

УДК 579.61:579.252.2

ЭФФЛЮКС СИСТЕМЫ *SERRATIA MARCESCENS*© 2014 г. А. М. Марданова*,¹, Л. М. Богомольная**, Ю. Д. Романова*, М. Р. Шарипова*

*Казанский федеральный университет

**Техасский аграрно-технический университет, Техас, США

Поступила в редакцию 15.03.2013 г.

Широко распространенная в окружающей среде грамотрицательная бактерия *Serratia marcescens*, относящаяся к семейству *Enterobacteriaceae*, является оппортунистическим патогеном и характеризуется множественной лекарственной устойчивостью. Одним из механизмов резистентности к антибиотикам и другим антибактериальным препаратам у микроорганизмов является активный вывод этих соединений из клетки с помощью эффлюкс систем. У энтеробактерий эффлюкс системы наиболее полно изучены у *Escherichia coli* и *Salmonella enterica* ser. Typhimurium. Для клеток *S. marcescens* описаны только несколько эффлюкс систем, относящихся к разным семействам. Обзор посвящен анализу данных по эффлюкс системам *S. marcescens*. Проведен сравнительный анализ организации генов систем RND-типа у разных видов р. *Serratia* и других видов энтеробактерий. Биоинформационный анализ генома *S. marcescens* позволил нам идентифицировать новые, ранее не изученные эффлюкс системы на основе гомологии с генами соответствующих систем *E. coli*. Идентификация всего арсенала эффлюкс систем в геноме *S. marcescens* позволит выяснить особенности физиологии, определить потенциал устойчивости и выявить новые молекулярные механизмы резистентности.

Ключевые слова: *Serratia marcescens*, эффлюкс помпы, устойчивость к антибиотикам, биоинформационный анализ, гены-ортологи.

DOI: 10.7868/S0026365614010091

ВВЕДЕНИЕ

Грамотрицательные бактерии рода *Serratia*, в частности, *S. marcescens*, широко распространены в окружающей среде (воде, почве, растениях, насекомых и животных) и относятся к оппортунистическим патогенам, вызывающим заболевания у человека, животных и насекомых [1, 2]. Эти бактерии связаны с инфекциями респираторного и мочевого трактов, раневыми инфекциями, а также могут быть причиной септицемий, менингитов, эндокардитов [3–5]. Серьезную опасность *S. marcescens* представляет для ослабленных пациентов [6–8]. Лечение инфекций, вызванных *S. marcescens*, часто затруднено из-за того, что бактерии обладают множественной устойчивостью к широкому спектру антибиотиков. Эти микроорганизмы устойчивы к пенициллину G, макролидам, клиндамицину, гликопептидам, рифампину, многие штаммы обычно устойчивы к ампициллину, амоксициллину, ампициллин-сульбактему, широкому спектру цефалоспоринов, цефамицинам, нитрофурантоину и др. [2].

Открытие новых антибиотиков и синтез хемотерапевтических агентов чрезвычайно ценны для

человечества, поскольку позволяют победить многие из ранее неизлечимых инфекционных болезней. Однако широкомасштабная антибиотикотерапия сопровождается повсеместным распространением бактерий, устойчивых к лекарствам, особенно бактерий с множественной устойчивостью. В бактериальной клетке существует несколько механизмов, обеспечивающих лекарственную устойчивость, включая деградацию или модификацию лекарств, изменение мишеней, появление альтернативных путей и насосы, выбрасывающие лекарства из клетки [9, 10]. Среди механизмов лекарственной устойчивости важную роль играют эффлюкс системы, локализованные в ЦПМ. К настоящему времени описано большое количество эффлюкс систем, отвечающих за множественную лекарственную устойчивость у многих видов грамположительных и грамотрицательных бактерий [11–13]. Однако физиологические функции эффлюкс систем не ограничиваются участием в устойчивости к антибиотикам, они значительно шире. Эффлюкс системы бактерий играют ключевую роль в поведении бактерий в экосистемах: они обеспечивают выведение токсичных внутриклеточных метаболитов, клеточный гомеостаз, передачу межклеточных сигналов и др. [14–18]. Кроме того, эффлюкс системы играют важную роль в вирулентности бактерий: они

¹ Автор для корреспонденции (e-mail: mardanovaayslu@mail.ru).

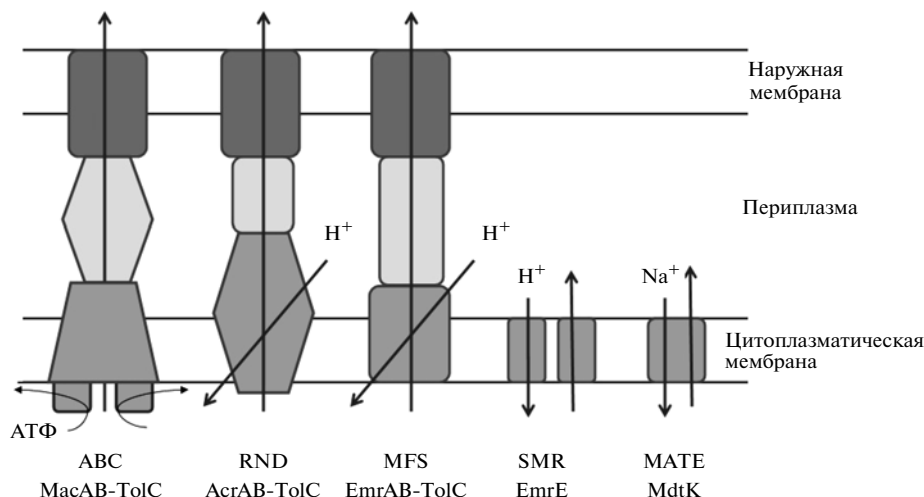


Рис. 1. Эффлюкс насосы у прокариот (*Escherichia coli*). ABC: ATP-Binding Cassette transporters (MacAB-TolC); RND: Resistance nodulation division (AcrAB-TolC); MFS: Major Facilitator Superfamily (EmrAB-TolC); SMR: Small multidrug resistance (EmrE); MATE: Multidrug And Toxic compound Extrusion (MdtK).

транспортируют из клетки адгезины, токсины и белки, важные для колонизации и инфицирования клеток человека, животных и растений [12, 19–21]. Показано, что инактивация эффлюкс системы AcrAB-TolC приводила к снижению вирулентности *S. enterica* ser. Typhimurium в мышах [22] и неспособности колонизировать органы цыплят [23]. Бактерии *Pseudomonas aeruginosa* с инактивированной эффлюкс помпой MexAB-OprM, относящейся к RND-типу насосов, не способны убивать даже мышей, дефицитных по лейкоцитам, в то время как исходный штамм *P. aeruginosa* вызывал у мышей смертельную инфекцию [19]. Доказана роль эффлюкс систем в формировании биопленок. В частности, показано, что в биопленках происходит индукция экспрессии некоторых эффлюкс систем [24, 25]. С другой стороны, в биопленках клетки *E. coli* становятся более устойчивыми к антибиотикам, что может быть обусловлено разными механизмами, в том числе и активацией эффлюкс систем [26]. Ингибиторы эффлюкс систем приводят к подавлению образования биопленок [27] и рассматриваются как перспективные антимикробные препараты [28].

Таким образом, изучение эффлюкс систем важно как с фундаментальной, так и с практической точек зрения. Это позволит выяснить молекулярные механизмы поведения бактерий в популяциях и их взаимоотношений в экосистемах, а также поможет решить проблему борьбы с множественной лекарственной устойчивостью патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Поиск, изучение физиологических функций, характеристика свойств эффлюкс систем патогенных бактерий позволит найти новые мишени для создания эффективных лекарственных средств.

В обзоре обсуждаются данные об эффлюкс системах *S. marcescens*, проведена сравнительная характеристика организации генов известных систем RND-типа, методами биоинформационного анализа в геноме *S. marcescens* идентифицированы гены эффлюкс систем по гомологии с известными генами энтеробактерий.

КЛАССИФИКАЦИЯ ЭФФЛЮКС СИСТЕМ

В настоящее время эффлюкс помпы множественной лекарственной устойчивости (MDR от multidrug resistance) подразделяют на 2 класса: ABC-транспортеры и вторичные транспортеры множественной лекарственной устойчивости [29]. Основным различием этих классов является источник энергии, используемый для транспорта. Системы ABC-типа используют энергию гидролиза АТФ, в то время как вторичные транспортеры используют протонную движущую силу. ABC-транспортеры составляют одно семейство, а вторичные транспортеры по результатам гомологии аминокислотных последовательностей и вторичной структуре подразделяются на четыре семейства: MFS (the Major Facilitator Superfamily), MATE (the Multidrug And Toxic compound Extrusion), SMR (the Small Multidrug Resistance) и RND (Resistance-Nodulation-Division) [30–33]. Схематично строение этих систем представлено на рис. 1.

Транспортные системы ABC-типа являются эволюционно консервативными от бактерий до человека и экспортируют огромное количество субстратов за счет гидролиза АТФ. Эти системы содержат трансмембранный и нуклеотид-связывающий домены, которые могут находиться на одном или отдельных белках [34]. Пермеазы, формирующие пору в цитоплазматической мем-

бране, обычно содержат 6 трансмембранных доменов и имеют тенденцию к образованию димеров. Примером такой системы у грамотрицательных бактерий является система MacAB *E. coli* [35].

С клинической точки зрения наиболее значимыми являются RND-системы, функционирующие как протон/антибиотик антипортеры [36]. Они широко распространены среди грамотрицательных бактерий и катализируют активный выброс широкого спектра антибактериальных соединений, включая многие антибиотики и химиопрепараты. Типичной бактериальной системой является AcrAB-TolC *E. coli* [37, 38]. Эти помпы состоят из трех компонентов: белка внутренней мембраны (AcrB) с 12 трансмембранными доменами и двумя большими периплазматическими петлями, так называемого мембранного белка-адаптора (membrane fusion protein, MFP) (AcrA) и белка, формирующего канал во внешней мембране (TolC) [39–41].

MFS-семейство включает огромное количество белков и является наиболее разнообразным семейством среди вторичных транспортеров. MFS-белки имеют 12 или 14 трансмембранных доменов. Примерами таких систем являются EmrAB и MdfA помпы *S. enterica* ser. Typhimurium [22].

Белки из семейства MATE имеют схожую топологию с белками MFS. Однако они составляют отдельную группу из-за низкой гомологии аминокислотных последовательностей. Эти белки имеют 12 трансмембранных доменов и используют градиент натрия для экспорта токсичных компонентов, подобных фторхинолонам, аминоклизидам и катионным ядам. К этому семейству относят системы NorE *E. coli* и MdtK *S. enterica* ser. Typhimurium [22, 42].

Члены SMR-семейства являются небольшими белками, состоящими из 107–110 аминокислотных остатков. Такие белки содержат четыре трансмембранных домена и формируют тетрамеры в цитоплазматической мембране. Число SMR-транспортеров, связанных с устойчивостью к антибиотикам, относительно мало. Примером таких эффлюкс систем является SsmE *S. marcescens* [43].

Экспрессия эффлюкс систем контролируется двукомпонентными сигнально-сенсорными системами (BaeS-BaeR, CpxA-CpxR, EvgS-EvgA), а также специфичными репрессорами (AcrR, AcrS, MarA, EmrR и др.) [9]. Например, контроль экспрессии помпы AcrAB-TolC осуществляется на нескольких уровнях: локально экспрессия контролируется репрессором AcrR [44], а на более высоком уровне – стрессовыми условиями и такими регуляторами, как MarA, SoxS и Rob [45, 46, 9].

В семействе *Enterobacteriaceae* MDR эффлюкс системы хорошо изучены у *E. coli* и *S. enterica* ser. Typhimurium. Гены, кодирующие MDR эффлюкс системы *E. coli*, клонированы, их продукты класифицированы и изучены соответствующие помпы [47].

Таблица 1. Эффлюкс системы *Serratia marcescens*

Тип эффлюкс помп	Название системы	Источник
RND	SdeAB,	[49, 50]
	SdeCDE	[53]
	SdeXY	[58]
MFS	SmfY	[69]
ABC	SmdAB	[73]
SMR	SsmE	[43]

ЭФФЛЮКС-СИСТЕМЫ, ОПИСАННЫЕ У *S. MARCESCENS*

В *S. marcescens* охарактеризованы несколько эффлюкс систем, относящихся к четырем семействам (табл. 1).

RND-эффлюкс системы *S. marcescens*. Берланга с соавт. в 2000 г впервые описали активный выброс лекарств клетками *S. marcescens* [48]. Кумар и Воробек сообщили о выбросе фторхинолона помпой SdeAB, относящейся к RND-типу эффлюкс систем [49]. Позднее идентифицирован белок HasF, который являлся гомологом TolC-белка *E. coli* и компонентом внешней мембраны SdeAB-помпы. Гены оперона *sdeAB* были клонированы, и соответствующие белки охарактеризованы [50]. Функциональный анализ продуктов генов оперона *sdeAB* *S. marcescens* с использованием антибиотикочувствительного штамма *E. coli* AG102MB с делецией по гену *acrB* позволил выяснить роль насоса в устойчивости бактерии. Введение плазмиды, содержащей *sdeAB* locus, в штамм *E. coli* AG102MB приводило к повышению устойчивости ко всем тестируемым антимикробным соединениям. Показано, что SdeAB помпа может выбрасывать из клетки фторхинолоны, а также такие антимикробные соединения, как хлорамфеникол, новобиоцин, SDS (детергент), этидиум бромид и *n*-гексан. Исключение составил только новобиоцин [50]. Ген *sdeA* кодирует периплазматический белок-адаптор, а *sdeB* кодирует транспортер RND насоса. В качестве компонента внешней мембраны идентифицирован белок HasF – гомолог TolC-белка *E. coli*. Других гомологов гена *tolC* в геноме *S. marcescens* не обнаружено [51]. Ранее перед locusом *sdeAB* в ДНК был идентифицирован ген *sdeR*, транскрибирующийся в противоположном направлении от *sdeAB*. Аминокислотная последовательность SdeR на 40% гомологична последовательности MarA-белка *E. coli*, активатора транскрипции AcrAB-TolC эффлюкс системы [45, 52]. Для выяснения роли белков SdeAB, HasF и SdeR в *S. marcescens* были получены делеционные мутанты по соответствующим генам. Эксперименты с мутантными штаммами показали, что HasF является единственным компонентом внешней мембраны SdeAB-помпы. Было предположено, что SdeR яв-

ляется активатором *sdeAB* и повышает общую множественную устойчивость *S. marcescens* [53]. Однако позднее установлено, что SdeR-белок вовлечен в регуляцию другой эффлюкс системы и не влияет на экспрессию SdeAB-помпы [54]. Оказалось, что SdeAB эффлюкс система обеспечивала также устойчивость бактерий к биоцидам и, в частности, к четвертичным соединениям аммония, которые широко используются в больницах как дезинфектанты [55]. Чтобы оценить вклад эффлюкс системы SdeAB в устойчивость к фторхинолону, была исследована экспрессия гена *sdeB* в 45 клинических изолятах *Serratia* [56]. Методом ПЦР в реальном времени показано, что экспрессия *sdeB* в 20 изолятах (44%) была повышена. Восемь из 20 изолятов (40%) были полностью устойчивы к одному из тестируемых фторхинолонов, в то время как остальные 12 (60%) были чувствительны ко всем тестируемым фторхинолонам. Полученные результаты позволили сделать заключение о том, что изменение фенотипа от чувствительности к резистентности, являющееся причиной неэффективности антибиотиков в терапии инфекции, может быть результатом увеличения экспрессии этой помпы. Методом транспозонного мутагенеза идентифицирован ген *sdeS*, находящийся перед стартовой точкой оперона *sdeAB*, кодирующий белок из 159 а.о. с высокой степенью гомологии к регулятору транскрипции типа VadM. Установлено, что SdeS функционирует как репрессор оперона *sdeAB*, связываясь с операторным сайтом в промоторе *sdeAB* оперона. Показано, что природные биоцид-устойчивые клетки имеют поврежденный ген *sdeS* и депрессированный оперон *sdeAB* [54]. Сделано предположение о том, что в природной среде различные антимикробные агенты могут инактивировать SdeS. Похожий механизм предложен для регуляции экспрессии AcrAB помпы *S. Typhimurium* природным индуктором индолом [33]. Индол активирует транскрипцию регуляторного белка RamA, суперэкспрессия которого индуцирует повышение экспрессии AcrAB.

Иная субстратная специфичность характерна для эффлюкс системы SdeCDE [50]. У штаммов *S. marcescens* с нокаутированными генами *sdeCDE* не выявили изменения в чувствительности к антибиотикам по сравнению с нативным штаммом ни для каких субстратов, за исключением новобиоцина. Кроме того, новобиоцин был единственным антибиотиком, который накапливался в клетках мутантов. Эти данные позволили сделать вывод, что SdeCDE является эффлюкс системой RND-типа с ограниченной субстратной специфичностью, что отличает ее от эффлюкс системы SdeAB [53].

Третья эффлюкс система, относящаяся к RND-типу, открыта Чен с коллегами [57]. С хромосомной ДНК *S. marcescens* NUSM8906, были клонированы гены *sdeXY*, кодирующие белки

SdeXY и соответствующая им эффлюкс помпа охарактеризована [58]. Поиск сходного белка с использованием базы GenBank показал, что SdeY является членом семейства RND эффлюкс белков множественной устойчивости и SdeX — членом мембраносвязанных белков. SdeXY являлся одним из первых эффлюкс насосов типа RND, который охарактеризован в шт. *S. marcescens* с множественной устойчивостью [58]. Анализ экспрессии помпы *sdeXY* с помощью ПЦР в реальном времени и метод инактивации генов показали, что экспрессия генов *sdeXY* коррелировала с повышением минимальных ингибирующих концентраций (МИК) тигециклина. Инактивация гена SdeY или гена компонента внешней мембраны HasF уменьшали МИК тигециклина, тетрациклина, ципрофлоксацина и цефпирима [59].

Таким образом, в клетках *S. marcescens* охарактеризованы три эффлюкс системы типа RND: SdeAB, SdeCDE и SdeXY. По мере накопления данных об эффлюкс системах становится очевидным, что во многих случаях устойчивость к применяемым в клинике антибиотикам может являться побочным эффектом физиологической роли эффлюкс систем. Известно, что RND-помпы, ассоциированные с множественной лекарственной устойчивостью, требуются для экспорта факторов вирулентности или для резистентности к антимикробным агентам, продуцируемым хозяином [60]. Описанные у *S. marcescens* эффлюкс системы RND-типа имеют ортологичные гены в геномах разных энтеробактерий (табл. 2). По данным табл. 2 нуклеотидные последовательности генов-ортологов эффлюкс систем *S. proteamaculans* 568 и *S. plymutica* AS9 имеют высокую гомологию (81–88%). Гомология аминокислотных последовательностей соответствующих белков достигает 81–97%. Гомология генов *S. marcescens* с генами *E. coli* K-12 и *S. Typhimurium* LT2 значительна и находится в диапазоне от 66 до 78%, за исключением системы SdeAB. Не обнаружено гомологии к гену *sdeA* в геномах *E. coli* K-12 и *S. enterica* ser. *Typhimurium* LT2. Однако аминокислотная последовательность белка SdeA имеет гомологию (идентичность/сходство) к AcrA и AcrE белкам *E. coli* K-12 на уровне 34%/54% и 34%/53% соответственно. В геноме *S. enterica* ser. *Typhimurium* LT2 также имеется гомологичная (40%/62%) последовательность, кодируемая локусом STM0352. К гену *sdeB* (ОПС длиной 3144 п.н.) обнаружены по четыре гомологичные последовательности в геномах *E. coli* K-12 и *S. enterica* ser. *Typhimurium* LT2. Однако протяженность гомологичных участков невелика. Так в геноме *E. coli* K-12 ген *sdeB* имеет 69% гомологию к гену *acrB* (248/361 н.о.), 71% к *mdtF* (177/250 н.о.), 66% к *acrD* (208/313 н.о.), 69% к *mdtC* (142/207 н.о.), а в геноме *S. enterica* ser. *Typhimurium* LT-2 — 66% к локусу STM0351 (1004/1510 н.о.), 68% к STM0350

Таблица 2. Гомология генов эффлюкс систем RND-типа *Serratia marcescens* с ортологами в геномах других энтеробактерий

<i>S. marcescens</i> Db 11		<i>E. coli</i> K-12, % ГОМОЛОГИИ	<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium LT2, % ГОМОЛОГИИ	<i>S. proteamaculans</i> 568, % ГОМОЛОГИИ	<i>S. plymutica</i> AS9, % ГОМОЛОГИИ
ген	положение в геноме				
<i>sdeX</i>	–цепь 396876– 398063	74% <i>acrA</i> 71% <i>acrE</i> 65% <i>mdtE</i>	74% <i>acrA</i> 69% <i>acrE</i>	88% Spro_1127 69% Spro_3699	87% SerAS9_1055 66% SerAS9_2458
<i>sdeY</i>	–цепь 393701– 396858	77% <i>acrB</i> 72% <i>acrF</i> 70% <i>mdtF</i>	77% <i>acrB</i> 74% <i>acrF</i> 69% <i>acrD</i>	87% Spro_1126 6% Spro_3700 70% Spro_3492	87% SerAS9_1054 71% SerAS9_3681 66% SerAS9_2457
<i>acrR</i>	–цепь 398202– 398863	66% <i>acrR</i>	71% <i>acrR</i>	80% Spro_1128	82% SerAS9_1056
<i>hasF</i>	+цепь 3729841– 3731238	73% <i>tolC</i>	72% <i>tolC</i>	82% Spro_4268 (<i>tolC</i>)	83% SerAS9_4383 (<i>tolC</i>)
<i>sdeA</i>	–цепь 1259860– 1261047	Нет	65% STM0352*	81% Spro_1930	83% SerAS9_1878
<i>sdeB</i>	–цепь 1256692– 1259835	69% <i>acrB</i> 71% <i>mdtF</i> 66% <i>acrD</i> 69% <i>mdtC</i>	66% STM0351 68% STM0350 70% <i>acrD</i> 69% <i>acrB</i>	86% Spro_1929	87% SerAS9_1877
<i>sdeR</i>	–цепь 1261299– 1261703	71%* <i>marA</i>	73%* <i>rob</i> (STM4586)	85% Spro_1931	87% SerAS9_1879
<i>sdeC</i>	+цепь 3107438– 3108790	73% <i>mdtA</i>	72% <i>mdtA</i>	82% Spro_3552 (<i>mdtA</i>)	84% <i>mdtA</i>
<i>sdeD</i>	+цепь 3110014– 3111909	76% <i>mdtB</i>	75% <i>mdtB</i>	86% Spro_3553 (<i>mdtB</i>)	88% <i>mdtB</i>
<i>sdeE</i>	+цепь 3111918– 3114986	78% <i>mdtC</i>	76% <i>mdtC</i>	86% Spro_3554 (<i>mdtC</i>)	88% <i>mdtC</i>

Гомологию нуклеотидных последовательностей определяли с помощью программы <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> и <http://asap.ahabs.wisc.edu>, положение генов *S. marcescens* в геноме с помощью программы <http://www.sanger.ac.uk>.

* Гены, гомологичные к *sdeR* *S. marcescens*, в геномах *E. coli* K-12 и *S. enterica* ser. Typhimurium LT2 имеют короткие области перекрытия: 66/93 н.о. и 55/75 н.о. соответственно. В геноме *S. enterica* ser. Typhimurium LT2 обнаружена короткая гомологичная последовательность (115/178, 65%) к гену *sdeA* в локусе STM0352.

(577/850 н.о.), 70% к *acrD* (260/374 н.о.), 69% к *acrB* (319/464 н.о.).

Помимо представленных в таблице видов бактерий ортологи генов RND-типа эффлюкс систем *S. marcescens* имеются в геномах многих других энтеробактерий. Так, например, для генов *sdeAB* нами обнаружены гены- ортологи в геномах энтеробактерий: *Klebsiella pneumonia* (82%), *Enterobacter cloacae* (81%), *Pantoeae* sp. At 9b (80%) и др. Интересно, что к последовательностям генов *sdeX* и *sdeY* *S. marcescens* в геномах других бактерий обнаружены по несколько локусов с высокой степе-

нью гомологии. Например, к гену *sdeX* в геноме *E. coli* K-12 выявлены три последовательности с гомологией в 74% (*acrA*), 74% (*acrE*) и 65% (*mdtE*). Также к гену *sdeY* обнаружены 3 гомологичные последовательности – 77% (*acrB*), 72% (*acrF*), 70% (*mdtF*). Этот факт указывает, что в геномах энтеробактерий имеются несколько эффлюкс систем типа Acr. Например, в клетках *E. coli* кроме системы AcrAB выявлены помпы AcrEF и AcrD [61, 62]. AcrE и AcrF на 80 и 88% гомологичны AcrA и AcrB, соответственно [63]. MdtABC система *E. coli* является ортологом ранее описанной си-

стемы SdeCDE *S. marcescens* с гомологией по отдельным генам в 70–77%. Гомология к соответствующим генам *S. proteamaculans* 568 и *S. plymutica* AS9 достигала 82–88% на уровне нуклеотидных последовательностей и 91–95% идентичности на уровне аминокислотных последовательностей.

Структурная организация эффлюкс систем RND-типа. Эффлюкс системы RND-типа состоят из трех компонентов: 1) белка-транспортера внутренней мембраны (AcrB *E. coli*, SdeX *S. marcescens*); 2) периплазматического белка-адаптора (AcrA *E. coli*, SdeY *S. marcescens*); 3) белка, формирующего канал внешней мембраны (TolC *E. coli*, HasF *S. marcescens*). Сравнение генов, кодирующих белки эффлюкс систем RND-типа разных бактерий, показало высокую степень гомологии между генами (>70% идентичности) и аминокислотными последовательностями (>80%) внутри видов и между разными видами: *E. coli* (*acrB/AcrB*), *P. aeruginosa* (*mexB/MexB*), *Campylobacter jejuni* (*cmeB/CmeB*), *Neisseria gonorrhoeae* (*mtrD/MtrD*) [63]. Например, AcrA и AcrB *S. enterica* ser. Typhimurium на 94 и 97% схожи с соответствующими белками *E. coli* [64].

Генетическая организация генов, кодирующих белки этих трехкомпонентных эффлюкс систем, также схожи у разных видов. Общим является то, что гены систем организованы в оперон: ген регуляторного белка локализуется вблизи гена, кодирующего периплазматический белок, который, в свою очередь, локализуется рядом с геном белка-транспортера. Рядом может находиться ген белка наружной мембраны (OMP). Часто OMP-белок и белок-транспортер ко-транскрибируются. В некоторых системах или в разных видах ген OMP белка не ко-локализуется с другими генами, как, например, гены *acrAB* и *tolC* в *E. coli* и гены *mexXY* и *oprM* в *P. aeruginosa* [66, 63].

Мы провели сравнительный анализ организации генов эффлюкс систем в геномах *S. marcescens* и других энтеробактерий. На диаграмме (рис. 2) представлено расположение генов эффлюкс систем *S. marcescens* SdeAB, SdeXY и SdeCDE в сравнении с другими энтеробактериями. Полученные нами данные свидетельствуют, что эффлюкс системы SdeAB и SdeXY *S. marcescens* очень похожи на соответствующие эффлюкс системы других видов р. *Serratia* и AcrAB-системы *E. coli* и *S. enterica* ser. Typhimurium. Гены, кодирующие белки помпы, организованы в опероны, перед которыми находится ген регуляторного белка (*acrR*, *sdeR*, *spro_1128*), который транскрибируется в противоположном с опероном направлении (рис. 2).

SdeCDE система *S. marcescens* организована как MdtABC системы *S. proteamaculans* 568 и *S. odorifera*, *S. enterica* ser. Typhimurium LT2 и *E. coli* K-12. Оперон объединяет 3 гена, которые формируют эффлюкс систему: *mdtA*, *mdtB*, *mdtC*. Рядом с ними находится ген *mdtD*, предсказанный как ген транспортера. Однако при мутации этого

гена в геноме *E. coli* не обнаруживается фенотип MDR⁻ (multidrug resistance⁻). Порядок генов в оперонах разных бактерий идентичен. Рядом с опероном во всех вариантах находится оперон *baeSR*, транскрибируемый в том же направлении и кодирующий белки двухкомпонентной сигнально-сенсорной системы (рис. 2). Известно, что BaeS-BaeR участвует в регуляции экспрессии эффлюкс систем MdtABC в клетках *S. enterica* ser. Typhimurium и *E. coli*. Также показано, что эта система регулирует экспрессию и другой системы – AcrD – в клетках *S. enterica* ser. Typhimurium и *E. coli* [67, 68]. По аналогии мы можем предположить, что в клетках *S. marcescens* и *S. proteamaculans* эта система также участвует в регуляции соответствующих эффлюкс систем. Однако в геноме *S. odorifera* размер гена *baeS* значительно короче и не обнаружен ген *baeR*, что свидетельствует о возможных различиях в способах их регуляции.

Таким образом, гены, кодирующие белки эффлюкс систем и их взаимное расположение на хромосоме, консервативны. Тот факт, что из окружающей среды выделяются бактерии с множественной устойчивостью, а также высокая консервативность соответствующих генов свидетельствуют, что хромосомные гены, кодирующие помпы множественной устойчивости, не являются генами устойчивости, приобретенными бактериальными патогенами в ответ на антибактериальную терапию. Напротив, эти элементы генома являются эволюционно древними, чрезвычайно важными для физиологии и экологической адаптации всех живых организмов, включая бактерий [14].

Эффлюкс системы *S. marcescens* MF-типа. В клетках *S. marcescens* описаны эффлюкс системы, относящиеся к другим типам транспортеров. В 2007 г с хромосомной ДНК клинического изолята *S. marcescens* шт. NUSM8903 впервые клонирован ген *smfY* и охарактеризован белок SmfY, относящийся к MF-типу (Major Facilitator) суперсемейства транспортеров [69]. С использованием гиперчувствительного мутантного штамма *E. coli* КАМ32, трансформированного плазмидой, несущей ген *smfY*, показано, что функционирование этой помпы значительно повышает минимальные ингибирующие концентрации различных соединений, включая DAPI (4'-diamino-2-phenylindol), норфлоксацин, хлорид бензалкониума, акрифлавин и этидиум бромид. Также установлен энергозависимый выброс этидиум бромид и акрифлавина благодаря SmfY-белку. Проведенный нами Blast анализ показал, что в геноме *S. marcescens* ATCC 13880 содержится только одна OPC, соответствующая последовательности *smfY* с 97% гомологии (2054/2112 п.о.), а в геноме *S. marcescens* Db 11 – с гомологией 94%. В геномах других видов *Serratia* обнаружены ортологи гена *smfY* с 80% гомологией (табл. 3). Выравнивание гомологичных последовательностей показало, что ген *smfY* (2112 п.о.) на 70% гомологичен гену *S. enterica* ser.

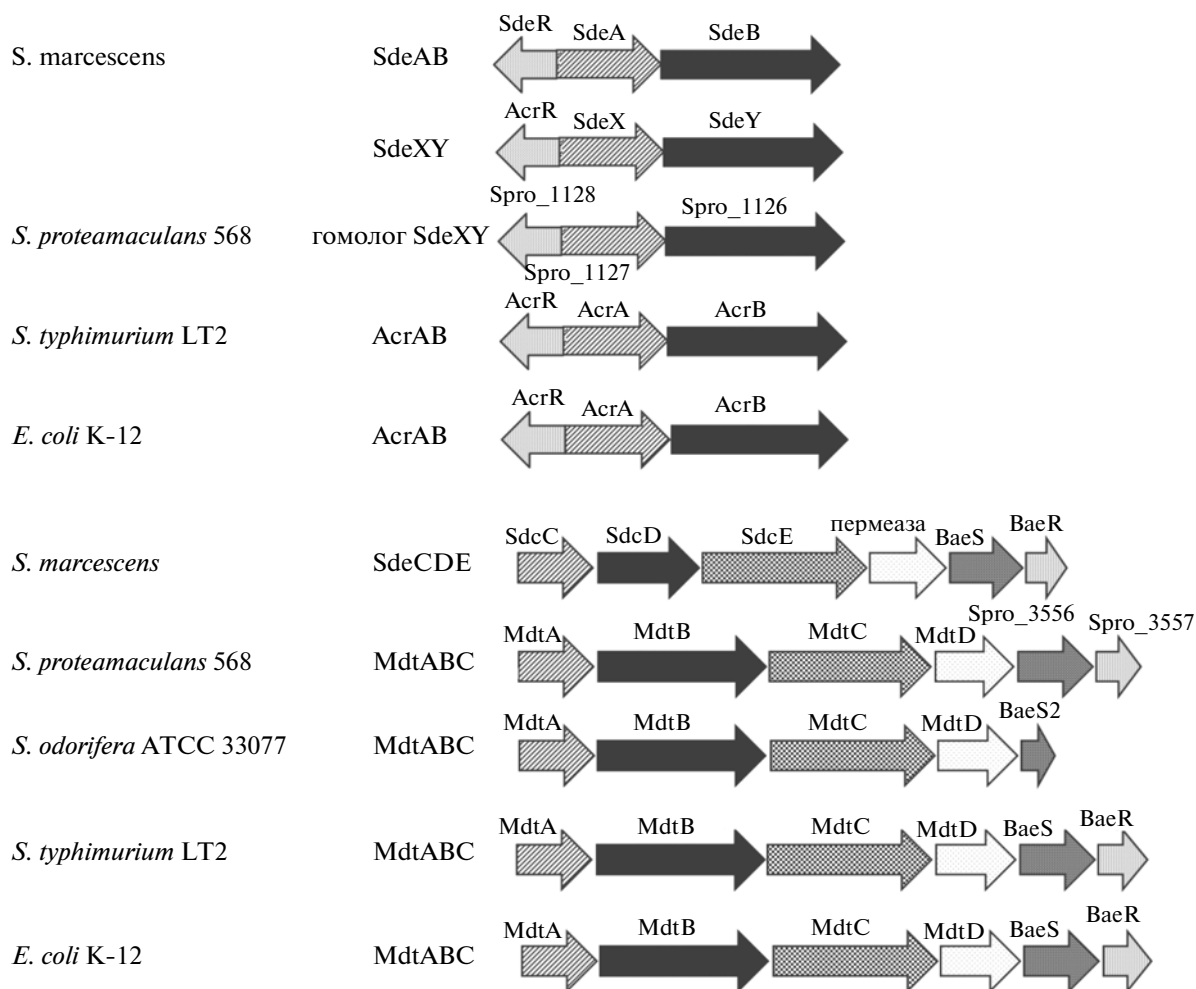


Рис. 2. Геномная организация эффлюкс систем RND-типа *S. marcescens* и других энтеробактерий. SdeA, SdeX, Spro_1127, SdeC, MdtA – мембранные белки адаптеры (membrane fusion protein (MFPs)). SdeD, MdtB, AcrB, Spro_1126, SdeB, SdeE, MdtC – белки внутренней мембраны (транспортеры). BaeS, Spro_3556 – сенсорные белки двухкомпонентной системы. BaeR, Spro_3557 – регуляторные белки двухкомпонентной системы. SdeR, AcrR, Spro_1128 – регуляторные белки (репрессоры).

Typhimurium smvA (длина выравниваемой последовательности 232/331 п.о.), а гомология по белку составляет 41%/63% (идентичность/сходство). В то же время в геноме *E. coli* K-12 подобная нуклеотидная последовательность нами не выявлена, но найдена гомология по аминокислотной последовательности SmfY равная 29%/48% (идентичность/сходство).

Эффлюкс системы *S. marcescens* ABC-типа. Системы ABC-типа детально охарактеризованы в прокариотах [70–72]. В *S. marcescens* NUSM8906 описана SmdAB эффлюкс система, относящаяся к ABC-типу [73]. Введение генов *smdA* и *smdB* по отдельности в гиперчувствительные штаммы *E. coli* не повышало минимально ингибирующую концентрацию DAPI. По-видимому, для выполнения функции вывода DAPI необходимы оба белка – SmdA и SmdB. Эти результаты свидетельствуют, что оба белка, SmdA и SmdB, могут быть,

гетеродимерной эффлюкс помпой семейства ABC-транспортеров в *S. marcescens*. Поиск гомологии показал, что системы SmdAB имеются в геномах *S. proteamaculans* 568 и *S. plymutica* AS9 (86–87% гомологии) (табл. 3), а также в геномах *E. coli* K-12 и *S. enterica* ser. *Typhimurium* (73–75%) и других энтеробактерий (*smdA* – *Cronobacter sakazakii* 78%, *Klebsiella oxytoca* 78%, *Citrobacter rodentium* 78%, *Enterobacter cloacae* 77%, *Erwinia billingiae* 76%; *smdB* – *Citrobacter rodentium* 77%, *Klebsiella pneumoniae* 78%, *Shigella sonnei* 75%, *Pantoea anantisi* 75% и др.). Широкое распространение гомологов SmdAB-типа ABC-помп среди грамотрицательных бактерий указывает на то, что они играют важную физиологическую роль, для понимания которой необходим дальнейший анализ функционирования SmdAB систем и их гомологов.

Эффлюкс помпы *S. marcescens* SMR-типа. Недавно клонирован ген *S. marcescens* *ssmE* и охарак-

Таблица 3. Гомология генов эффлюкс систем *Serratia marcescens* с ортологами в геномах других энтеробактерий

<i>S. marcescens</i> Db 11			<i>E. coli</i> K-12, % гомологии	<i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium LT2, % гомологии	<i>S. proteamaculans</i> 568, % гомологии	<i>S. plymuthica</i> AS9, % гомологии
тип, система	ген	положение в геноме				
ABC, Smd AB	<i>smdA</i>	+цепь 380867– 382642	74% <i>mdlA</i>	73% <i>mdlA</i>	86% Spro_1107	86% SerAS9_1020
	<i>smdB</i>	+цепь 382635– 384413	75% <i>mdlB</i>	74% <i>mdlB</i>	86% Spro_1108	87% SerAS9_1021
MFS, SmfY	<i>smfY</i>	+цепь 2075177– 2077287	Нет	70% <i>smvA</i> *	80% Spro_2686	80% SerAS9_2723
SMR, SsmE	<i>ssmE</i>	–цепь 1966336– 1966668	Нет	Нет	84% Spro_2603	85% SerAS9_2598

Гомологию нуклеотидных последовательностей определяли с помощью программы <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>, положение генов *S. marcescens* в геноме с помощью программы <http://www.sanger.ac.uk>.

* Гомологичная последовательность короткая (232/331 н.о.) при длине гена 2112 п.н.

теризован соответствующий белок SsmE, ответственный за энергозависимый выброс из клеток этидиум бромида [43]. BLAST анализ показал, что аминокислотная последовательность этого белка имеет высокое сходство с эффлюкс помпами SMR-типа (Small Multidrug Resistance) других бактерий. Гомология белков из разных видов р. *Serratia* достигает 89%/96% (идентичность/сходство). Гомология генов *S. plymuthica* AS9 и *S. proteamaculans* 568 составляет 84–85% (табл. 3). Интересно, что последовательности с высокой степенью гомологии обнаружены в геномах различных йерсиний (*Yersinia enterocolitica* 74%, *Y. pseudotuberculosis* 72%, *Y. pestis* 71%) и *Proteus mirabilis* 70%. В геномах *E. coli* K-12 и *S. enterica* ser. Typhimurium выявлены последовательности, кодирующие пептиды с гомологией (идентичность/сходство) на уровне 56%/76% и 56%/75% соответственно. Ранее показано, что SsmE является гомологом помпы EmrE *E. coli* [43].

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЭФФЛЮКС СИСТЕМ *S. MARCESCENS* МЕТОДАМИ БИОИНФОРМАТИКИ

Геномный анализ позволил заключить, что гены, кодирующие эффлюкс помпы лекарственной устойчивости, широко распространены в хромосомах большинства бактерий [74, 75]. В геноме *E. coli* идентифицированы 37 ОРС, кодирующие белки эффлюкс систем лекарственной устойчивости [47]. Эти гены клонированы, их экспрессия исследована в клетках чувствительных мутантов. Среди 37 ОРС идентифицированы 20, продукты которых обеспечивали резистентность *E. coli*. Такой подход продемонстрировал, что анализ геномов необходим для поиска и прогнозирования

новых эффлюкс систем лекарственной устойчивости [47, 74].

В настоящее время наиболее полно охарактеризованы эффлюкс системы *E. coli*. В связи с чем, для поиска эффлюкс систем в геноме *S. marcescens* мы использовали соответствующие последовательности генов *E. coli*. Биоинформационный анализ генома *S. marcescens* с использованием различных баз данных и программ (BLAST, NCBI, ASAP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>; <https://asap.ahabs.wisc.edu/asap/home.php>), The Sanger Institute database (<http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/bacteria/serratia-marcescens.html>)) позволил нам выявить гипотетические эффлюкс системы по гомологии с эффлюкс системами *E. coli* (табл. 4).

В клетках *S. marcescens* известна одна эффлюкс система ABC-типа – SmdAB [73]. В геноме *S. marcescens* Db 11 нами идентифицированы последовательности с гомологией 72 и 69% к генам *macA* и *macB* *E. coli* соответственно, что позволяет предположить наличие аналогичной системы ABC типа у *Serratia*. Показано, что инактивация эффлюкс системы MacAB в клетках *S. enterica* ser. Typhimurium приводила к аттенуации вирулентности штамма [22].

Известно, что в клетках *E. coli* функционируют две RND помпы AcrAB-TolC и AcrAD-TolC, различающиеся белками внутренней мембраны (AcrB и AcrD), которые определяют специфичность каждой из систем [37, 61]. В геноме *S. marcescens* идентифицированы 3 последовательности с 76% (2398/3126 н.о.), 68% (2151/3142 н.о.) и 64% (2044/3142 н.о.) гомологией к гену *acrD*. Причем последовательность с 68% гомологией соответствует гену *sdeY*, а две остальные кодируют гипотетические белки. Полученные данные позво-

Таблица 4. Идентифицированные эффлюкс системы *Serratia marcescens* на основе генов-ортологов *Escherichia coli* K-12

<i>E. coli</i> K-12			<i>S. marcescens</i> Db 11	
тип	эффлюкс система	гены	гомология, % (н.о) (длина выравниваемых последовательностей)	позиция в геноме
ABC	MacAB	<i>macA</i>	72% 723/994	+ 1010164–1011145
		<i>macB</i>	69% 1371/1961	+ 1011176–1013122
RND	AcrD	<i>acrD</i>	76% 2398/3126	+ 3051095–3054199
			68% 2151/3142	+ 393754–396858 (<i>sdeY</i>)
			64% 2044/3142	+ 1838813–1841916
MFS	Fsr	<i>fsr</i>	74% 878/1163	+ 1134164–1133068
	Bcr	<i>bcr</i>	71% 844/1183	+ 2740408–2741538
	Ycel (MdtH)	<i>mdtH</i>	72% 857/1190	+ 2186585–2187769
	YidY	<i>mdtL, yidY</i>	55% 532/964	– 2441213–2442118
	YebQ	<i>yebQ</i>	69% 941/1362	– 1449134–1450479
	MdfA	<i>mdfA</i>	71% 860/1211	– 4491834–4493081
	SetA	<i>setA</i>	60% 659/1095	+ 2721774–2722840
	ErmAB	<i>ermA</i>	70% 843/1189	+ 3302697–3303869
			77% 1198/1539	+ 3303893–3305425
MntH	<i>mntH</i>	73% 910/1243	– 2975648–2976880	
MATE	YdhE (MdtK)	<i>mdtK</i>	72% 1007/1389	– 1531582–1532958
SMR	MdtIJ	<i>mdtI</i>	70% 236/333	– 2150408–2150737
		<i>mdtJ</i>	69% 261/373	– 2150724–2151093
	SugE	<i>sugE</i>	59% 159/269	+ 3079658–3079911
	ErmE	<i>ermE</i>	Нет	

Гомологию нуклеотидных последовательностей и положение в геноме определяли с помощью программы <http://www.sanger.ac.uk>.

лили нам предположить, что в клетках этой бактерии также функционирует эффлюкс система типа AcrAD.

В настоящее время в клетках *S. marcescens* описана только одна эффлюкс система типа MFS—SmfY, в то время как в клетках *E. coli* таких систем несколько: Fsr, Bcr, Ycel (MdtH), YebQ, MdfA, MntH, ErmAB (табл. 4) [76]. В результате поиска в геноме *S. marcescens* нами обнаружены гены-ортологи этих систем с гомологией от 55 до 73%. Также в геноме *S. marcescens* выявлен ортолог с гомологией 72% гена *ydhE*, кодирующего эффлюкс систему MATE-типа.

В клетках *E. coli* описаны три эффлюкс системы SMR-типа: EmrE, MdtIJ, SugE. Сравнительный анализ показал, что EmrE—помпа гомологична системе SsmE, выделенной и охарактеризованной в клетках *S. marcescens* шт. NUSM8903 [43]. Аналоги систем *E. coli* SugE и MdtIJ в клетках *S. marcescens* пока не описаны. Но сравнительный анализ выявил в геноме *S. marcescens* Db11 последовательности генов этих помп с гомологией 59–70% (табл. 4).

Таким образом, биоинформационный анализ позволил выявить в геноме *S. marcescens* гены-ортологи потенциальных эффлюкс систем, белки которых пока не охарактеризованы, но могут быть важны для формирования устойчивости бактерий к различным антибиотикам и антимикробным соединениям. Для понимания функции этих эффлюкс систем необходимо клонировать соответствующие гены, исследовать их экспрессию и провести биохимическую характеристику соответствующих белков. Постгеномные исследования показали, что бактерии обладают большим числом генов, кодирующих эффлюкс насосы лекарственной устойчивости [9]. Установлено, что в нормальных условиях роста бактерий большинство белков насосов экспрессируется на низком уровне. Высокая экспрессия может проявляться на фоне антибиотикотерапии в клинической практике или быть индуцирована разными стрессовыми факторами. Повышение экспрессии таких насосов может быть следствием мутации в генах регуляторных белков или индуцироваться условиями, в которые попадают патогены при инфекции. Можно предположить, что некоторые бактериальные эф-

эфлюкс системы индуцируются внутри организма хозяина, так как насосы обеспечивают не только лекарственную устойчивость бактерий, но и их вирулентность [9]. Поэтому важно выявить все потенциальные эффлюкс помпы, выяснить способы их регуляции, определить физиологические субстраты для конкретных эффлюкс систем, что позволит установить их роль в формировании устойчивости и их вклад в вирулентность.

Боле того, поскольку эффлюкс системы бактерий связаны с устойчивостью и вирулентностью, они являются привлекательной мишенью для создания лекарств нового поколения. Поиск и создание эффективных специфических ингибиторов открывает путь для развития новой терапии, направленной на преодоление бактериальной множественной устойчивости и вирулентности.

Работа поддержана Федеральной целевой программой “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2012–2013 гг. соглашение № 14.А18.21.0857. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abbott S. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, and *Serratia* // Manual of clinical microbiology, 7th ed. / Eds. Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C., Tenover R.H. Washington: ASM Press, DC, 1999. P. 475–482.
2. Mahlen S. *Serratia infections*: from military experiments to current practice // Clin. Microbiol. Rev. 2011. V. 24. № 4. P. 755–783.
3. Khanna A., Khanna M., Aggarwal A. *Serratia marcescens* – a rare opportunistic nosocomial pathogen and measures to limit its spread in hospitalized patients // J. Clin. Diagn. Res. 2013. V. 7. № 2. P. 243–246.
4. Rehman T., Moore T.A., Seoane L. *Serratia marcescens* necrotizing fasciitis presenting as bilateral breast necrosis // J. Clin. Microbiol. 2012. V. 50. № 10. P. 3406–3408.
5. Hadzic A., Koluder-Cimic N., Hadzovic-Cengic M., Gojak R., Gavrankapetanovic I., Becirbegovic S. *Serratia marcescens* meningitis following spinal anaesthesia and arthroscopy // Med. Arh. 2012. V. 66. № 3. P. 54–55.
6. Voelz A., Müller A., Gillen J., Le C., Dresbach T., Engelhart S., Exner M., Bates C.J., Simon A. Outbreaks of *Serratia marcescens* in neonatal and pediatric intensive care units: clinical aspects, risk factors and management // Int. J. Hyg. Environ. Health. 2010. V. 213. № 2. P. 79–87.
7. Maragakis L.L., Winkler A., Tucker M.G., Cosgrove S.E., Ross T., Lawson E., Carroll K.C., Perl T.M. Outbreak of multidrug-resistant *Serratia marcescens* infection in a neonatal intensive care unit // Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 2008. V. 29. № 5. P. 418–423.
8. Iosifidis E., Farmaki E., Nedelkopoulou N., Tsvitanidou M., Kaperoni M., Pentsoglou V., Pournaras S., Athanasiou-Metaxa M., Roilides E. Outbreak of bloodstream infections because of *Serratia marcescens* in a pediatric department // Am. J. Infect. Control. 2012. V. 40. № 1. P. 11–15.
9. Nishino K., Nikaido E., Yamaguchi A. Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella* // Biochem. Biophys. Acta. 2009. V. 1794. № 5. P. 834–843.
10. Toymentseva A.A., Schrecke K., Sharipova M.R., Mascher T. The LIKE system, a novel protein expression toolbox for *Bacillus subtilis* based on the lial promoter // Microb. Cell. Fact. 2012. V. 11. P. 143.
11. Li X.Z., Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update // Drugs. 2009. V. 69. № 12. P. 1555–1623.
12. Schweizer H.P. Understanding efflux in Gram-negative bacteria: opportunities for drug discovery // Expert. Opin. Drug Discov. 2012. V. 7. № 7. P. 633–642.
13. Nikaido H., Pagès J.M. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria // FEMS Microbiol. Rev. 2012. V. 36. № 2. P. 340–363.
14. Martínez J.L., Sánchez M.B., Martínez-Solano L., Hernandez A., Garmendia L., Fajardo A., Alvarez-Ortega C. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems // FEMS Microbiol. Rev. 2009. V. 33. № 2. P. 430–449.
15. Lee E.H., Rouquette-Loughlin C., Folster J.P., Shafer W.M. FarR regulates the farAB-encoded efflux pump of *Neisseria gonorrhoeae* via an MtrR regulatory mechanism // J. Bacteriol. 2003. V. 185. № 24. P. 7145–7152.
16. Lee L.F., Chen Y.J., Kirby R., Chen C., Chen C.W. A multidrug efflux system is involved in colony growth in *Streptomyces lividans* // Microbiology (UK). 2007. V. 153. № 4. P. 924–934.
17. Bredenbruch F., Geffers R., Nimtz M., Buer J., Häussler S. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal (PQS) has an iron-chelating activity // Environ. Microbiol. 2006. V. 8. № 8. P. 1318–1329.
18. Dietrich L.E., Price-Whelan A., Petersen A., Whiteley M., Newman D.K. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa* // Mol. Microbiol. 2006. V. 61. № 5. P. 1308–1321.
19. Hirakata Y., Srikumar R., Poole K., Gotoh N., Suematsu T., Kohno S., Kamihira S., Hancock R.E., Speert D.P. Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa* // J. Exp. Med. 2002. V. 196. № 1. P. 109–118.
20. Buckley A.M., Webber M.A., Cooles S., Randall L.P., La Ragione R.M., Woodward M.J., Piddock L.J. The AcrAB-TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium plays a role in pathogenesis // Cell Microbiol. 2006. V. 8. № 5. P. 847–856.
21. Pérez A., Poza M., Fernández A., Fernández Mdel C., Mallo S., Merino M., Rumbo-Feal S., Cabral M.P., Bou G. Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of *Enterobacter cloacae*. // Antimicrob. Agents Chemother. 2012. V. 56. № 4. P. 2084–2090.
22. Nishino K., Latifi T., Groisman E.A. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium // Mol. Microbiol. 2006. V. 59. № 1. P. 126–141.
23. Baucheron S., Mouline C., Praud K., Chaslus-Dancla E., Cloeckaert A. TolC but not AcrB is essential for multi-

- drug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium colonization of chicks // *J. Antimicrob. Chemother.* 2005. V. 55. № 5. P. 707–712.
24. Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // *Microbes Infect.* 2003. V. 5. № 13. P. 1213–1219.
 25. May T., Ito A., Okabe S. Induction of multidrug resistance mechanism in *Escherichia coli* biofilms by interplay between tetracycline and ampicillin resistance genes // *Antimicrob. Agent. Chemother.* 2009. V. 53. № 11. P. 4628–4639.
 26. Ito A., Taniuchi A., May T., Kawata K., Okabe S. Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. № 12. P. 4093–4100.
 27. Kvist M., Hancock V., Klemm P. Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. V. 74. № 23. P. 7376–7382.
 28. Bhardwaj A.K., Mohanty P. Bacterial efflux pumps involved in multidrug resistance and their inhibitors: rejuvenating the antimicrobial chemotherapy // *Rec. Patent Anti-Infect. Drug Discov.* 2012. V. 7. № 1. P. 73–89.
 29. Fernandez L., Hancock R.E.W. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance // *Clin. Microbiol. Rev.* 2012. V. 25. № 4. P. 661–681.
 30. Putman M., van Veen H.W., Konings W.N. Molecular properties of bacterial multidrug transporters // *Microb. Mol. Biol.* 2000. V. 64. P. 672–693.
 31. Saier M.H., Jr., Paulsen I.T. Phylogeny of multidrug transporters // *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2001. V. 12. № 3. P. 205–213.
 32. Paulsen I.L. Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution // *Curr. Opin. Microbiol.* 2003. V. 6. P. 446–451.
 33. Nikaido E., Yamaguchi A., Nishino K. AcrAB multidrug efflux pump regulation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by RamA in response to environmental signals // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 24245–24253.
 34. Moussatova A., Kandt C., O'Mara M.L., Tieleman D.P. ATP-binding cassette transporters in *Escherichia coli* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. V. 1778. P. 1757–1771.
 35. Kobayashi N., Nishino K., Yamaguchi A. Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* 2001. V. 183. P. 5639–5644.
 36. Nikaido H. Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps // *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* 2011. V. 77. P. 1–60.
 37. Chollet R., Chevalier J., Bryskier A., Pages J.M. The AcrAB-TolC pump is involved in macrolide resistance but in telithromycin efflux in *Enterobacter aerogenes* and *Escherichia coli* // *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2004. V. 48. P. 3621–3624.
 38. Tikhonova E.B., Yamada Y., Zgurskaya H.I. Sequential mechanism of assembly of multidrug efflux pump AcrAB-TolC // *Chem. Biol.* 2011. V. 18. № 4. P. 454–463.
 39. Lee M., Jun S.Y., Yoon B.Y., Song S., Lee K., Ha N.C. Membrane fusion proteins of type I secretion system and tripartite efflux pumps share a binding motif for TolC in gram-negative bacteria // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 7. e40460.
 40. Zgurskaya H. I., Nikaido H. AcrA is a highly asymmetric protein capable of spanning the periplasm // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 285. № 1. P. 409–420.
 41. Misra R., Bavro V.N. Assembly and transport mechanism of tripartite drug efflux systems // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. V. 1794. № 5. P. 817–825.
 42. Yang S., Clayton S.R., Zechiedrich E.L. Relative contributions of the AcrAB, MdfA and NorE efflux pumps to quinolone resistance in *Escherichia coli* // *J. Antimicrob. Chemother.* 2003. V. 51. P. 545–556.
 43. Minato Y., Shahcheraghi F., Ogawa W., Kuroda T., Tsuchiya T. Functional gene cloning and characterization of the SsmE multidrug efflux pump from *Serratia marcescens* // *Biol. Pharm. Bull.* 2008. V. 31. № 3. P. 516–519.
 44. Routh M.D., Su C.C., Zhang Q., Yu E.W. Structures of AcrR and CmeR: insight into the mechanisms of transcriptional repression and multi-drug recognition in the TetR family of regulators // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. V. 1794. № 5. P. 844–851.
 45. Alekshun M.N., Levy S.B. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the mar regulon // *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1997. V. 41. P. 2067–2075.
 46. Martin R.G., Rosner J.L. Analysis of microarray data for the *marA*, *soxS*, and *rob* regulons of *Escherichia coli* // *Methods Enzymol.* 2003. V. 370. P. 278–280.
 47. Nishino K., Honda T., Yamaguchi A. Genome-wide analyses of *Escherichia coli* gene expression responsive to the BaeSR two-component regulatory system // *J. Bacteriol.* 2005. V. 187. P. 1763–1772.
 48. Berlanga M., Vazquez J.L., Hernandez-Borrel J., Montero M.T., Vinas M. Evidence of an efflux pump in *Serratia marcescens* // *Microb. Drug Resist.* 2000. V. 6. P. 111–117.
 49. Kumar A., Worobec E.A. Fluoroquinolone resistance of *Serratia marcescens*: involvement of a proton gradient-dependent efflux pump // *J. Antimicrob. Chemother.* 2002. V. 50. P. 593–596.
 50. Kumar A., Worobec E.A. Cloning, sequencing, and characterization of the Sde AB multidrug efflux pump of *Serratia marcescens* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. P. 1495–1501.
 51. Kumar A., Worobec E.A. HasF, a TolC-homolog of *Serratia marcescens*, is involved in energy-dependent efflux // *Can. J. Microbiol.* 2005. V. 51. P. 497–500.
 52. Barbosa T.M., Levy S.B. Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA // *J. Bacteriol.* 2000. V. 182. P. 3467–3474.
 53. Begic S., Worobec E.A. Characterization of the *Serratia marcescens* SdeCDE multidrug efflux pump studied via gene knockout mutagenesis // *Can. J. Microbiol.* 2008. V. 54. P. 411–416.
 54. Maseda H., Hashida Y., Konaka R., Shirai A., Omasa T., Nakae T. Mutation in the *sdeS* gene promotes expression of the *sdeAB* efflux pump genes and multidrug resistance in *Serratia marcescens* // *Antimicrob. Agent. Chemother.* 2011. V. 55. № 6. P. 2922–2926.
 55. Maseda H., Hashida Y., Konaka R., Shirai A., Kourai H. Mutational upregulation of a Resistance-Nodulation-Cell Division-type multidrug efflux pump, SdeAB, upon exposure to a biocide, cetylpyridium chloride, and antibiotic resistance in *Serratia marcescens* // *Antimicrob. Agent. Chemother.* 2009. V. 53. № 12. P. 5230–5235.
 56. Dalvi S.D., Worobec E.A. Gene expression analysis of the SdeAB multidrug efflux pump in antibiotic-resistant clinical isolates of *Serratia marcescens* // *Indian. J. Med. Microbiol.* 2012. V. 30. № 3. P. 302–307.

57. Chen J., Lee E.W., Kuroda T., Mizushima T., Tsuchiya T. Multidrug resistance in *Serratia marcescens* and cloning of genes responsible for the resistance // Biol. Pharm. Bull. 2003. V. 26. № 3. P. 391–393.
58. Chen J., Kuroda T., Huda M.N., Mizushima T., Tsuchiya T. An PND-type multidrug efflux pump SdeXY from *Serratia marcescens* // J. Antimicrob. Chemother. 2003. V. 52. P. 176–179.
59. Hornsey M., Ellington M.J., Doummith M., Hudson S., Livermore D.M., Woodford N. Tigecycline resistance in *Serratia marcescens* associated with up-regulation of the SdeXY-HasF efflux system also active against ciprofloxacin and cefpirome // J. Antimicrob. Chemother. 2010. V. 65. P. 479–482.
60. Piddock L.J. Multidrug-resistance efflux pumps – not just for resistance // Nat. Rev. Microbiol. 2006. V. 4. № 8. P. 629–636.
61. Rosenberg E.Y., Ma D., Nikaido H. AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump // J. Bacteriol. 2000. V. 182. P. 1754–1756.
62. Zgurskaya H.I., Nikaido H. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes // Mol. Microbiol. 2000. V. 37. P. 219–225.
63. Ma D., Alberi M., Lynch C., Nikaido H., Hearst J.E. The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals // Mol. Microbiol. 1996. V. 19. P. 101–112.
64. Piddock L.J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria // Clin. Microb. Rev. 2006. V. 19. № 2. P. 382–402(a).
65. Eaves D.J., Ricci V., Piddock J. Expression of *acrB*, *acrF*, *acrD*, *marA*, and *soxS* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: role in multiple antibiotic resistance // Antimicrob. Agents. Chemother. 2004. V. 48. P. 1145–1150.
66. Aires J.R., Kohler T., Nikaido H., Plesiat P. Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides // Antimicrob. Agents. Chemother. 1999. V. 43. P. 2624–2628.
67. Nishino K., Nikaido E., Yamaguchi A. Regulation of multidrug efflux systems involved in multidrug and metal resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium // J. Bacteriol. 2007. V. 189. № 24. P. 9066–9075.
68. Nishino K., Honda T., Yamaguchi A. Genome-wide analyses of *Escherichia coli* gene expression responsive to the BaeSR two-component regulatory system // J. Bacteriol. 2005. V. 187. P. 1763–1772.
69. Shahcheraghi F., Minato Y., Chen J., Mizushima T., Ogawa W., Kuroda T., Tsuchiya T. Molecular cloning and characterization of a multidrug efflux pump, SmfY, from *Serratia marcescens* // Biol. Pharm. Bull. 2007. V. 30. № 4. P. 798–800.
70. Lubelski J., Mazurkiewicz P., van Merkerk R., Konings W.N., Driesen A.J. *ydaG* and *ydaA* of *Lactococcus lactis* encode a heterodimeric ATP-binding cassette-type multidrug transporter // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 34449–34455.
71. Margolles A., Florez A.B., Moreno J.A., van Sinderen de Los Reyes-Gavilan C.G. Two membrane proteins from *Bifidobacterium breve* UCC2003 constitute an ABC-type multidrug transporter // Microbiology (UK). 2006. V. 152. P. 3497–3505.
72. Steinfels E., Orelle C., Fantino J.R., Dalmas O., Rigaud J.L., Denizot., di Pietro A., Jault J.M. Characterization of YvcC (BmrA), a multidrug ABC transporter constitutively expressed in *Bacillus subtilis* // Biochemistry. 2004. V. 43. № 3. P. 7491–7502.
73. Matsuo T., Chen J., Minato Y., Ogawa W., Mizushima T., Kuroda T., Tsuchiya T. SmdAB, a heterodimeric ABC-type multidrug efflux pump, in *Serratia marcescens* // J. Bacteriol. 2008. V. 190. № 2. P. 648–654.
74. Nishino K. Bacterial multidrug exporters: insights into acquisition of multidrug resistance. Science [online publication], 2005, <http://www.sciencemag.org/feature/data/prizes/ge/2004/nishino.dlt>
75. Ren Q., Paulsen I.T. Large-scale comparative genomic analyses of cytoplasmic membrane transport system in prokaryotes // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 12. P. 165–179.
76. Nishino K., Yamaguchi A. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 2001. V. 183. № 20. P. 5803–5812.

Efflux Systems in *Serratia marcescens*

A. M. Mardanova^{a, 1}, L. M. Bogomol'naya^b, Yu. D. Romanova^a, and M. R. Sharipova^a

^a Kazan (Volga Region) Federal University, ul. Kremlevskaya 18, Kazan, 420008 Russia

^b Texas A&M University, College Station, Texas, United States

¹e-mail: mardanovaaylu@mail.ru

Received March 15, 2013

Abstract—A widespread bacterium *Serratia marcescens* (family *Enterobacteriaceae*) is an opportunistic pathogen and exhibits multiple drug resistance. Active removal of antibiotics and other antimicrobials from the cells by efflux systems is one of the mechanisms responsible for microbial resistance to these compounds. Among enterobacteria, efflux systems of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* var. Typhimurium have been studied most extensively. Few efflux systems that belong to different families have been reported for *S. marcescens*. In this review, we analyzed available literature about *S. marcescens* efflux systems and carried out the comparative analysis of the genes encoding the RND type systems in different *Serratia* species and in other enterobacteria. Bioinformatical analysis of the *S. marcescens* genome allowed us to identify the previously unknown efflux systems based on their homology with the relevant *E. coli* genes. Identification of additional efflux systems in *S. marcescens* genome will promote our understanding of physiology of these bacteria, will detect new molecular mechanisms of resistance and will reveal their resistance potential.

Keywords: *Serratia marcescens*, efflux pumps, antibiotic resistance, bioinformatical analysis, orthologous genes