

枯草杆菌耐药转运蛋白 Bmr 及其基因 *bmr* 的表达调控研究进展

关维^{1,2,3} 陈仪本^{2*}

- (1. 中国科学院南海海洋研究所 广东 广州 510301)
(2. 广东省微生物研究所 广东 广州 510070)
(3. 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要: 枯草杆菌多重耐药转运蛋白 Bmr 是其主要的耐药外排蛋白之一, 由位于基因组 DNA 的 *bmr* 基因编码, 介导对多种抗生素、杀菌剂等药物的耐药性。*bmr* 基因的表达受到 BmrR 及 MtaN 的转录调控, 二者均属于 MerR 家族调节子。关于近年对多重耐药转运蛋白 Bmr 和调节蛋白 BmrR、MtaN 的结构、生理功能及作用机制等研究情况进行综述。

关键词: 多重耐药, Bmr, BmrR, MtaN, 转录调控

Advances in multidrug resistance transporter Bmr of *Bacillus subtilis* and transcriptional regulation mechanism of its gene *bmr*

GUAN Wei^{1,2,3} CHEN Yi-Ben^{2*}

- (1. South China Sea Institute of Oceanology of Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510301, China)
(2. Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)
(3. Graduate University of Chinese Acoelony of Science, Beijing 100049, China)

Abstract: Multidrug transporter Bmr is one of the main drug resistance efflux proteins in *Bacillus subtilis*. It's encoded by *bmr* gene which is located in the genome, and it mediates the

基金项目: 广东省科技计划项目(No. 2007B031800009, 2008A010500005, 2010B010800042)

*通讯作者: Tel: 86-20-87137651; 信箱: cyiben@21cn.com

收稿日期: 2011-08-02; 接受日期: 2011-10-09

resistance to a wide range of drugs such as antibiotics and antimicrobials, etc. The expression of *bmr* gene is regulated by BmrR and MtaN, both of which are transcriptional regulator from the MerR family. This paper reviewed the study of structure, physiological function and the action mechanism of Bmr and the regulatory protein BmrR and MtaN in recent years.

Keywords: Multidrug resistance, Bmr, BmrR, MtaN, Transcriptional regulation

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)广泛应用于食品、饲料等, 虽然不会对人畜造成重大安全威胁, 但会通过污染食品、日化产品, 腐蚀皮革、木材等对生产生活造成危害, 并且枯草杆菌对喹诺酮类抗生素及其他杀菌剂可产生耐药性, 对食品、化妆品的防腐, 生产设备及医用器械等的消毒, 提出了严峻挑战。Neyfakh 等^[1]早在 1991 年就报导, 枯草杆菌可通过主动外排作用, 对罗丹明 6G、溴化乙锭、氯霉素等产生耐药性, 此后许多学者对于枯草杆菌耐药现象进行了研究, Martin 等^[2]在内窥镜清洁剂中发现对二氧化氯耐药的枯草芽孢杆菌, 表现出对氧化性杀菌剂过氧化乙酸和过氧化氢的交叉耐药, 这些都引起广泛关注。研究中发现, 枯草芽孢杆菌有多种耐药相关的转运蛋白, 可将有毒害的物质运出膜外, 其中最主要的是 Bmr 蛋白。目前的研究主要集中在 Bmr 的作用机制与 *bmr* 的转录调控机制。这些研究可以更深入地揭示 Bmr 耐药作用及转录调控机制, 为其耐药性治理的研究提供理论依据, 也能为其其他多重耐药转运蛋白的研究提供一定参考。

1 枯草杆菌 Bmr 及其编码基因 *bmr*

Bmr 蛋白是一种多药耐药转运蛋白(MDR transporter), 是最早发现的细菌多药外排蛋白之一。研究指出, 多重耐药转运蛋白对有毒物质的外排作用是细菌产生多重耐药(MDR)的最主要机制^[3-4], MDR 转运蛋白一般由特定的染色体基因编码^[5], 根据氨基酸序列和结构, 可分成 6 个超家族^[6], MFS (Major facilitator superfamily)是其中最大的家族, 包括 1 000 多种膜转运蛋白, 涉及

糖类、氨基酸、无机阴离子、胺类等多种物质的跨膜转运^[7-8]。

Bmr 是 MFS 的一员, 其耐药谱广泛, 包括各种疏水性阳离子、氟喹诺酮类抗生素、吡啶染料、氯霉素等。该蛋白的编码基因 *bmr* 存在于枯草芽孢杆菌的染色体中^[9], Neyfakh 等^[1]通过两步法构建了含 *bmr* 基因和一个强启动子的质粒载体 pBMR2, 导入 *Bacillus subtilis* BD224, 由于重组质粒上 *bmr* 基因的大量表达, 氯霉素、嘌呤霉素等抗菌药对其的 MIC (最低抑菌浓度)值提高了 7-31 倍, 从而证明 *bmr* 基因的过量表达介导这种耐药性, 并且当 *bmr* 基因被敲除, 细胞对 Bmr 底物的耐药性减弱^[10], 同时, 导入外源 *bmr* 基因, 能使缺失 MDR 转运蛋白的细菌产生耐药表型^[11]。作者在研究枯草杆菌对季铵盐型杀菌剂的耐药性时发现, 以苯扎氯铵(BAC)作为诱导剂, 1/2 MIC 法连续诱导数代, BAC 对几株受试枯草芽孢杆菌的 MIC 值增加 2-3 倍, 可能也与 *bmr* 基因的大量表达相关。

2 多耐药转运蛋白 Bmr 的结构和作用机制

Bmr 具有 12 个跨膜片段(TMS), 作用方式为药物-H⁺逆向转运^[12], 12-TMS 是由一个编码 6 次跨膜结构的基因重复表达而来^[13-14], 跨膜 α 螺旋区存在许多高度保守的氨基酸序列^[15], 由于膜蛋白的疏水特性, Bmr 难于得到结晶以进行结构上的研究^[16], 研究与之高度同源的蛋白 QacA、QacB 时发现, TMS-10 有保守的带负电荷的氨基酸残基, 对二价阳离子的转运起到至关重要的作

用^[17], Edgar 等^[18]研究发现, MFS 家族另一个成员 MdfA 的 TMS-1 中有一个嵌入细胞膜的保守的谷氨酸-天冬氨酸残基, 对阳离子型底物的转运起到重要作用。作者据此推测 Bmr 也具有这种对耐药转运起关键作用的保守的氨基酸残基, 可通过基因定点突变研究予以确认。

Bmr 蛋白的作用机制为不依赖 ATP 的药物-H⁺逆向转运。目前的学说认为, Bmr 具有疏水的底物结合腔, 底物从细胞质膜内侧进入腔内, 位于 Bmr 跨膜区的酸性氨基酸残基的质子/去质子化作用驱动药物结合位点再定向, 由朝内变为朝外的构象, 从而使药物从膜内转运到膜外^[19]。比起其他家族的耐药转运蛋白, 目前对 MFS 家族的了解最浅, 且 Bmr 蛋白的晶体结构仍未知, 故实际的作用机制并无定论, 最终结论还有赖于对 Bmr 高分辨率结构的研究。

3 *bmr* 基因的表达调控

bmr 基因的表达受 BmrR 的局部调控和 MtaN 的全局调控^[20], 作用方式均为结合启动子与药物配体, 激活 *bmr* 基因的转录, 其表达调控原理如图 1 所示^[21]。

这两种调节因子均属于 MerR 家族。*bmr* 操纵子的六聚启动子元件与典型的细菌启动子元件不同, 其-10 和-35 元件之间的间隔为 19 bp, 比常见的非限制性启动子长 2 bp, 两元件位于 DNA 的不同侧, 偏离正常相平面 70°。额外的碱基对引起启动子元件空间错位, 阻止形成有转录活性的 RNA 聚合酶启动复合物^[22-23]。MerR 调节子可识别这种启动子, 和启动子结合后, 迫使 DNA 扭曲变形, 使两种元件重新定位到 DNA 的同侧, 从而使它们能够同时被 RNA 结合聚合酶结合, 启动子与 RNA 聚合酶 σ -70 亚基有效作用, 激活转录^[24-25], 调节子-启动子间作用具有特异性^[26]。MerR 家族转录因子模型见图 2^[27]。

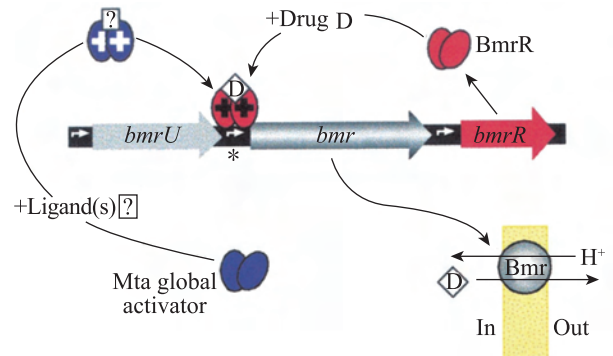


图 1 *bmr* 转录调控原理图

Fig. 1 Regulation of expression of *B. subtilis* MDR genes *bmr*

注: 一个 BmrR 二聚体同时与 *bmr* 基因的启动子 DNA 及药物(D)结合, *bmr* 基因的转录被激活后, 药物与氢离子交换而从细胞质膜(淡黄色, CM)排出。

Note: A BmrR dimer concurrently bound to both *bmr* promoter DNA and drugs (D), activation of *bmr* expression can occur in response to the presence of these deleterious compounds, permitting drug efflux across the cytoplasmic membrane (pale yellow, CM) in exchange for protons (H⁺) to occur.

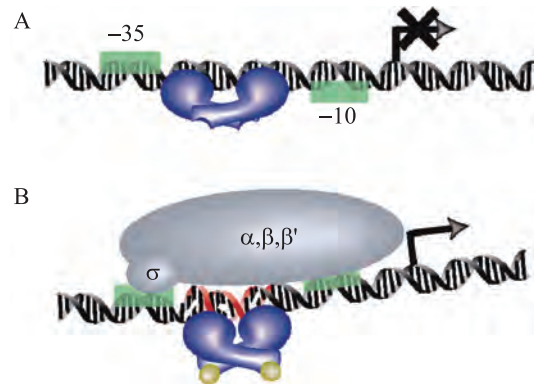


图 2 MerR 家族转录调节模型

Fig. 2 Model of transcriptional regulation by MerR family members

注: A: 未活化的 MerR (蓝色) 结合启动子, -10 和-35 元件区排列不正确, 阻止转录起始; B: 配体(黄色)结合, MerR 经历构象变化, 弯曲, 扭转, 挤压操纵子 DNA, 使-10 和-35 元件区重新定位, 形成结合有 RNA 聚合酶全酶(灰色)的开放式复合物, 允许转录起始。

Note: A: When the inactive form of MerR (blue) is bound to the promoter, incorrect alignment of the -10 and -35 regions prevents transcription initiation; B: Upon ligand binding, MerR (blue) undergoes a conformational change, bending, twisting, and compressing the operator DNA to reposition the -10 and -35 regions. This then allows for formation of the open complex with RNA polymerase holoenzyme (grey) and initiation of transcription.

3.1 局部调控因子 BmrR

BmrR 由一个紧邻并位于 *bmr* 基因的下游基因 *bmrR* 编码, 它与 MerR 家族的其他成员在 N 末端和螺旋-转角-螺旋 DNA 结合域有高度同源性^[28], 是目前研究最多的 MDR 转运蛋白调节子之一。

3.1.1 BmrR 的结构: Heldwein 等^[29]2001 年在 Nature 上发表的论文, 清晰地揭示了 BmrR 的结构, 此后陆续有许多科学家进行了深入的研究, Kumaraswami 等^[30]利用 X 射线衍射法研究了游离 BmrR 与结合 DNA 的 BmrR 的晶体结构, 得出许多有价值的晶体学数据。研究表明, BmrR 多肽链由 3 个部分组成: (1) 一个 N 末端的翼状螺旋-转角-螺旋(HTH) DNA 结合基序, 外加 2 个额外的螺旋; (2) 一个 11 圈的 α 螺旋, 它与其他亚基构成反平行卷曲螺旋并负责连接 N 和 C 末端区域; (3) C 末端 $\alpha\beta$ 多药结合域。BmrR 二聚体由一个 α 螺旋连接 2 个单体而形成, 该 α 螺旋形成一个

反向平行的卷曲螺旋, 呈现出 2 个对称排列的翼状螺旋域, 毗邻 DNA 大沟。BmrR 结构见图 3^[29]。

3.1.2 BmrR 的作用机制: *bmr* 的转录激活机制已经研究的比较清楚, 过程涉及局部碱基对断裂, 碱基滑动, -35 和 -10 位操纵子元件重排。首先, BmrR 以二聚体的形式结合到 *bmr* 操纵子 -35 和 -10 元件的 19 bp 间隔区的反向重复序列, 药物结合 BmrR 后引起 DNA 结构高度扭曲变形: 启动子在中部背向蛋白质, 朝向 DNA 大沟弯曲 50°, 启动子假二联体序列周围的 A-T 碱基对断裂, 未配对的腺嘌呤和胸腺嘧啶各自向 3' 的方向相互滑动。DNA 这种扭曲的构象, 使 DNA 有效解旋, 启动子缩短 5 Å, -35 和 -10 元件重排^[31], 最终使 -35 和 -10 元件构象变得接近典型的 17 bp 间隔的启动子^[32], 从而促进 σ 因子和 RNA 聚合酶结合, 以及转录起始位点的 DNA 解链^[28]。磷酸骨架与 Tyr24、Tyr25 和 Lys60 残基和 N 末端的螺旋 α_4 之间的相互作用能维持这种扭曲构象的稳定性^[27]。

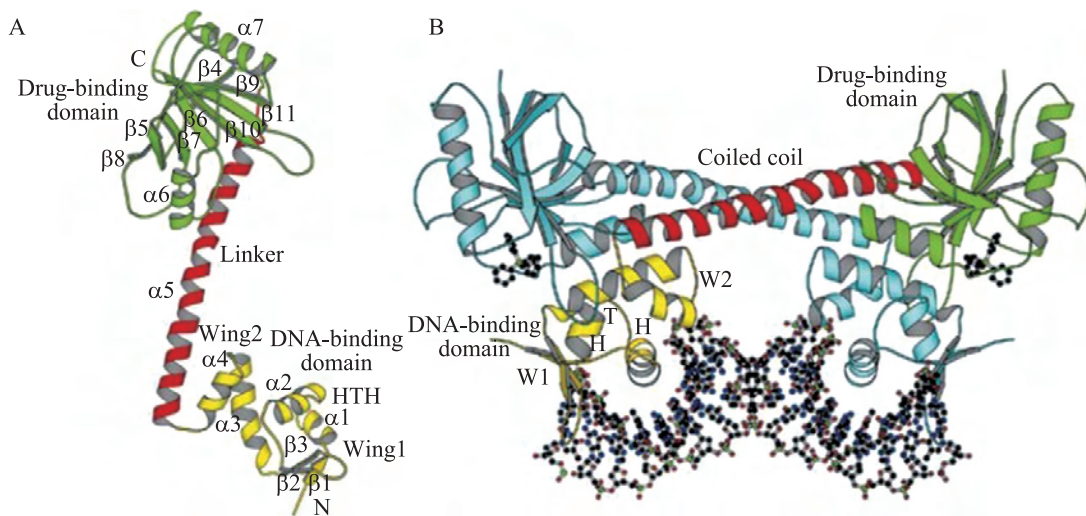


图 3 BmrR-药物-DNA 复合物晶体结构

Fig. 3 Crystal structure of the BmrR-drug-DNA complex

注: A: BmrR 单体, DNA 结合域、 α -螺旋连接、药物结合域分别以黄色、红色和绿色表示; B: 结合 DNA 的 BmrR 二聚体, 一个单体如 A 标示, 另一个以蓝绿色表示, DNA 和 TPP/TPSb 以球状和短棒状表示(C, 黑色; N, 蓝色; O, 红色; P/A, 绿色)。

Note: A: BmrR monomer. The DNA-binding domain, α -helical linker and drug-binding domain are shown in yellow, red and green, respectively. B: BmrR dimer bound to DNA. One monomer is coloured as in a, whereas the other monomer is shown in cyan. DNA and TPP/TPSb are represented as balls and sticks (Carbon, black; Nitrogen, blue; Oxygen, red; and phosphorus/antimony, green).

3.1.3 BmrR 识别和结合底物机制: 研究发现, BmrR 的底物(如罗丹明, TPP)与 BmrR 结合, 能增强 BmrR 与 *bmr* 基因启动子的亲和力, 从而诱导 *bmr* 的表达, 增强耐药性^[11,21,33]。BmrR 的药物底物结构多样, 共性是带正电荷, 有一定的疏水性^[34]。BmrR 识别和结合底物是一个简单的“锁-匙”配合的过程, 仅需在结合位点创造一个疏水环境^[35], 由于缺乏特异性决定簇, 故结合位点对药物配体几乎没有选择性, 只取决于结合位点的几何结构^[36]。

BmrR 底物识别和结合发生在 C 末端(BRC), Zheleznova 等^[37]研究 BRC-TPP 复合物晶体结构显示, TPP 结合位点是一个刚性口袋状结构, 由 7 个疏水的氨基酸残基构成。TPP 诱导 BRC 产生局部构象变化, $\alpha 1$ 螺旋绕其 N 端旋转 10° , C 端展开, 连接 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 螺旋的紧密转角伸展开, Tyr33 的 C α 原子移动 11.5 \AA , 其侧链完全离开蛋白核心, $\alpha 2$ 螺旋解折叠, 从结合位点离开, 从而暴露出结合口袋。Glu21 接近 $\alpha 2$ 螺旋而且产生负电荷, 吸引 TPP 及其他阳离子配体, 使带正电荷的配体分子进入药物结合口袋^[37-38]。Newberry 等^[39]研究发现, 药物结合是通过与口袋里的一些疏水残基(如 Phe244 和 Tyr268)相互作用介导的, 并通过带正电荷的药物和埋藏的谷氨酸残基之间静电相互作用而结合(如 Glu253), 药物存在时, Glu253 的羧基侧链与 3 个酪氨酸残基 Tyr33、Tyr68 及 Tyr110 (在全长 BmrR 中为 Tyr152、Tyr187 及 Tyr229)的羟基形成氢键, 负电荷被“中和”, 形成一种芳香基团围绕一个带负电荷的侧链的结构, 能吸引芳香族和疏水性阳离子的结合。最近 Bachas 等^[40]通过 X 射线法对 BmrR 与多种底物配体的结合作用进行结构上的研究, 更深入地揭示了 BmrR 的底物识别机制。其结果支持了 BmrR 底物结合口袋模型, 并且发现, 芳香族基团形成一个刚性环状平台以

供不同底物结合, 极性原子对底物结合也起到重要作用。

3.2 全局调控因子 MtaN

枯草芽孢杆菌 *bmr* 基因的全局调节因子是 Mta, 为转录激活子, 能结合 DNA 和与小分子底物相互作用^[41]。Mta 也属于 MerR 家族, 由 257 个氨基酸残基组成^[27], 其 N 和 C 末端在功能上可以分离, 全长的 Mta 不能激活 *bmr* 基因的转录^[42], 起作用的是 Mta 蛋白 N 端的 109 个残基(MtaN), 包括 Mta 蛋白的 DNA 结合区及和二聚化区^[23], 分别将 Mta 及 MtaN 的编码基因克隆入枯草杆菌质粒载体, 导入 *mta* 敲除株, 发现前者并不引起耐药性的改变, 溴化乙锭对后者的 MIC 值增加 3 倍, 表明这种多重耐药性是由于 Mta 的 N 末端部分激活 *bmr* 基因的表达而引起的^[43]。

与其他 MerR 家族成员一样, MtaN 以二聚体形式起作用, 其结构是一个翼状 HTH 基序, MtaN 二聚体的每个亚基包括一个 N-末端 DNA 结合域, 紧随之有一个 8 圈的螺旋 $\alpha 5$ 、 $\alpha 5/\alpha 5$ 螺旋构成反向平行卷曲螺旋, 稳定 MtaN 二聚体的结构, DNA 结合域属于翼状 HTH 家族, 包括一个四螺旋束和一个三股的反向平行 β 片层。每个 MtaN 单体包括 $\beta 1$ - $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\beta 2$ - $\alpha 3$ - $\alpha 3$ - $\beta 4$ - $\beta 5$ 拓扑结构^[44]。其结构见图 4^[45]。

MtaN 的转录激活机制与 BmrR 类似。*mta* 启动子-35 和-10 元件间隔 19 bp, MtaN 二聚体结合启动子 26 bp 的脱氧寡核苷酸片段, 完整的-35 元件六聚体及-10 元件六聚体的 1 bp。MtaN 结合 DNA 后, 其每个 DNA 结合域旋转 11° , 并向内平移 6 \AA , 导致两个 DNA 识别螺旋的中心距离($\alpha 2$ 到 $\alpha 2'$)从 33.2 \AA 缩短到 29.5 \AA , MtaN 通过 HTH 基序和翼状区 W1, W2 结合 *mta* 启动子, DNA 磷酸骨架在中部弯曲 47° 。感应到信号分子后, MtaN 二聚体的 DNA 结合域发生构象变化, 使 DNA 变形然后激活转录。

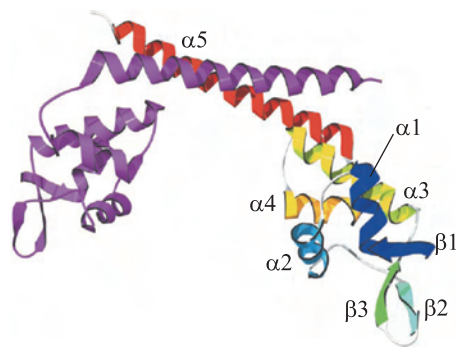


图 4 二聚体的带状结构

Fig. 4 A ribbon diagram of the MtaN dimer

注: 一个单体以紫色表示, 另一个单体 N 末端为蓝色, C 末端为红色, 二级结构如图标示, 主体部分包括 $\beta 1$ 、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\alpha 3$ 和 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 螺旋形成反向平行卷曲螺旋。

Note: One subunit is colored from blue at the N terminus to red at the C terminus. The other is colored purple. Secondary structural elements are labeled. The “body” domain includes $\beta 1$, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\alpha 3$ and $\alpha 4$. The $\alpha 5$ helices form the antiparallel coiled-coil.

4 结语与展望

对于 Bmr 功能及 *bmr* 基因转录调控机制已取得令人瞩目的成果, Bmr 底物及其他药物配体结合转录调控蛋白, 诱导 *bmr* 基因启动子 DNA 变形以激活转录的机制已基本清晰, 转录调控蛋白 BmrR 药物结合口袋模型揭示了其识别和结合配体的原理。但是有一些问题仍需更进一步的研究: (1) Bmr 蛋白晶体结构还未见报道, 亟待了解其结构特征以研究其耐药转运机制。而且 Bmr 可能具有耐药转运之外的其他未知的生理功能, 目前在 MFS 中已发现有少数成员具有与多药耐药无关的生理功能^[10]。(2) MtaN 调控机制还有待进一步验证。MtaN 结合 *mta* 启动子的结构显示, 有与 MerR 家族相似的 DNA 变形及构象变化, 但是 MtaN 的底物配体还未知。(3) MtaN 识别多种启动子的机制还未知。已知的 MtaN 的启动子结合靶位差异很大, 只有 12 个共有的碱基对, 利用 DNase I 足迹试验研究 MtaN 蛋白在 DNA 上的结合位点, 仅发现其中 6 个, 结合位点的碱基对保

守性非常有限^[46]。MtaN 如何识别多种启动子, 还有待进一步深入研究。作者研究枯草杆菌对季铵盐型杀菌剂苯扎氯铵(BAC)的耐药性时, 经诱导数代后的枯草杆菌对 BAC 产生一定耐药性, 预期结果是 *bmr* 和 *bmrR* 基因表达水平与枯草杆菌对 BAC 的耐药水平呈正相关关系, 正进行实时荧光定量 PCR 研究这种相关性。

随着这些问题的深入研究, 定能更加清楚地揭示 Bmr 的转运机制、BmrR 及 MtaN 调控机制, 对于其他相关耐药转运蛋白以及转录调控因子的研究提供方法和借鉴。通过这些研究, 能发掘耐药相关蛋白抑制剂的作用靶位, 有助于研制耐药蛋白抑制剂以进行细菌耐药性的治理, 具有显著的现实意义和应用前景。

参考文献

- [1] Neyfakh AA, Bidnenko VE, Chen LB. Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991, 88(11): 4781–4785.
- [2] Martin DJH, Denyer SP, McDonnell G, et al. Resistance and cross-resistance to oxidising agents of bacterial isolates from endoscope washer disinfectors[J]. Journal of Hospital Infection, 2008, 69(4): 377–383.
- [3] Rahman SS, Simovic I, Gibbons S, et al. In silico screening for antibiotic escort molecules to overcome efflux[J]. Journal of Molecular Modeling, 2011, 17(11): 2863–2872.
- [4] Higgins CF. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters[J]. Nature, 2007, 446(7137): 749–757.
- [5] Périchon B, Courvalin P. Antibiotic resistance[A]//Schaechter M. Encyclopedia of Microbiology[M]. Oxford: Elsevier, 2009, 2: 193–204.
- [6] Tegos GP. Natural substrates and inhibitors of multidrug resistant pumps (MDRs) redefine the plant antimicrobials[J]. Advances in Phytomedicine,

- 2006, 3: 45–59.
- [7] Dahl SG, Sylte I, Ravna AW. Structures and models of transporter proteins[J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2004, 309(3): 853–860.
- [8] Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, 57(10): 1486–1513.
- [9] Putman M, van Veen HW, Konings WN. Molecular properties of bacterial multidrug transporters[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64(4): 672–693.
- [10] Fluman N, Bibi E. Bacterial multidrug transport through the lens of the major facilitator superfamily[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2009, 1794(5): 738–747.
- [11] Lewis K, Hooper DC, Ouellette M. Multidrug resistance pumps provide broad defense[J]. *ASM News*, 1997, 63: 605–610.
- [12] Pao SS, Paulsen IT, Saier JR. Major facilitator superfamily[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(1): 1–34.
- [13] Saidijam M, Benedetti G, Ren QH, et al. Microbial drug efflux proteins of the major facilitator superfamily[J]. *Current Drug Targets*, 2006, 7(7): 793–811.
- [14] 龙泉鑫, 周培富, 吴宗辉, 等. 微生物药物外排泵及其抑制剂研究[J]. *药学学报*, 2008, 43(11): 1082–1088.
- [15] 张永, 唐英春. 病原菌质子驱动型外排泵分子机制研究进展[J]. *国外医药 (抗生素分册)*, 2004, 25(1): 6–11.
- [16] Kaur P. Multidrug resistance: can different keys open the same lock?[J]. *Drug Resistance Updates*, 2002, 5(2): 61–64.
- [17] Paulsen IT, Brown MH, Littlejohn TG, et al. Multidrug resistance proteins QacA and QacB from *Staphylococcus aureus*: membrane topology and identification of residues involved in substrate specificity[J]. *Proceedings of National of the Academy of Sciences the United States of America*, 1996, 93(8): 3630–3635.
- [18] Edgar R, Bibi E. A single membrane-embedded negative charge is critical for recognizing positively charged drugs by the *Escherichia coli* multidrug resistance protein MdfA[J]. *The EMBO Journal*, 1999, 18(4): 822–832.
- [19] Zgurskaya HI. Multicomponent drug efflux complexes: architecture and mechanism of assembly[J]. *Future Microbiology*, 2009, 4(7): 919–932.
- [20] Paulsen IT. Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6(5): 446–451.
- [21] Grkovic S, Brown MH, Skurray RA. Regulation of bacterial drug export systems[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, 66(4): 671–701.
- [22] Heltzel A, Lee IW, Totis PA, et al. Activator-dependent preinduction binding of sigma-70 RNA polymerase at the metal-regulated mer promoter[J]. *Biochemistry*, 1990, 29(41): 9572–9584.
- [23] Ahmed M, Borsch CM, Taylor SS, et al. A protein that activates expression of a multidrug efflux transporter upon binding the transporter substrates[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(45): 28506–28519.
- [24] Brown NL, Stoyanov JV, Kidd SP, et al. The MerR family of transcriptional regulators[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2003, 27(2/3): 145–163.
- [25] Yu Z. New insights into the structure, function and evolution of TETR family transcriptional regulators[D]. Toronto: University of Toronto, Ph. D, 2010.
- [26] Hobman JL. MerR family transcription activators: similar designs, different specificities[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 63(5): 1275–1278.
- [27] van Bakel H, Wijmenga C. Family matters: gene regulation by metal-dependent transcription factors[J]. *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification*, 2006, 14: 341–394.
- [28] Putman M, van Veen HW, Konings WN. Molecular properties of bacterial multidrug transporters[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64(4): 672–693.

- [29] Heldwein EEZ, Brennan RG. Crystal structure of the transcription activator BmrR bound to DNA and a drug[J]. *Nature*, 2001, 409(6818): 378–382.
- [30] Kumaraswami M, Newberry KJ, Brennan RG. Conformational plasticity of the coiled-coil domain of BmrR is required for *bmr* operator binding: the structure of unliganded BmrR[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 398(2): 264–275.
- [31] Schumacher MA, Brennan RG. Structural mechanisms of multidrug recognition and regulation by bacterial multidrug transcription factors[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 45(4): 885–893.
- [32] Huffman JL, Brennan RG. Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2002, 12(1): 98–106.
- [33] David GW. *Frontiers in Antimicrobial Resistance: A Tribute to Stuart B. Levy*[M]. Washington: ASM Press, 2005: 275–280.
- [34] Markham PN, Loguidice J, Neyfakh AA. Broad ligand specificity of the transcriptional regulator of the *Bacillus subtilis* multidrug transporter Bmr[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 239(1): 269–272.
- [35] Neyfakh AA. Mystery of multidrug transporters: the answer can be simple[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 44(5): 1123–1130.
- [36] Wade H. MD recognition by MDR gene regulators[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2010, 20(4): 489–496.
- [37] Zheleznova EE, Markham PN, Neyfakh AA, et al. Structural basis of multidrug recognition by BmrR, a transcription activator of a multidrug transporter[J]. *Cell*, 1999, 96(3): 353–362.
- [38] Borges-Walmsley MI, McKeegan KS, Walmsley AR. Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs[J]. *Biochemical Journal*, 2003, 376(Pt 2): 313–338.
- [39] Newberry KJ, Huffman JL, Miller MC, et al. Structures of BmrR-drug complexes reveal a rigid multidrug binding pocket and transcription activation through tyrosine expulsion[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(39): 26795–26804.
- [40] Bachas S, Eginton C, Gunio D, et al. Structural contributions to multidrug recognition in the multidrug resistance (MDR) gene regulator, BmrR[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(27): 1046–11051.
- [41] Alekshun MN, Levy SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance[J]. *Cell*, 2007, 128(6): 1037–1050.
- [42] Mayers DL. *Antimicrobial Drug Resistance*[M]. New York: Humana Press, 2009: 195–205.
- [43] Baranova NN, Danchin A, Neyfakh AA. Mta, a global MerR-type regulator of the *Bacillus subtilis* multidrug-efflux transporters[J]. *Molecular Microbiology*, 1999, 31(5): 1549–1559.
- [44] Newberry KJ, Brennan RG. The structural mechanism for transcription activation by MerR family member multidrug transporter activation, N terminus[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(19): 20356–20362.
- [45] Godsey MH, Baranova NN, Neyfakh AA, et al. Crystal structure of MtaN, a global multidrug transporter gene activator[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(50): 47178–47184.
- [46] Godsey MH, Baranova NN, Neyfakh AA, et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies on the DNA-binding domain of the multidrug transporter activation protein (MtaN) from *Bacillus subtilis*[J]. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2000, 56(11): 1456–1458.