tym całych populacji hodowalnych i niehodowalnych bakterii środowiskowych, wciąż odkrywane są nowe elementy genetyczne oraz nowe molekularne mechanizmy, które pozwalają na lepsze zrozumienie złożoności zjawiska lekooporności na tle ewolucyjnej zmienności świata bakterii. Jednym z takich kierunków poszukiwań naukowych są badania roli białek transportowych w aktywnym usuwaniu z komórki różnych związków chemicznych, w tym barwników, biocydów, antybiotyków, metali ciężkich. Mechanizm aktywnego usuwania tego typu związków (*multidrug efflux pumps*) został opisany po raz pierwszy w latach 90. ubiegłego wieku dla szczepów *Staphylococcus aureus* opornych na kationowe bakteriocydy. Okazało się, że wielolekooporne szczepy *S. aureus* nosiły plazmidy kodujące syntezę białek transportowych QacA lub QacB, należących do dużej klasy transporterów MFS (*major facilitator superfamily*) [64]. Od tamtego czasu zidentyfikowano i scharakteryzowano wiele różnych klas i rodzin białek tych systemów, kodowanych zarówno przez plazmidy, jak i geny chromosomalne różnych gatunków bakterii: poznano ich fizjologiczną rolę w aktywnym transporcie wielu różnych związków i metabolitów, ustalono także poważny udział niektórych klas i rodzin białek

tych systemów w zjawisku wielolekooporności bakterii. W tym miejscu przedstawiamy zaledwie kilka przykładów tego typu lekooporności bakterii, a czytelników zainteresowanych tą problematyką odsyłamy do artykułów opublikowanych przez wybitnych specjalistów w tej dziedzinie [15, 65]. Jednym z przykładów udziału transporterów klasy MFS w lekooporności są białka *Escherichia coli* EmrB i EmrA, kodowane przez geny chromosomalne, które są zaangażowane w usuwanie z komórki kwasu nalidyksynowego i thiolaktomycyny, zaś nadekspresja z plazmidu innego białka transportowego MdFA znacząco zwiększa oporność szczepów tego gatunku na chloramfenikol oraz fluorochinolony [64, 66, 67]. Innymi przykładami udziału systemu MFS są białka transportowe NorA, NorB i NorC *Staphylococcus aureus*, które są odpowiedzialne za oporność na fluorochinolony i kationowe inhibitory, takie jak puromycyna i fosfonian tetrafenyli, oraz białko LmrP *Lactobacillus lactis*, odpowiedzialne za usuwanie z komórki daunomycyny, tetracyklin i makrolidów [68, 69, 70]. Bardzo ważną rolę w lekooporności bakterii Gram-ujemnych, w tym szczepów klinicznych, odgrywają transportery klasy RND (*resistance-nodulation-division*). Przykładami takich transporterów są białka ArcB i ArcD *Escherichia coli* oraz transportery MexB, MexD, MexF i MexY *Pseudomonas aeruginosa*, charakteryzujące się bardzo szeroką specyficznością substratową, bowiem mają zdolność usuwania z komórek nie tylko większości antybiotyków, lecz także barwników, detergentów, rozpuszczalników [71]. Geny kodujące syntezę białek transportowych klasy RND zidentyfikowano w chromosomalnym DNA większości gatunków bakterii Gram-ujemnych. Ustalono także, że mutacje w represorach tych genów prowadzą do derepresji genów strukturalnych i w konsekwencji do bardzo dużego wzrostu stopnia lekooporności szczepów na wszystkie antybakteryjne związki [18, 72]. Należy podkreślić, że systemy aktywnego usuwania biocydów i antybiotyków MFS i RND nie pojawiły się w świecie bakterii w odpowiedzi na masową produkcję i powszechne użycie tych leków, ale wyewoluowały dużo wcześniej i pełnią w warunkach naturalnych ważne funkcje fizjologiczne, takie jak: ochrona bakterii przed detergentami, udział w procesach patogenezy, usuwanie toksycznych związków i metabolitów wtórnych, transport cząsteczek sygnałowych [73].

## Podsumowanie

Reasumując, wrażliwa komórka bakterii staje się oporna na antybiotyki lub inne antybakteryjne związki jako rezultat różnorodnych procesów i molekularnych mechanizmów. Po pierwsze, oporność pojawia się w wyniku nabycia na drodze horyzontalnego transferu genów lekooporności preegzystujących w populacjach różnych gatunków i rodzajów bakterii i ich efektywnego wykorzystania. Ten mechanizm w literaturze angielskiej określa się pojęciem naturalnej oporności (*natural response*). Nabycie lekooporności może być również rezultatem mutacji genów, które w komórkach wrażliwych kodują syntezę molekularnych tarcz dla danych leków (*pro-active response*) lub mutacji tych genów nabytych od innych bakterii (*Post-active response*) [12, 74]. Najogólniej mówiąc, adaptacja bakterii do toksycznych stężeń antybiotyków jest rezultatem dziedzicznych zmian genetycznych (mutacje, HGT, systemy białek transportowych, GDA), które w zależności od mechanizmu działania poszczególnych antybiotyków mogą manifestować się fenotypowo w różny sposób: nabyciem zdolności degradacji, modyfikowania lub sekwestrowania antybiotyków, nadprodukcją enzymów odpowiedzialnych za te procesy, zahamowania szlaków transportu antybiotyków z otoczenia lub zmniejszenia przepuszczalności membran w wyniku mutacji genów kodujących białka poryn oraz indukcji systemów aktywnego usuwania leków z komórki. Dziedziczne zmiany genetyczne mogą prowadzić także do blokowania lub modyfikowania określonych docelowych dla antybiotyków tarcz molekularnych [15, 17].

W zakończeniu niniejszego artykułu przeglądowego należy jednak dodać, że stopień wrażliwości/oporności populacji komórek danego gatunku bakterii na antybiotyki, obok wcześniej omawianych uwarunkowań genetycznych, jest również odzwierciedleniem zróżnicowania fenotypowego komórek w całej populacji, a więc rezultatem niedziedzicznych uwarunkowań epigenetycznych [75]. Wykazano dla wielu gatunków bakterii, że antybiotyki – nawet w bardzo wysokich stężeniach – nie zabijają wszystkich komórek w populacjach wrażliwych, izogenicznych szczepów, a stąd subpopulacje komórek opornych na bójcze działanie badanych antybiotyków można nazwać komórkami uśpionymi metabolicznie, przetrwalnymi (*persister cells*). Tak nabyta oporność na dany antybiotyk zwana jest przejściową, bowiem takie komórki uśpione metabolicznie, przeniesione do nowego środowiska, podłoża wzrostowego,

stają się w krótkim czasie ponownie wrażliwe na antybiotyki [76, 77]. Zjawisko *persistance* stanowi istotny problem w antybiotykoterapii chorób infekcyjnych, np. gruźlicy, czy nawracających infekcjach układu moczowego, bowiem w warunkach odstawienia antybiotyków i osłabienia odporności immunologicznej gospodarza nawet nieliczne komórki *persistenter cells*, przeżywające antybiotykoterapię, podejmują wzrost i rozwój, stając się źródłem ponownych infekcji tkanek i narządów [77, 78]. W ostatnich latach sugeruje się także, że obserwowana większa oporność biofilmów na różne antybiotyki jest nie tylko wynikiem ograniczonej dyfuzji/penetracji antybiotyków w te złożone bakteryjne struktury, ale w znacznym stopniu rezultatem tworzenia w tych warunkach niewielkich subpopulacji komórek uśpionych metabolicznie. W sensie ewolucyjnym opisane wyżej zjawisko można traktować jako strategię generującą zróżnicowane fenotypowo populacje bakterii, stąd w zmieniających się warunkach naturalnych niektóre z tych subpopulacji stwarzają szansę uzyskania przez bakterie przewagi selekcyjnej [76].

## Piśmiennictwo

1. Luria SE, Delbrück M. Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics* 1943; 28(6): 491-511.
2. Lederberg J, Lederberg EM. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J Bacteriol* 1952; 63(3): 399-406.
3. Newcombe HB. Origin of bacterial variants. *Nature* 1949; 164(4160): 150.
4. Treffers hp. Drug resistance; today's research and to-morrow's medicine. *N Z Med J* 1954; 53(298): 561-568.
5. Taddei F, Matic I, Godelle B, Radman M. To be a mutator, or how pathogenic and commensal bacteria can evolve rapidly. *Trends Microbiol* 1997; 5(11): 427-428.
6. Mao EF, Lane L, Lee J, Miller JH. Proliferation of mutators in A cell population. *J Bacteriol* 1997; 179(2): 417-422.

7. Shaver AC, Dombrowski PG, Sweeney JY, Treis T, Zappala RM, Sniogowski PD. Fitness evolution and the rise of mutator alleles in experimental *Escherichia coli* populations. *Genetics*. 2002;162(2): 557-566.
8. LeClerc JE, Li B, Payne WL, Cebula TA. High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science* 1996; 274(5290): 1208-1211.
9. Matic I, Radman M, Taddei F, et al. Highly variable mutation rates in commensal and pathogenic *Escherichia coli*. *Science* 1997; 277(5333): 1833-1834.
10. Oliver A, Sánchez JM, Blázquez J. Characterization of the GO system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 2002;217(1):31-35.
11. Binnewies TT, Motro Y, Hallin PF et al. Ten years of bacterial genome sequencing: comparative-genomics-based discoveries. *Funct Integr Genomics* 2006; 6(3): 165-185.
12. Cantón R. Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clin Microbiol Infect* 2009;15 (1): 20-25.
13. Martínez JL. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science* 2008; 321(5887): 365-367.
14. Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8(4): 251-259.
15. Nikaïdo H. Multidrug resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem* 2009; 78: 119-146.
16. Ambur OH, Davidsen T, Frye SA, Balasingham SV, Lagesen K, Rognes T, Tønnum T. Genome dynamics in major bacterial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 2009; 33(3): 453-470.

17. Andersson DI, Hughes D. Gene amplification and adaptive evolution in bacteria. *Annu Rev Genet* 2009; 43: 167-195.
18. Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 2004; 64(2): 159-204.
19. Nagano K, Nikaido H. Kinetic behavior of the major multidrug efflux pump AcrB of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(14): 5854-5858.
20. Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*. 2000; 405(6784): 299-304.
21. Woodbury RL, Wang X, Moran CP Jr. Sigma X induces competence gene expression in *Streptococcus pyogenes*. *Res Microbiol* 2006; 157(9): 851-856.
22. Sibbald MJ, Ziebandt AK, Engelmann S, et al. Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006; 70(3): 755-788.
23. Stinear TP, Seemann T, Harrison PF, et al. Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res* 2008; 18(5): 729-741.
24. Johnsborg O, Håvarstein LS. Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Rev* 2009; 33(3): 627-642.
25. Claverys JP, Martin B, Polard P. The genetic transformation machinery: composition, localization, and mechanism. *FEMS Microbiol Rev* 2009; 33(3): 643-656.
26. Dorman CJ, Kane KA. DNA bridging and antibridging: a role for bacterial nucleoid-associated proteins in regulating the expression of laterally acquired genes. *FEMS Microbiol Rev* 2009; 33(3): 587-592.



27. Breitbart M, Rohwer F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends Microbiol* 2005; 13(6): 278-284.
28. Jaworski A, Dębska J, Stączek P. Metagenomika populacji wirusów i bakteriofagów środowiskowych. [w:] *Na pograniczu chemii i biologii*. T. XXIV. Wyd. Naukowe UAM, 2010, 11-13.
29. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005; 308(5728):1635-1638.
30. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature* 2007; 449(7164): 804-810.
31. Gill SR, Pop M, Deboy RT, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 2006; 312: 1355-1359.
32. Thies FL, König W, König B. Rapid characterization of the normal and disturbed vaginal microbiota by application of 16S rRNA gene terminal RFLP fingerprinting. *J Med Microbiol* 2007; 56: 755-761.
33. Grice EA, Kong HH, Renaud G, et al. A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Res*. 2008; 18(7): 1043-1050.
34. Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin Chem* 2009; 55(5): 856-866.
35. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The Human microbiome project. *Nature* 2007; 308: 804-810.
36. Curtis TP, Sloan WT, Scannell JW. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(16): 10494-10499.
37. Rohwer F. Global phage diversity. *Cell* 2003; 113(2): 141.
38. Hendrix RW. Bacteriophages: evolution of the majority. *Theor Popul Biol* 2002; 61(4): 471-480.

39. Griffith F. The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)*. 1928; 27(2): 113-159.
40. Johnsborg O, Eldholm V, Håvarstein LS. Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Res Microbiol* 2007; 158(10): 767-778.
41. Claverys JP, Håvarstein LS. Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'être. *Nat Rev Microbiol*. 2007; 5(3): 219-229.
42. Burghout P, Bootsma HJ, Kloosterman TG, Bijlsma JJ, de Jongh CE, Kuipers OP, Hermans PW. Search for genes essential for pneumococcal transformation: the RADA DNA repair protein plays a role in genomic recombination of donor DNA. *J Bacteriol* 2007; 189(18): 6540-6550.
43. Guiral S, Mitchell TJ, Martin B, Claverys JP. Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(24):8710-8715.
44. Johnsborg O, Eldholm V, Bjørnstad ML, Håvarstein LS. A predatory mechanism dramatically increases the efficiency of lateral gene transfer in *Streptococcus pneumoniae* and related commensal species. *Mol Microbiol* 2008; 69(1): 245-253.
45. Goodman SD, Scocca JJ. Factors influencing the specific interaction of *Neisseria gonorrhoeae* with transforming DNA. *J Bacteriol* 1991; 173(18): 5921-5923.
46. Dorman CJ. H-NS, the genome sentinel. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5(2): 157-161.
47. Kolling GL, Matthews KR. Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65(5): 1843-1848.

48. Narra HP, Ochman H. Of what use is sex to bacteria? *Curr Biol* 2006; 16(17): R705-10.
49. Economou A, Christie PJ, Fernandez RC, Palmer T, Plano GV, Pugley AP. Secretion by numbers: Protein traffic in prokaryotes. *Mol Microbiol*. 2006; 62(2): 308-319.
50. Christie PJ, Atmakuri K, Krishnamoorthy V, Jakubowski S, Cascales E. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol* 2005; 59: 451-485.
51. Williams LE, Detter C, Barry K, Lapidus A, Summers AO. Facile recovery of individual high-molecular-weight, low-copy-number natural plasmids for genomic sequencing. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72(7): 4899-4906.
52. Hall RM, Stokes HW. Integrons: novel DNA elements which capture genes by site-specific recombination. *Genetica* 1993; 90(2-3): 115-132.
53. Rowe-Magnus DA, Mazel D. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int J Med Microbiol* 2002; 292(2): 115-125.
54. Gillings M, Boucher Y, Labbate M, Holmes A, Krishnan S, Holley M, Stokes HW. The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *J Bacteriol* 2008; 190(14): 5095-5100.
55. Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4(8): 608-620.
56. Grohmann E, Muth G, Espinosa M. Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67(2): 277-301.
57. Rice LB. Tn916 family conjugative transposons and dissemination of antimicrobial resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(8): 1871-1877.

58. Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. Common regions e.g. orf513 and antibiotic resistance: IS91-like elements evolving complex class 1 integrons. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58(1): 1-6.
59. Sandegren L, Andersson DI. Bacterial gene amplification: implications for the evolution of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7(8): 578-588.
60. Yoon EJ, Kwon AR, Min YH, Choi EC. Foggy D-shaped zone of inhibition in *Staphylococcus aureus* owing to a dual character of both inducible and constitutive resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61(3): 533-540.
61. Hashimoto H, Rownd RH. Transition of the R factor NR1 and *Proteus mirabilis*: level of drug resistance of nontransitioned and transitioned cells. *J Bacteriol* 1975; 123(1): 56-68.
62. Clewell DB, Yagi Y, Bauer B. Plasmid-determined tetracycline resistance in *Streptococcus faecalis*: evidence for gene amplification during growth in presence of tetracycline. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72(5): 1720-1724.
- 63 Reams AB, Neidle EL. Selection for gene clustering by tandem duplication. *Annu Rev Microbiol* 2004; 58: 119-142.
64. Paulsen IT, Brown MH, Littlejohn TG, Mitchell BA, Skurray RA. Multidrug resistance proteins QacA and QacB from *Staphylococcus aureus*: membrane topology and identification of residues involved in substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(8): 3630-3635.
65. Higgins CF. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* 2007; 446(7137): 749-757.
66. Lomovskaya O, Lewis K. Emr, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(19): 8938-8942.

67. Nishino K, Yamaguchi A. EvgA of the two-component signal transduction system modulates production of the yhiUV multidrug transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*; 184(8): 2319-2323.
68. Neyfakh AA, Borsch CM, Kaatz GW. Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37(1): 128-129.
69. Truong-Bolduc QC, Strahilevitz J, Hooper DC. NorC, a new efflux pump regulated by MgrA of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(3): 1104-1107.
70. Mazurkiewicz P, Driessen AJ, Konings WN. Energetics of wild-type and mutant multidrug resistance secondary transporter LmrP of *Lactococcus lactis*. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1658(3): 252-261.
71. Tseng TT, Gratwick KS, Kollman J, Park D, Nies DH, Goffeau A, Saier MH Jr. The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1999; 1(1): 107-125.
72. Grkovic S, Brown MH, Skurray RA. Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; 66(4): 671-701.
73. Aires JR, Nikaido H. Aminoglycosides are captured from both periplasm and cytoplasm by the AcrD multidrug efflux transporter of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2005; 187(6): 1923-1929.
74. Garcillán-Barcia MP, de la Cruz F. Distribution of IS91 family insertion sequences in bacterial genomes: evolutionary implications. *FEMS Microbiol Ecol* 2002; 42(2): 303-313.
75. Smits WK, Kuipers OP, Veening JW. Phenotypic variation in bacteria: the role of feedback regulation. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4(4): 259-271.
76. Dhar N, McKinney JD. Microbial phenotypic heterogeneity and antibiotic tolerance. *Curr Opin Microbiol* 2007; 10(1): 30-38.

77. Gefen O, Gabay C, Mumcuoglu M, Engel G, Balaban NQ. Single-cell protein induction dynamics reveals a period of vulnerability to antibiotics in persister bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(16): 6145-6149.

78. Stewart GR, Robertson BD, Young DB. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nat Rev Microbiol* 2003; 1(2): 97-105.

### **Adres do korespondencji**

Prof. dr hab. Adam Jaworski

Instytut Nauk o Zdrowiu, Społeczna Akademia Nauk

90-113 Łódź, ul. Sienkiewicza 9

e-mail: adam@biol.uni.lodz.pl