

Kinga Bondarczuk^{1*}, Sławomir Sułowicz¹, Zofia Piotrowska-Seget¹

¹Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach

Wpłynęło w maju 2013 r.

1. Wstęp. 2. Mechanizm działania ampicyliny. 3. Inaktywacja ampicyliny przez β -laktamazy. 4. Obniżenie powinowactwa białek PBP do antybiotyków β -laktamowych. 5. Aktywny eksport ampicyliny przez białka należące do systemu efflux. 6. Ograniczenie przepuszczalności osłon komórkowych. 7. Podsumowanie

Molecular basis of bacterial resistance to ampicillin

Abstract: β -lactam antibiotics are regularly used in medicine to control bacterial infections. However the overuse of these compounds in many human activities has led to dissemination of resistance determinants among pathogenic strains. Several mechanisms underlining β -lactam resistance, e.g. enzymatic inactivation, PBP modification, active efflux, and finally the reduction of cell wall permeability have been identified. Understanding of such mechanisms is the first step to overcome the resistance. Ampicillin was one of the first broad-spectrum amino penicillins introduced to therapy. Nowadays, five decades after the introduction of the antibiotic, ampicillin-resistant microbes are isolated all over the world. Current knowledge about the mechanisms involved in ampicillin resistance is presented in this review.

1. Introduction. 2. Ampicillin mode of action. 3. Inactivation of ampicillin by β -lactamases. 4. Changes in the affinity of PBP to β -lactams. 5. Efflux system-mediated resistance to ampicillin. 6. Reduction in cell envelope permeability. 7. Conclusions

Słowa kluczowe: ampicylina, antybiotykooporność, β -laktamazy

Key words: ampicillin, antibiotic resistance, β -lactamases

1. Wstęp

Antybiotyki β -laktamowe to jedna z najczęściej stosowanych grup leków przeciwdrobnoustrojowych na świecie. Jednakże szerokie, a także często niewłaściwe wykorzystanie tych związków przyczyniło się do selekcji oporności wśród bakterii, w tym bakterii patogennych. Pojawienie się szczepów takich, jak MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*), czy też BLNAR (β -lactamase negative ampicillin resistant) stanowi obecnie poważne zagrożenie dla hospitalizowanych pacjentów. Tuż po wprowadzeniu na rynek, tj. w latach 60 ubiegłego wieku, ampicylina wykazywała aktywność zarówno względem bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych. Jednakże w wyniku rozprzestrzeniania się bakterii opornych, skuteczność omawianego leku drastycznie spadła. Znanych jest kilka mechanizmów warunkujących oporność bakterii na ampicylinę: produkcja β -laktamaz, zmiany w strukturze białek wiążących penicylinę, eksport antybiotyku z komórki za pomocą białkowych systemów efflux oraz zmiany w przepuszczalności osłon komórkowych. Charakterystyka wymienionych mechanizmów stanowi przedmiot niniejszego opracowania.

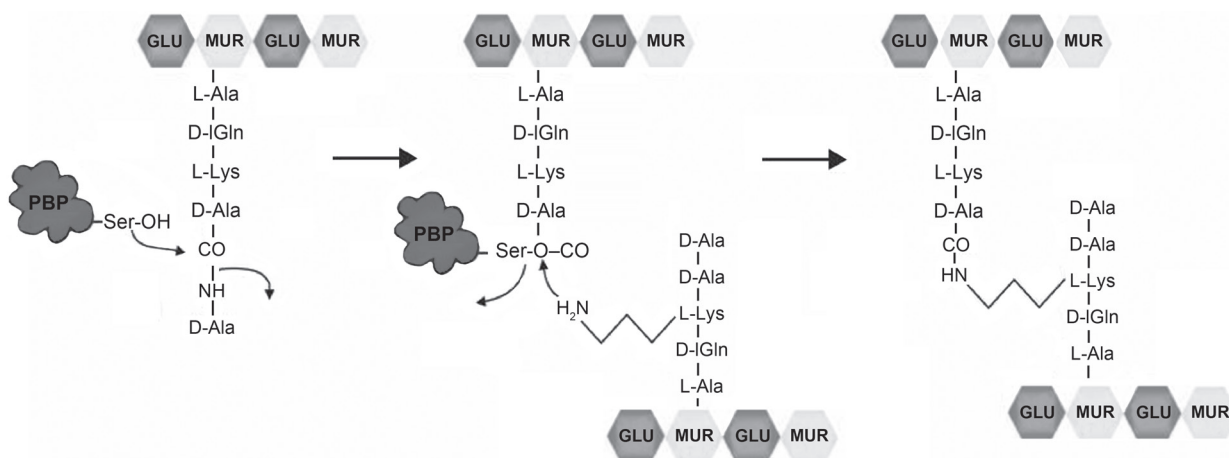
2. Mechanizm działania ampicyliny

Ampicylina jest antybiotykiem β -laktamowym, należącym do grupy aminopenicylin. O aktywności tych antybiotyków decyduje pierścień β -laktamowy,

którego struktura przestrzenna przypomina sekwencję D-Ala-D-Ala w peptydzie łączącym łańcuchy mureiny. W związku z tym podobieństwem, antybiotyki β -laktamowe są mylnie rozpoznawane przez białka wiążące penicylinę – PBP (Penicillin Binding Proteins), uczestniczące w ostatnich etapach syntezy mureiny [8, 21].

Enzymy PBP podzielono na trzy klasy (A, B i C). Białka zgrupowane w klasie B wykazują aktywność transpeptydazy i katalizują tworzenie wiązań między peptydami sąsiadujących łańcuchów cukrowych w mureinie. Do klasy A zalicza się enzymy, które przeprowadzając reakcje transpeptydacji oraz transglikozylacji, biorą udział w polimeryzacji peptydoglikanu. Klasa C charakteryzuje się aktywnością karboksypeptydazy (czasami również endopeptydazy) i może uczestniczyć w zmianie stopnia usieciowania mureiny [27]. W obrębie domen transpeptydazy oraz karboksypeptydazy znajdują się konserwatywne sekwencje: (K/H)(S/T)G, SXXK oraz SXN współtworzące centrum aktywne. Kluczowym elementem mechanizmu katalitycznego tych enzymów jest, wchodząca w skład motywu SXXK, seryna. Atakuje ona grupę karbonylową przedostatniej D-alaniny w pentapeptydzie połączonym z łańcuchem cukrowym, powodując uwolnienie ostatniej D-alaniny. W wyniku reakcji acylacji powstaje związany kowalencyjnie kompleks (produkt pośredni) z wiązaniem estrowym łączącym serynę i przedostatnią D-alaninę. W przypadku transpeptydaz wiązanie estrowe jest następnie atakowane przez grupę aminową

* Autor korespondencyjny: Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski; Jagiellońska 28, 40-032 Katowice; e-mail: kkrysta@us.edu.pl



Rys. 1. Mechanizm działania białek wiążących penicylinę (opis w tekście). Skróty: GLU-N-acetylglikozaamina; MUR – kwas N-acetylmuraminowy. Na podstawie [33]

trzeciej reszty aminokwasowej w kolejnym pentapeptydzie, związanym z sąsiadującym łańcuchem cukrowym. W ten sposób powstaje wiązanie sieciujące mureinę (Rys. 1). Natomiast w przypadku DD-karboxypeptydaz dochodzi do hydrolizy produktu pośredniego [33].

Mylnie rozpoznana przez białka PBP grupa karbonylowa w pierścieniu β -laktamowym antybiotyku jest atakowana przez serynę. Otwarcie pierścienia prowadzi do utworzenia kompleksu z acylovanym enzymem, którego hydroliza przebiega na tyle wolno, iż dochodzi do efektywnego zablokowania aktywności enzymu. Równoczesne zahamowanie syntezy peptydoglikanu oraz konstytutywne procesy związane z jego degradacją doprowadzają do uszkodzenia ściany komórkowej, zwiększenia jej przepuszczalności, a w ostateczności do lizy komórki [8, 33].

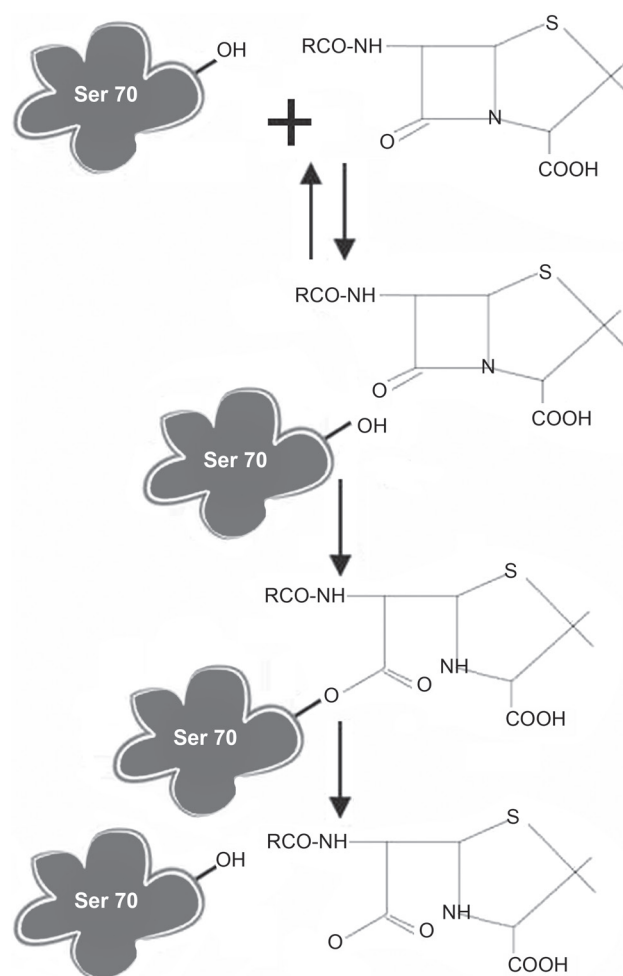
3. Inaktywacja ampicyliny przez β -laktamazy

Kluczowym mechanizmem oporności na antybiotyki β -laktamowe jest inaktywacja tych związków poprzez β -laktamazy. Są to bakteryjne enzymy, katalizujące rozcięcie pierścienia β -laktamowego, które prawdopodobnie wyewoluowały z białek wiążących penicylinę. Obecnie jest znanych ponad 850 β -laktamaz [8, 25].

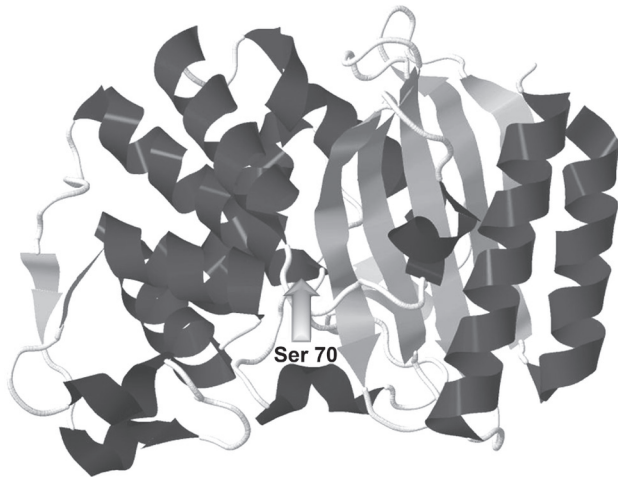
Wyróżnia się dwa główne systemy klasyfikacji tych enzymów. Pierwszy z nich oparto na homologii sekwencji aminokwasowych i obejmuje on cztery klasy: A, B, C i D (klasyfikacja Amblera). Do klas A, C, D należą β -laktamazy serynowe, natomiast klasa B grupuje tzw. metalo- β -laktamazy, posiadające cynk w centrum aktywnym. W drugim systemie (klasyfikacja Bush-Jacoby, 2009), bazującym na klasyfikacji funkcjonalnej, jako kryteria przyjęto profile substratów i inhibitorów, wyróżniając grupy 1–4 [8].

Mechanizm działania β -laktamaz serynowych polega na acylacji antybiotyków β -laktamowych, co prowadzi

do otwarcia pierścienia β -laktamowego, a następnie deacylacji w obecności cząsteczki wody. Ostatecznym produktem katalizowanej reakcji jest zatem cząsteczka nieaktywnego antybiotyku (z rozciętym pierścieniem β -laktamowym), a uwolniony enzym tworzy kompleksy z kolejnymi cząsteczkami antybiotyku (Rys. 2) [8].



Rys. 2. Mechanizm działania β -laktamaz serynowych na przykładzie TEM-1. Na podstawie [8, 20]



Rys. 3. Struktura przestrzenna β -laktamazy TEM-1 u *E. coli*. Na rysunku zaznaczono serynę biorącą udział w acylacji cząsteczki antybiotyku β -laktamowego (Ser70) (RCSB PDB ID: 1ZG4) [29]

Zależne od cynku metalo- β -laktamazy cechuje odmienny mechanizm działania. W procesie hydrolizy pierścienia β -laktamowego wykorzystywana jest grupa hydroksylowa pochodząca z cząsteczki wody, koordynowanej przez cynk [2, 8].

Należąca do klasy A, β -laktamaza TEM-1 determinuje oporność na ampicylinę u około 50% szczepów *Escherichia coli*. Jest ona najbardziej rozpowszechnioną β -laktamazą u bakterii Gram-ujemnych. Wykorzystuje się ją jako modelowy enzym w badaniach nad β -laktamazami. Kodujący ją gen *bla*_{TEM-1} zlokalizowano na transpozonach Tn2 i Tn3 [9, 20]. TEM-1 jest białkiem zbudowanym z 263 reszt aminokwasowych. Jego masa molekularna wynosi 28,9 kDa. W cząsteczce tego enzymu można wyróżnić dwie domeny. Jedna z nich posiada w swojej strukturze 8 helis α , natomiast w skład drugiej wchodzi zarówno helisy α , jak i β -harmonijki. W obszarze wspólnego oddziaływania obu domen (interface) znajduje się centrum aktywne. Miejsce aktywne jest tworzone przez pięć reszt aminokwasowych: Ser70, Lys73, Glu166, Ser130 i Lys234. Występująca w obrębie pierwszej domeny Ser70, odgrywa kluczową rolę w katalizowanej przez TEM-1 reakcji acylacji (Rys. 3) [29].

4. Obniżenie powinowactwa białek PBP do antybiotyków β -laktamowych

Innym mechanizmem warunkującym oporność bakterii na antybiotyki β -laktamowe jest obniżenie powinowactwa białek wiążących penicylinę do β -laktamów. Zjawisko to opisano m.in. u szczepów MRSA, opornych w zasadzie na wszystkie antybiotyki należące do omawianej grupy. Obserwowana u tych bakterii niewrażliwość na β -laktamy, wiąże się z obecnością dodatkowego białka PBP2a (inna nazwa PBP2').

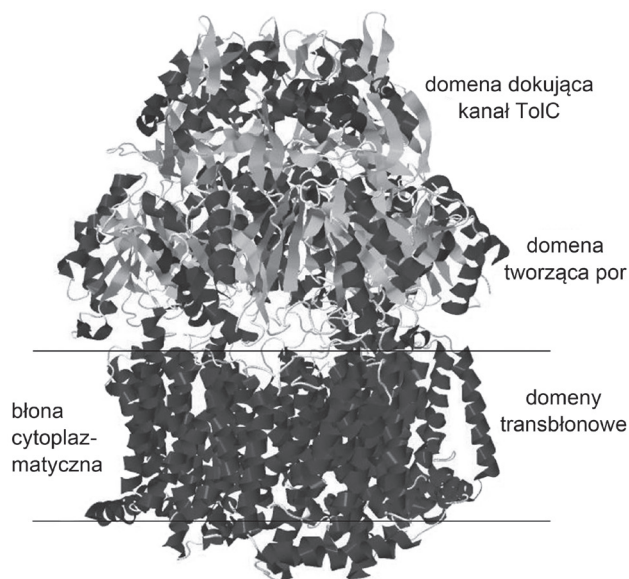
Katalizuje ono reakcję acylacji z wydajnością niższą o 1–3 rzędy wielkości w porównaniu z pozostałymi czterema niezmiennymi PBP [33].

Podobną wydajnością charakteryzuje się białko PBP5fm występujące u *Enterococcus faecium*. U szczepów wykazujących oporność na ampicylinę zaobserwowano nadprodukcję białka PBP5fm, a także jego obniżone powinowactwo do antybiotyku, będące wynikiem mutacji punktowych. Ten drugi mechanizm najprawdopodobniej pozwala na osiągnięcie oporności na wyższe stężenia leku. Przypuszcza się, że PBP5fm może przejmować funkcję transpeptydazy w procesie syntezy peptydoglikanu, kiedy pozostałe białka wiążące penicylinę są inhibowane antybiotykami β -laktamowymi [28, 33].

W strukturze przestrzennej białka PBP5fm zbudowanego z 570 reszt aminokwasowych, można wyróżnić dwie domeny. Region N-końcowej domeny do 162 reszty aminokwasowej ma budowę globularną i składa się z dwóch helis α oraz jednej trzyniciowej antyrównoległej β -kartki. Wspomniana β -kartka w kierunku C-końca przechodzi w dwuniciową równoległą strukturę i łączy obie domeny. Domena N-końcowa nie wykazuje aktywności transglikozylazy i jej rola pozostaje niejasna. Istnieje hipoteza wskazująca na możliwość udziału N-końcowej domeny we właściwym fałdowaniu domeny C-końcowej lub też w interakcjach z innymi białkami. C-końcowa domena wykazuje aktywność transpeptydazy o obniżonym powinowactwie do antybiotyków β -laktamowych. Posiada ona dwie poddomeny: jedną zbudowaną z β -kartki pokrytej helisami α oraz drugą, tworzoną jedynie przez helisy α . Pomiedzy poddomenami jest ułożone miejsce aktywne z Ser422, która pełni kluczową rolę w katalizowanej reakcji. Za obniżone powinowactwo do antybiotyków β -laktamowych przypuszczalnie odpowiada obecność Val1465 w pobliżu miejsca aktywnego, która może utrudniać dostęp antybiotyku, a także występowanie mostka solnego między grupą guanidynową Arg464 a grupą karboksylową Asp481. Opisane interakcje Arg464 mogą być przyczyną zmian w konformacji przestrzennej, co miałoby wpływ na obniżenie powinowactwa do antybiotyku. Mutacja prowadząca do zamiany w pozycji 485 metioniny na treoninę lub alaninę przypuszczalnie obniża wydajność acylacji, natomiast insercja seryny w miejsce 466' prawdopodobnie przyczynia się do przemieszczenia Val1465, ograniczając dostęp antybiotyku do miejsca aktywnego, i tym samym zdolność do rozpoznawania substratu przez enzym [28].

5. Aktywny eksport ampicyliny przez białka należące do systemu efflux

Antybiotyki β -laktamowe mogą być również efektywnie usuwane z komórki za pomocą białek należących do systemu efflux. Przykładowo, ampicylina jest



Rys. 4. Struktura AcrB (RCSB PDB ID: 1IWG) [23]

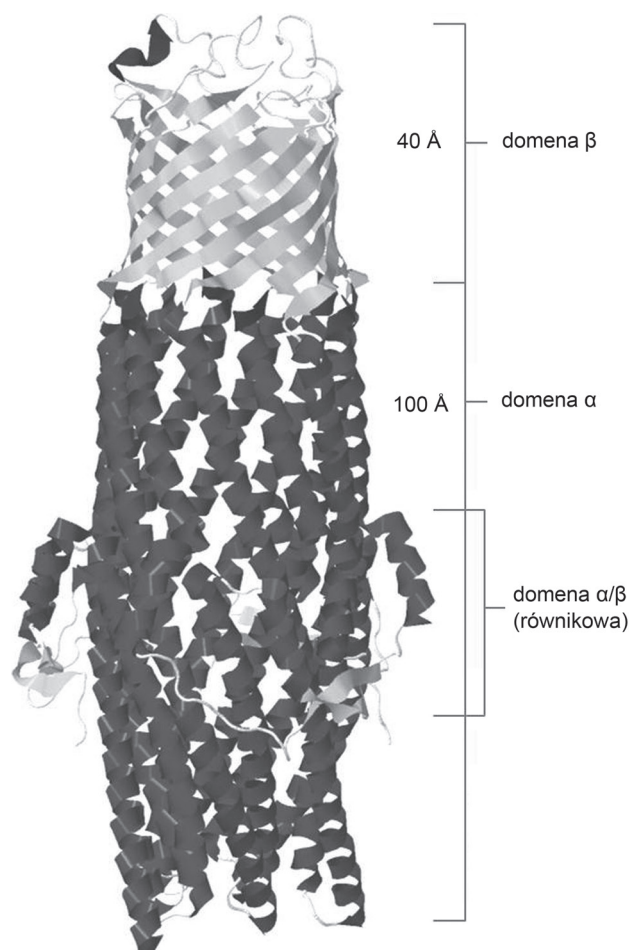
rozpoznawana jako substrat przenośnika AcrB, występującego u *E. coli*. AcrB to obecnie jedno z najintensywniej badanych białek należących do superrodziny RND (Resistance-Nodulation-Cell Division), warunkujące oporność wielolekową [18]. Antyporter AcrB jest częścią trójskładnikowego kompleksu. W procesie eksportu współpracuje z należącym do rodziny MFP (Membrane Fusion Protein) białkiem peryplazmatycznym AcrA, a także kanałem błony zewnętrznej TolC zaklasyfikowanym do rodziny OMF (Outer Membrane Factor), tworząc system AcrAB-TolC. Wymienione trzy białka są niezbędne w procesie usuwania antybiotyków, brak nawet jednego z nich powoduje utratę aktywności całego kompleksu [14, 23, 24].

Trimer AcrB jest zbudowany z trzech protomerów o długości 1049 reszt aminokwasowych (Rys. 4). Każdą z trzech domen transbłonowych wyznacza dwanaście transbłonowych helis α . Domeny transbłonowe formują pierścien w błonie komórkowej. Helisy czwarta i dziesiąta posiadają Asp407, Asp408 i Lys940 biorące udział w przenoszeniu protonu. Pętle pomiędzy helisami pierwszą i drugą oraz siódmą i ósmą tworzą dwie duże peryplazmatyczne domeny. Funkcjonalny trimer AcrB jest stabilizowany przez łącznikowe pętle, wystające z jednego monomeru w kierunku sąsiedniego monomeru. Peryplazmatyczna część AcrB składa się z dwóch domen: podzielonej na dwie subdomeny DN i DC, domeny dokującej kanał TolC (TolC docking domain) oraz posiadającej 4 subdomeny (PN1, PN2, PC1 i PC2), domeny tworzącej por (pore/porter domain). Struktura przestrzenna domeny dokującej TolC przypomina lejek (funnel-like structure) zwężający się w kierunku otworu (central pore), znajdującego się w domenie tworzącej por. Otwór tworzą trzy helisy α dostarczone przez subdomeny PN1 z każdego monomeru. Prowadzi

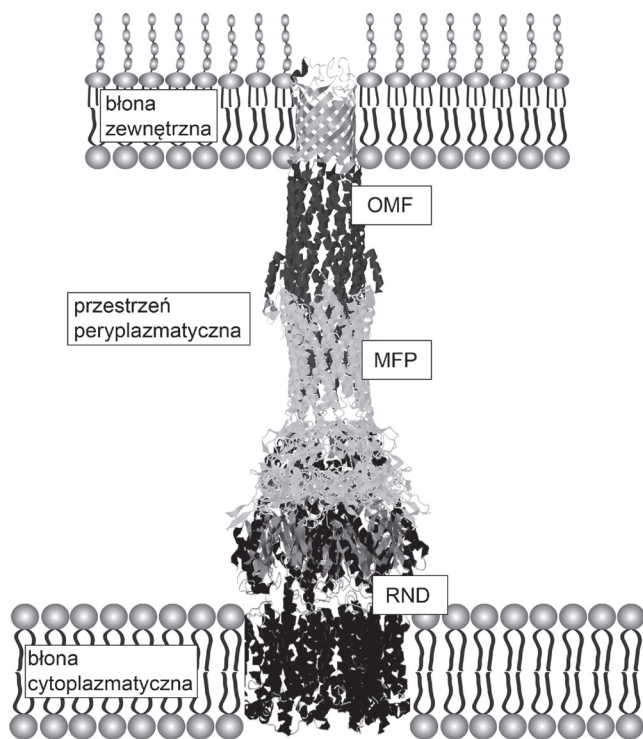
on do miejsca aktywnego zlokalizowanego w pobliżu płaszczyzny błony komórkowej. Do miejsca aktywnego prowadzą również znajdujące się tuż nad powierzchnią błony, pomiędzy monomerami, przedsionki (vestibules) [3, 23, 26].

Obecnie przyjęty model zakłada cykliczne zmiany konformacyjne poszczególnych monomerów AcrB w kolejnych etapach przenoszenia substratu. W pierwszej fazie transportu monomer wiąże substrat (konformacja L od loose), a następnie transportuje go z domeny transbłonowej do kieszeni wiążącej substrat (przejście z konformacji L do konformacji T, od tight), skąd jest uwalniany do kanału TolC (przyjęcie konformacji O od open) [26].

Białko TolC to zbudowany z trzech monomerów (o długości 428 reszt aminokwasowych), zakotwiczony w błonie zewnętrznej kanał, który sięga 100 Å w głąb peryplazmy (Rys. 5). Przypomina kształtem cylinder, otwarty od góry i zwężający się w kierunku błony cytoplazmatycznej. W cząsteczce TolC wyróżniono trzy domeny: zakotwiczoną w błonie zewnętrznej domenę β (o długości 40 Å), peryplazmatyczną domenę α oraz równikową domenę α/β . Domena β posiada strukturę dwunastoniciowej antyrównoległej beczulki β , natomiast domena peryplazmatyczna – strukturę antyrównoległej



Rys. 5. Struktura TolC (RCSB PDB ID: 1EK9) [15]



Rys. 6. Model funkcjonalnego systemu RND u bakterii Gram-ujemnych (stworzono wykorzystując struktury białek dostępne w bazie RCSB PDB: 1EK9, 1IWG, 3FPP) [15, 23, 29, 32]

beczułki α , którą tworzy dwanaście helis α . Helisy α tej drugiej domeny występują w dwóch typach. Długie (67 aminokwasów) helisy H3 i H7 przechodzą przez całą długość domeny, natomiast krótsze helisy H2, H6 oraz H4, H8 (odpowiednio 23 oraz 34 aminokwasy) tworzą pary H2-H4, H6-H8, niejako naśladując długie, nieprzerwane helisy. Te krótkie helisy łączą domenę α z domeną równikową. Domenę α/β tworzą trzy helisy: H1, H5, H9 oraz nici S3 i S6, układające się w pas wokół środkowej części domeny α (stąd „równikowa domena”). Na końcu beczułki α skręcone helisy (coiled coils) zamykają światło kanału, pozostawiając otwór o średnicy zaledwie 3,9 Å (zamknięty stan). Natomiast w aktywnym kompleksie AcrAB-TolC, kanał ten pozostaje otwarty [1, 11, 14, 15].

Możliwość kontaktu transportera AcrB z kanałem TolC jest ograniczona, ponieważ peryplazmatyczna domena tego pierwszego ma długość około 70 Å. Stąd pojawia się konieczność istnienia dodatkowego białka łącznikowego. Tę funkcję spełnia AcrA, które tworzy kompleks z AcrB i rekrutuje TolC [31].

Wydłużone, o sierpowatym kształcie białko AcrA posiada cztery domeny: α -helikalną szpilkę do włosów o strukturze skręconych helis (coiled coil α -helical hairpin), domenę liponianową (lipoyl domain), domenę o charakterze beczułki β oraz najbliższą błonie cytoplazmatycznej, domenę o strukturze rolady (membrane proximal β -roll domain, MP). Modularność i elastyczność umożliwiają białku AcrA pełnienie funkcji

łącznika w kompleksie RND (choć obecnie uznawany model nie wyklucza aktywnego udziału AcrA w procesie transportu). Domena szpilki do włosów odpowiada za interakcje z TolC, natomiast pozostałe oddziałują z AcrB. Wielodomenowa struktura tego łącznika pozwala na ruchy zawiasowe między trzema pierwszymi domenami, a także ruchy rotacyjne domeny MP. AcrA uszczelnia połączenie białek AcrB i TolC i niejako ustanawia integralny, aktywny system AcrAB-TolC o długości 270 Å, obejmujący błonę cytoplazmatyczną, peryplazmę i błonę zewnętrzną (Rys. 6) [10, 13, 22, 31].

6. Ograniczenie przepuszczalności osłon komórkowych

Wykazano, iż z opornością na antybiotyki β -laktamowe mogą wiązać się także zmiany w przepuszczalności osłon komórkowych, związane z modyfikacjami poryn lub też obniżeniem poziomu ekspresji tych białek [5, 6, 19].

Hydrofilowe antybiotyki β -laktamowe przenikają przez błonę zewnętrzną dzięki ulokowanym w niej porynom. U *Mycobacterium smegmatis* główną poryną, stanowiącą ponad 70% wszystkich poryn, jest MspA. U mutantów z delecją genu *mspA* oraz *mspC*, kodującego podobną do MspA porynę, wykryto znaczny, 16-krotny wzrost poziomu oporności na ampicylinę [4, 30].

Omawiany mechanizm oporności zidentyfikowano również u jednego z patogenów wywołujących ciężkie zakażenia szpitalne, *Klebsiella pneumoniae*. Ten odporny na antybiotyki β -laktamowe mikroorganizm, oprócz wytwarzania β -laktamaz, nie wykazywał aktywności poryn OmpK35 i OmpK36, co hamowało transport leków do wnętrza komórki bakteryjnej [7, 12, 17].

Wydaje się jednak, iż zmiany w przepuszczalności osłon komórkowych mogą odgrywać pomniejszą rolę w oporności bakterii na antybiotyki, stanowiąc uzupełnienie innych mechanizmów [6, 16].

7. Podsumowanie

Ampicylina jest przedstawicielem antybiotyków β -laktamowych o rozszerzonym spektrum działania. Jej skuteczność w zwalczaniu bakteryjnych infekcji gwałtownie spadła wskutek rozprzestrzeniania się antybiotykooporności. Głównym mechanizmem warunkującym oporność bakterii na ampicylinę jest produkcja β -laktamaz, rozcinających pierścieni β -laktamowy. β -laktamazy to różnorodna grupa enzymów, wśród których wyróżniono β -laktamazy serynowe oraz metalo- β -laktamazy. Innym czynnikiem zmniejszającym wrażliwość bakterii na ampicylinę jest obniżenie

powinowactwa białek PBP do omawianego antybiotyku. Co więcej, białkowe systemy efflux umożliwiają aktywny eksport ampicyliny z komórki, natomiast zmiany w przepuszczalności osłon komórkowych ograniczają jej wnikanie.

Piśmiennictwo

- Bavro V.N., Pietras Z., Furnham N., Pérez-Cano L., Fernández-Recio J., Pei X. Y., Misra R., Luisi B.: Assembly and channel opening in a bacterial drug efflux machine. *Mol. Cell*, **30**, 114–121 (2008)
- Bebrone C.: Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem. Pharmacol.* **74**, 1686–1701 (2007)
- Blair J.M.A., Piddock L.J.V.: Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 512–519 (2009)
- Danilchanka O., Pavlenok M., Niederweis M.: Role of porins for uptake of antibiotics by *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 3127–3134 (2008)
- Dé E., Baslé A., Jaquinod M., Saint N., Mallaé M., Molle G., Pagès J.M.: A new mechanism of antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae* induced by structural modification of the major porin. *Mol. Microbiol.* **41**, 189–198 (2001)
- Denyer S.P., Maillard J.Y.: Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 35S–45S (2002)
- Doménech-Sánchez A., Hernández-Allés S., Martínez-Martínez L., Benedí V.J., Albertí S.: Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*: its role in β -lactam antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* **181**, 2726–2732 (1999)
- Drawz S., Bonomo R.A.: Three decades of β -lactamase inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**, 160–201 (2010)
- Fisette O., Morin S., Savard P.Y., Lagüe P., Gagné S.M.: TEM-1 backbone dynamics – insights from combined molecular dynamics and nuclear magnetic resonance. *Biophys. J.* **98**, 637–645 (2010)
- Ge Q., Yamada Y., Zgurskaya H.: The C-terminal domain of AcrA is essential for the assembly and function of the multidrug efflux pump AcrAB-TolC. *J. Bacteriol.* **191**, 4365–4371 (2009)
- Higgins M.K., Eswaran J., Edwards P., Schertler G.F.X., Hughes C., Koronakis V.: Structure of the ligand-blocked periplasmic entrance of the bacterial multidrug efflux protein TolC. *J. Mol. Biol.* **342**, 697–702 (2004)
- Jacoby G.A., Mills D.M., Chow N.: Role of β -lactamases and porins in resistance to ertapenem and other β -lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 3203–3206 (2004)
- Kim H.M., Xu Y., Lee M., Piao S., Sim S.H., Ha N.Ch., Lee K.: Functional relationships between the AcrA hairpin tip region and the TolC aperture tip region for the formation of the bacterial tripartite efflux pump AcrAB-TolC. *J. Bacteriol.* **192**, 4498–4503 (2010)
- Koronakis V.: TolC – the bacterial exit duct for proteins and drugs. *FEBS Lett.* **555**, 66–71 (2003)
- Koronakis V., Sharff A., Koronakis E., Luisi B., Hughes C.: Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*, **402**, 914–919 (2000)
- Lambert P.A.: Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 46–54 (2002)
- Lee Ch. H., Chia J.H., Chu Ch., Wu T.L., Liu J.W., Su L.H.: *In vivo* selection of OmpK35-deficient mutant after cefuroxime therapy for primary liver abscess caused by *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**, 857–860 (2006)
- Lim S.P., Nikaido H.: Kinetic parameters of efflux of penicillins by the multidrug efflux transporter AcrAB-TolC of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 1800–1806 (2010)
- Livermore D.M.: Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**, 247–250 (2001)
- Livermore D.M.: β -lactamases – the threat renews. *Curr. Protein. Pept. Sc.* **10**, 397–400 (2009)
- Mainardi J.L., Villet R., Bugg T.D., Mayer C., Arthur M.: Evolution of peptidoglycan biosynthesis under the selective pressure of antibiotics in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 386–408 (2008)
- Mikolosko J., Bobyk K., Zgurskaya H., Ghosh P.: Conformational flexibility in the multidrug efflux system protein AcrA. *Structure*, **14**, 577–587 (2006)
- Murakami S., Nakashima R., Yamashita E., Yamaguchi A.: Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature*, **419**, 587–593 (2002)
- Nikaido H., Takatsuka Y.: Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochim. Biophys. Acta*, **1794**, 769–781 (2009)
- Peitsaro N., Polianskyte Z., Tuimala J., Pörn-Ares I., Liobikas J., Speer O., Lindholm D., Thompson J. Eriksson O.: Evolution of a family of metazoan active-site-serine enzymes from penicillin-binding proteins: a novel facet of the bacterial legacy. *BMC Evol. Biol.* **8**, 26 (2008)
- Pos K.M.: Drug transport mechanism of the AcrB efflux pump. *Biochim. Biophys. Acta*, **1794**, 782–793 (2009)
- Powell A.J., Tomberg J., Deacon A.M., Nicholas R.A., Davies Ch.: Crystal structures of penicillin-binding protein 2 from penicillin-susceptible and -resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* reveal an unexpectedly subtle mechanism for antibiotic resistance. *J. Biol. Chem.* **284**, 1202–1212 (2009)
- Sauvage E., Charlier P. i wsp.: The 2.4-Å crystal structure of the penicillin-resistant penicillin-binding protein PBP5fm from *Enterococcus faecium* in complex with benzylpenicillin. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 1223–1232 (2002)
- Stec B., Holtz K.M., Wojciechowski Ch.L., Kantrowitz E.R.: Structure of the wild-type TEM-1 β -lactamase at 1.55 Å and the mutant enzyme Ser70Ala at 2.1 Å suggest the mode of noncovalent catalysis for the mutant enzyme. *Acta Crystallogr. D.* **61**, 1072–1079 (2005)
- Stephan J., Mailaender C., Etienne G., Daffé M., Niederweis M.: Multidrug resistance of a porin deletion mutant of *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 4163–4170 (2004)
- Symmons M.F., Bokma E., Koronakis E., Hughes C., Koronakis V.: The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 7173–7178 (2009)
- Yum S., Ha N.C. i wsp.: Crystal Structure of the Periplasmic Component of a Tripartite Macrolide-Specific Efflux Pump. *J. Mol. Biol.* **387**, 1286–1297 (2009)
- Zapun A., Contreras-Martel C., Vernet T.: Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 361–385 (2008)