

Mikobakterilerde Dışa Atım Pompaları ve İlaç Direnci

Nur Merve KAYA, Zeynep SARIBAŞ

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Tüberküloz, halen önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. *Mycobacterium tuberculosis*'teki ilaç direnç mekanizmalarının anlaşılması, hastalığın kontrolü açısından önem taşımaktadır. *M. tuberculosis*'te ilaç direnci, başlıca, ilaç hedefi olan veya ilacı aktive edici enzimleri kodlayan genlerdeki spontan kromozomal mutasyonlara bağlı gelişir de, direnç, sadece bu mutasyonlarla açıklanamamaktadır. Hücre duvar geçirgenliğinin düşük olması, dışa atım pompaları ve inaktive edici enzimler mikobakterilerde ilaç direncine neden olan diğer mekanizmalardır. Bu derlemede *M. tuberculosis*'te yeni ilaç direnç mekanizması ve olası yeni ilaç hedefi olabilecek, dışa atım pompaları tartışılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis*, ilaç direnci, dışa atım pompası

SUMMARY

Efflux Pumps and Drug Resistance in Mycobacteria

Tuberculosis still remains an important health problem. Understanding the mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* is important in the control of the disease. Although drug resistance in *M. tuberculosis* is mainly due to spontaneous chromosomal mutations in genes encoding drug target or drug activating enzymes, the resistance cannot be explained only by these mutations. Low permeability of the cell wall, efflux pumps and drug inactivating enzymes are other mechanisms of drug resistance in mycobacteria. In this review efflux pumps, as new mechanisms of drug resistance and probable targets of novel drugs, in *M. tuberculosis*, were discussed.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, drug resistance, efflux pump

GİRİŞ

Tüberküloz hızlı tanı yöntemlerinin kullanılması ve sıkı kontrol stratejilerinin uygulanmasına rağmen, günümüzde yüksek oranlarda ölüme neden olan, önemli bir enfeksiyon hastalığı olmaya devam etmektedir. Tüberküloz ilaçlarının geliştirilmesi ve kullanıma girmesi tüberkülozun kontrolünde önemli bir basamak oluşturmuşsa da özellikle çok ilaca dirençli tüberküloz olguları günümüzde önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Mikobakterilerdeki ilaç direnç mekanizmalarının açıklığa kavuşturulması hastalığın kontrolü açısından büyük önem taşımaktadır.

DİŞA ATIM POMPALARI

Genel olarak incelediğimizde, bakteriler çevrelerindeki toksik bileşiklere ve ilaçlara karşı kendilerini korumak amacıyla çeşitli direnç mekanizmaları geliştirmektedir. Bu mekanizmalar dört grupta toplanabilir. Bunlar, bakterinin toksik bileşikleri ve ilaçları

inaktif hale getiren enzimler üretmesi; enzimatik modifikasyonlar ve mutasyonlarla hücrel hedefte değişiklik oluşturması; toksik bileşik ve ilaçların girişi yollarını kapatarak hücre içine alımının engellenmesi; içeri alınan toksik bileşik ve ilaçların, dışa atım pompalarını kullanarak dışarı atılmasıdır ⁽¹⁻³⁾.

Dışa atım pompaları, biyoenerji ve yapısal profillerine göre sekonder çok ilaca direnç pompaları ve ABC tip çok ilaca direnç pompaları olmak üzere iki grupta toplanabilir ^(4,5). Sekonder çok ilaca direnç pompaları transmembran elektrokimyasal yük farkını kullanarak dışa atımı gerçekleştirir ⁽¹⁾. Sekonder tip çok ilaca direnç pompaları “Major Facilitator Superfamily (MFS)”, “Small Multidrug Resistance (SMR)”, “Resistance Nodulation Cell Division (RND)”, “Multidrug And Toxic Compound Extrusion (MATE)” olarak dört grup altında toplanmaktadır ^(1,6). MFS grubundaki dışa atım pompaları, basit şekerler, inositoller, ilaçlar gibi çeşitli molekülleri dışarı atan 12-14 transmembran segmentli proteinlerden oluşmaktadır ⁽¹⁾.

Alındığı tarih: 03.08.2012

Kabul tarihi: 30.08.2012

Yazışma adresi: Zeynep Sarıbaş, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sıhhiye, Ankara

e-posta: zsaribas@hacettepe.edu.tr

Nur Merve Kaya'nın yeni adresi: World Medicine İlaç San. ve Tic. Ltd. Şti, Güneşli-Bağcılar, İstanbul

ABC tip dışı atım pompaları ise ATP hidrolizisinde serbest kalan enerjiyi kullanarak molekülleri hücre dışına atarlar. İki sitoplazmik alt ünite, iki hidrofobik transmembran alt üniteden oluşmaktadır. Substratın yerine göre dışı atım ve içe alım olarak görev yapabilirler ^(1,7,8).

MİKOBAKTERİLERDE DIŞI ATIM POMPALARI ve İLAÇ DİRENCİ

Mikobakterilerde doğal direnç, mikobakteri hücre duvar yapısı ve aktif çok ilaca direnç pompaları ile sağlanmaktadır. Mikobakteri hücre duvarında mikolik asit bulunmaktadır. Mikolik asit, toksik bileşiklere ve tüberküloz ilaçlarına bariyer olarak görev yapmaktadır. *M. tuberculosis*'te dışı zardan çeşitli moleküllerin hücre içine girişi farklı yollarla olmaktadır. Hidrofobik moleküller lipid tabakada çözünerek penetrasyon yoluyla içeri girerken, küçük hidrofilik moleküller ise küçük porinlerden içeriye girmektedir. Polikationik moleküllerin geçişleri ise hala netlik kazanmamıştır. Hücre zarının, moleküllerin hücre içine girişini sınırlandıran bir yapıya sahip olması, doğal dirençte rol oynayan önemli bir mekanizmadır. Ancak bu mekanizma, mikobakterilerdeki direnci açıklamakta yetersizdir. Bu mekanizmaya sinerjistik çalışan diğer bir mekanizma ise dışı atım pompalarıdır. Bu mekanizma hücre içine giren moleküllerin hücre içi konsantrasyonunu azaltmak amacıyla çalışmaktadır ^(6,9).

M. tuberculosis'te MFS ailesine ait pompaları kodladığı düşünülen genlerin olduğu gösterilmiştir. Bu dışı atım pompalarının izoniazid, rifampin, tetrasiklin, eritromisin, kanamisin gibi tüberküloz ilaçlarına karşı oluşan dirençten sorumlu olduğu düşünülmektedir ^(1,10). SMR ailesi, sekonder tip dışı atım pompalarının en küçük ailesini oluşturmaktadır. Tetrafenil fosfoniyum, etidyum bromid, eritromisin, akriflavin, safarin O, pironin Y gibi bileşiklerin dışı atımından sorumlu tutulmaktadır. *M. tuberculosis*'te SMR ailesine ait Mmr dışı atım pompalarının varlığı gösterilmiştir. RND ailesi ise tüm canlı organizmalarda bulunmaktadır, fakat sadece gram negatif bakterilerde ilaç direnci ile ilişkilendirilmiştir ⁽¹⁾. Bu tip dışı atım pompaları zar füzyon proteini ve dışı zar proteininin yapısal organizasyonu ile dışı atımı gerçekleştirir. Eritromisin, novobiosin, sodyum dodesil sulfat gibi bileşikler bu pompa aracılığıyla hücre dışına atıl-

maktadır. *M. tuberculosis* genomu bu aileye ait proteinleri kodlayan 13 gen bulundurmaktadır. Bu proteinler mikobakteri türlerine özgül olmalarından dolayı mikobakteri zar proteini olarak adlandırılmaktadır ⁽¹⁰⁾.

ABC tipi dışı atım pompalarını kodlayan genler, *M. tuberculosis* genomunun %2,5'ini oluşturmaktadır. *M. tuberculosis*'de 37 tam veya tam olmayan ABC dışı atım pompası tanımlanmıştır ve bunlardan bazıları ilaç direnci ile ilişkilendirilmektedir ^(3,7).

Tüberküloz tedavisinde kullanılan ilk sıra ilaçlardan olan izoniazid bir ön ilaçtır. Katalaz tarafından aktive edilir. Mikobakteri hücrelerine mikolik asit sentezini ve katalaz-peroksidoz sistemini inhibe ederek veya NAD tarafından düzenlenen enzimatik reaksiyonların inhibisyonu ile etki etmektedir. Mikobakteri katalazı, *katG* geni tarafından kodlanır. *katG* geninde oluşan mutasyon sonucunda inaktif enzim oluşur ve bunun sonucunda izoniazid aktif hale dönüşmez. İsoniazid direncine neden olan mutasyonların görüldüğü diğer gen bölgeleri ise *inhA*, *ahpC-oxvR* bölgeleridir. Bu gen bölgelerindeki mutasyonlar klinik *M. tuberculosis* izolatlarındaki oluşan direncin %70-80'ini açıklayabilmektedir. İsoniazid dirençli *M. tuberculosis* klinik izolatlarının yaklaşık %20-30'unda bilinen gen mutasyonları bulunmamakta ve bu da başka mekanizmaların rol oynadığını düşündürmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar izoniazid direncinde klasik direnç mekanizmalarının dışında çeşitli genlerin *M. tuberculosis*'de sorumlu olduğunu gösterir niteliktedir ⁽³⁾. Pasca ve ark'nın ⁽¹¹⁾ yapmış olduğu çalışmada, *M. tuberculosis*'de bulunan, hipotetik RND transporterı kodlayan *mmpL7* geni, *M. smegmatis*'e entegre edilmiş ve bu genin izoniazidin dışı atımı ile ilişkili olduğu gösterilmeye çalışılmıştır. Araştırmacılar izoniazidin hücre içi birikiminin dışı atım pompa inhibitörü eklendiğinde, arttığını gözlemişlerdir. Başka bir çalışmada ise *M. tuberculosis*'de ve *iniA* geninin dışı atım pompasıyla ilişkili olduğu ve bu genin delesyonunun izoniazid ve etambutol duyarlılığında artışa neden olduğu belirtilmektedir ⁽¹²⁾.

Tüberküloz tedavisinde önemli yeri olan bir ilaç da rifampindir. Rifampin, RNA polimeraz β ünitesine bağlanarak etki etmektedir. RNA polimeraz β ünitesini kodlayan *rpoB*'de mutasyon dirence neden olmaktadır. Dirençli izolatların %95'inde, *rpoB*

geninde bulunan, “rifampin direncini belirleyen bölge”deki mutasyonlar sorumlu tutulmaktadır. Bu mutasyonların bulunmadığı *M. tuberculosis* izolatlarında rifampin direncinin saptanması ve yine *rpoB* geninde mutasyon bulunmadığı halde rifampine doğal dirençli kabul edilen *M. smegmatis*, *M. avium*, *M. intracellulare* izolatlarının varlığı, direnç gelişiminde *rpoB* genindeki mutasyonlardan başka mekanizmaların da rol oynadığını düşündürmektedir^(3,11,13). Jiang ve ark.’nın⁽¹⁴⁾ yaptığı çalışmada, 1499 *M. tuberculosis* izolatında, dışa atım pompalarının kodladığı genlerin ekspresyonunu ve ilaç direnci gösterilmiştir. Dışa atım pompalarını kodladığı düşünülen *Rv1258c*, *Rv1410c*, *Rv1819c* genlerinin ekspresyon seviyeleri “gerçek zamanlı RT PCR” ile test edilmiştir. İzoniazid ve rifampin varlığında *Rv1258c* ve *Rv1410c* dışa atım pompa genlerinin transkripsiyonu artmaktadır. *Rv1819c* geni ise isoniazid varlığında aşırı eksprese olmaktadır. Sonuç olarak, bazı *M. tuberculosis* klinik izolatlarında bazı genlerin aşırı ekspresyonu çok ilaca direnç veya isoniazid direnci ile ilişkilendirilmiştir.

Pirazinamid, tüberküloz tedavisine eklenmesiyle tedavi süresini kısaltmış önemli bir tüberküloz ilacıdır. Hücre içine girdikten sonra pirazinamidaz enzimi tarafından pirazinoik aside çevrilir. Asidik ortamda aktiftir. Pirazinamid direncinden yaklaşık %70 oranında *pncA* genindeki mutasyonlar sorumludur^(3,15). Pirazinoik asidin aktif dışa atım mekanizması ile hücre dışına atıldığı ve bir dışa atım pompa inhibitörü olan rezepin eklendiğinde *M. tuberculosis* duyarlılığında 3 kat artış olduğu bildirilmektedir⁽¹⁶⁾.

Florokinolonlar ve aminoglikozidler de tüberküloz tedavisinde kullanılmaktadır. Florokinolonlar DNA girazı inhibe ederek etki ederler. Bu ilaç grubuna direnç, A ve B ünitelerini kodlayan *gyrA* ve *gyrB*’de mutasyonlar sonucunda gelişmektedir⁽³⁾. Mikobakteri türlerinden *M. smegmatis*’te *LfrA* dışa atım pompası ve *M. tuberculosis*’te ise *Rv1634* dışa atım pompası florokinolon direnci ile ilişkilendirilmiştir^(10,17). Diğer bir çalışmada *Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c* operonu, siprofloksasin direnci ile ilişkilendirilen ABC tip taşıyıcıları kodladığı ileri sürülmektedir⁽⁵⁾.

Aminoglikozidler ise, 16sRNA’ya bağlanarak transasyonun başlamasını ve protein sentezini inhibe ederek etki eder. *rrs*, *rpsL* ve *gidB* genindeki mutas-

yonlar dirence neden olmaktadır. Mikobakterilerde oluşan direncin %65-%67’sini bu mutasyonlar oluşturmaktadır⁽³⁾. Spies ve ark.’nın⁽¹⁸⁾ yapmış oldukları çalışmada, düşük düzey streptomisin direncinde, dışa atım pompalarının da etkisi olduğu belirtilmektedir.

Mikobakterilerde dışa atım pompası *M. smegmatis*’te gösterilmiş bir mekanizmadır⁽¹⁹⁾. Son yıllarda *M. tuberculosis*’de de dışa atım pompalarının varlığı ve ilaç direncindeki etkileri gösterilmeye çalışılmaktadır. Çalışmalar olumlu sonuç vermeye devam ederse dışa atım pompaları, yeni geliştirilecek anti-tüberküloz ilaçların hedefi olabilir.

KAYNAKLAR

1. Putman M, van Veen HW, Konings WN. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64:672-93. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.64.4.672-693.2000> PMID:11104814 PMCID:99009
2. Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57:1486-513. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.004> PMID:15939505
3. Louw GE, Warren RM, Gey van Pittius NC, McEvoy CRE, Van Helden PD, Victor TC. A balancing act: efflux/influx in mycobacterial drug resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:3181-9. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01577-08> PMID:19451293 PMCID:2715638
4. Borges-Walmsley MI, Walmsley AR. The structure and function of drug pumps: an update. *Trends Microbiol* 2001; 9:71-9. [http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01920-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01920-X)
5. Pasca MR, Gugliera P, Arcesi F, Bellinzoni M, De Rossi E, Riccardi G. *Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c*, an ABC fluoroquinolone efflux pump in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:3175-78. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.48.8.3175-3178.2004> PMID:15273144 PMCID:478549
6. Niederweis M. Mycobacterial porins – new channel proteins in unique outer membranes. *Mol Microbiol* 2003; 49:1167-77. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03662.x> PMID:12940978
7. Braibant M, Gilot P, Content J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Rev* 2000; 24:449-67. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00550.x> PMID:10978546
8. McKeegan KS, Borges-Walmsley MI, Walmsley AR. Structural understanding of efflux-mediated drug resistance: potential routes to efflux inhibition. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4:479-86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2004.07.002> PMID:15351352
9. Nikaido H. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Semin Cell Dev Biol* 2001; 12:215-23. <http://dx.doi.org/10.1006/scdb.2000.0247> PMID:11428914
10. De Rossi E, Arrigo P, Bellinzoni M, et al. The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily (MFS) in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Med* 2002; 8:714-24. PMID:12520088 PMCID:2039957
11. Pasca MR, Gugliera P, De Rossi E, Zara F, Riccardi G. *mmpL7* gene of *Mycobacterium tuberculosis* is responsible for isoniazid efflux in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:4775-7.

- <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.11.4775-4777.2005>
PMid:16251328 PMCID:1280163
12. **Colangeli R, Helb D, Sridharan S, et al.** The *Mycobacterium tuberculosis* *iniA* gene is essential for activity of an efflux pump that confers drug tolerance to both isoniazid and ethambutol. *Mol Microbiol* 2005; 55:1829-40.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04510.x>
PMid:15752203
 13. **Obata S, Zwolska Z, Toyota E, et al.** Association of *rpoB* mutations with rifampicin resistance in *Mycobacterium avium*. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27:32-9.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.015>
PMid:16368226
 14. **Jiang X, Zhang W, Zhang Y, et al.** Assessment of efflux pump gene expression in a clinical isolate *Mycobacterium tuberculosis* by real-time reverse transcription PCR. *Microb Drug Resist* 2008; 14:7-11.
<http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2008.0772>
PMid:18321205
 15. **Juréen P, Werngren J, Toro JC, Hoffner S.** Pyrazinamide resistance and *pncA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:1852-4.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00110-08>
PMid:18316515 PMCID:2346646
 16. **Zhang Y, Permar S, Sun Z.** Conditions that may affect the results of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Med Microbiol* 2002; 51:42-9.
PMid:11800471
 17. **Liu J, Takiff HE, Nikaido H.** Active efflux of fluoroquinolones in *Mycobacterium smegmatis* mediated by *LfrA*, a multidrug efflux pump. *J Bacteriol* 1996; 178:3791-5.
PMid:8682782 PMCID:232638
 18. **Spies FS, da Silva PEA, Ribeiro MO, Rossetti ML, Zaha A.** Identification of mutations related to streptomycin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and possible involvement of efflux mechanism. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:2947-9.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01570-07>
PMid:18541729 PMCID:2493096
 19. **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 USA* 1996;93:362-6.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.93.1.362>
PMid:8552639 PMCID:40238