

بررسی ژن *marR* در موتان‌های *gyrA* مقاوم به سیپروفلوکساسین

Study of *marR* gene in ciprofloxacin resistant *gyrA* mutants

ریحانه عبادی^۱، راضیه پوراحمد^{۱*}، محمدرضا محزونیه^۱

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و استاد دانشگاه شهرکرد، ایران

Ebadi R¹, Pourahmad R^{*1}, Mahzonieh M¹

1. MSc Student, Assistant Professor, Professor, University of Shahrekord, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Razieh_Jaktaji@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۸)

چکیده

E. coli مقاومت آنتی‌بیوتیک چندگانه و تحمل حلال‌های آلی به تولید بیش از حد کمپلکس AcrAB-TolC نسبت داده شده‌است. بیان اپرون *acrAB* به وسیله فعال‌کننده‌های رونویسی نظیر MarA کنترل می‌شود. MarA توسط اپرون *marRAB* کد می‌شود که بیان این اپرون به صورت طبیعی توسط MarR، بازدارنده خودی اپرون *mar* در یک سطح پایین نگه داشته می‌شود. اهداف این تحقیق جداسازی موتان‌های دارای مقاومت آنتی‌بیوتیک چندگانه از موتان‌های *gyrA* باکتری *E. coli* و تعیین محل موتاسیون‌های احتمالی در *marOR* می‌باشد. MICها برای آنتی‌بیوتیک‌های تتراسیکلین و کلرآمفنیکل در ده موتان *gyrA* با سطوح متفاوت مقاومت برای سیپروفلوکساسین با روش رقت‌های متوالی در محیط مایع تعیین شد. تحمل نسبت‌های مختلف از حلال‌های آلی هگزان و سیکلو هگزان در محیط جامد تعیین شد. حضور جهش با تکثیر ناحیه *marOR* شامل ناحیه بالادست ژن *marR* و خود ژن *marR* با استفاده از PCR و تعیین توالی بررسی شد. با استفاده از نرم‌افزار CLC توالی حاصل با توالی *marOR* از سویه تیپ وحشی (MG1655) که از پایگاه اطلاعاتی NCBI به دست آمد مقایسه شد. مقایسه میانگین MICها نشان داد که سه موتان از ده موتان نسبت به MG1655 به تتراسیکلین اندکی مقاوم‌تر بودند. میانگین شمارش کلنی‌ها نشان داد که سه موتان فوق رشد بهتری بر روی هگزان داشتند. در بین سه موتان، دو موتان یک جهش در *marOR* داشتند. این سه موتان در جداسازی کلون‌های با MIC بالاتر برای تتراسیکلین استفاده شدند. میانگین شمارش کلنی‌ها نشان داد که این کلون‌ها رشد بهتری بر روی هگزان در مقایسه با موتان‌های اولیه داشتند و همچنین آن‌ها جهش اضافی در ناحیه *marOR* پیدا نکردند. بنابراین ایجاد جهش در *marOR* به تنهایی در تولید فنوتیپ مقاومت چند دارویی و فعال شدن کامل AcrAB-TolC کافی نیست.

واژه‌های کلیدی

اپرون *marRAB*
مقاومت چند دارویی
AcrAB-TolC
MarA
MarR

مقدمه

مقاومت چند دارویی (MDR)^۱، فرم شایع مقاومت کلینیکی می باشد و به عنوان توانایی زنده ماندن یک موجود ایجاد کننده بیماری در دزهای کشنده از داروهای مختلف یا مواد شیمیایی متنوع تعریف می شود (Nikaido 2009). مصرف نامناسب و مکرر آنتی بیوتیک‌ها در طول زمان، باعث مقاومت باکتری‌ها در برابر آنها می شود (Bennett 2008). مقاومت چند دارویی می تواند در نتیجه افزایش انتشار به خارج به وسیله عملکرد پمپ‌های انتشار به خارج چند دارویی ایجاد شود. این پمپ‌ها می توانند بیش از یک نوع دارو را به خارج پمپ کنند (Li and Nikaido 2009).

باکتری *E. coli* شایع ترین علت بعضی از عفونت‌های باکتریایی مانند عفونت‌های سیستم ادراری، باکتری، اسهال مسافران و از علل اصلی مننژیت دوران نوزادی است (Li and Nikaido 2006). در این باکتری، پمپ RND اصلی، سیستم AcrAB-TolC است که یک سیستم سه جزئی می باشد. در *E. coli* مقاومت آنتی-بیوتیک چندگانه (MAR)^۲ و هم تحمل نسبت به حلال‌های آلی به تولید بیش از حد این پمپ نسبت داده شده که به وسیله افزایش بیان تنظیم کننده سراسری MarA یا SoxS میانجی‌گری می شود. این فعال کننده‌های رونویسی، مقدار AcrAB تولید شده را افزایش می دهند و به طور موثر انتشار به خارج را بالا می برند (Piddock, 2006).

در *E. coli* تنظیم کننده MarA توسط جایگاه *mar* کد می شود (Cohen et al. 1989). اپرون *marRAB* یک واحد رونویسی است که از سه چارچوب ژنی کد کننده پروتئین‌های MarA، MarR و MarB تشکیل شده است (Alekhshun and Levy 1997; Cohen et al. 1993). پروتئین MarR یک بازدارنده خودی با ۱۴۴ آمینو اسید است که به صورت منفی بیان اپرون *marRAB* را با اتصال به دو ناحیه درون *marO* در یک سطح پایین نگاه می دارد. غیرفعال شدن MarR منجر به افزایش بیان MarA می شود (Cohen et al. 1993). ساختار کریستالی MarR نشان می دهد که این پروتئین ساختار دایمر داشته که هر زیرواحد آن محتوی یک

موتیف اتصال به DNA با ساختار هلیکس- بالدار^۳ می باشد (Alekhshun et al. 2001). پروتئین MarR دارای مهارکننده‌های متعددی مثل سالیسیلات، تتراسیکلین، کلرامفنیکل، استامینوفن، آسپرین و غیره می باشد که مقاومت آنتی بیوتیک چندگانه را بالا می برند (Rosner 1985; Seone and Levy 1995).

موتان‌های *mar* اپرون *marRAB* را به عنوان نتیجه‌ای از جهش در *marO* یا *marR* بیان می کنند اما جهش‌هایی که باعث افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک می شوند مکرراً در *marR* قرار گرفته اند (Cohen et al. 1993). این موتان‌ها شامل حذف و جهش‌های نقطه‌ای منفرد متفاوت در *marR* و همچنین جهش‌هایی در *marO* هستند که شامل تکرار ۲۰ جفت بازی می باشد (Maneewanakul and Levy 1996; Alekhshun et al. 2000). با توجه به اهمیت درمان عفونت‌هایی نظیر عفونت ادراری که می تواند توسط آنتی بیوتیکی نظیر سیپروفلوکساسین انجام شود بررسی موتان‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین از لحاظ حضور موتاسیون‌های ایجاد کننده فنوتیپ مقاومت چندگانه ضروری می باشد.

کینولون‌ها از جمله سیپروفلوکساسین‌ها محسوب شده که از آنتی-بیوتیک‌های ایجاد کننده آسیب در DNA می باشند و می توانند محرک ظهور موتان‌های مقاوم به آنتی بیوتیک شوند (Cirz et al. 2005). لازم به ذکر است که مقاومت سطح پایین به تتراسیکلین و کلرامفنیکل به عنوان مقاومت به غلظت یک تا ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر از این آنتی بیوتیک‌ها تعریف می شود. مقاومت سطح متوسط به عنوان مقاومت به غلظت ۱۰ تا ۵۰ میکروگرم بر میلی-لیتر و مقاومت سطح بالا به عنوان مقاومت به غلظت بیش از ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از این آنتی بیوتیک‌ها تعریف می شود (George and Levy 1983).

اهداف اصلی این تحقیق جداسازی موتان‌های با مقاومت چندگانه از انواع مقاوم به سیپروفلوکساسین در باکتری *E. coli* و بررسی حضور موتاسیون‌های احتمالی در ژن *marR* این موتان‌ها و سنجش تحمل حلال‌ها بود.

^۱ Multidrug resistance

^۲ Multiple antibiotic resistance

^۳ Winged helix

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از باکتری اشرشیاکلی سویه MG1655 به عنوان باکتری شاهد و از ۱۰ موتان *gyrA* مقاوم به سیپروفلوکساسین با MICهای مختلف برای این آنتی‌بیوتیک جهت جداسازی کلون‌های مقاوم به تتراسیکلین استفاده شد (Pourahmad and Mohiti 2010) (جدول ۱). این موتان‌ها دارای موتاسیون در ناحیه QRDR از زیر واحد A آنزیم DNA جیراز می‌باشند که در ژن *gyrA* سرین ۸۳ به لوسین تبدیل شده‌است (Pourahmad and Mohiti 2010). محیط کشت جامد LB آگار و محیط کشت مایع LB برات برای تهیه کشت تازه باکتری مورد استفاده قرار گرفت. آنتی‌بیوتیک‌های تتراسیکلین و کلرامفنیکل (Sigma USA) و حلال‌های هگزان و سیکلو هگزان (Merk Germany) برای تعیین تحمل حلال مورد استفاده قرار گرفتند.

جدول ۱- MIC آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین برای موتان‌های *gyrA* مقاوم به آن

MIC* سیپروفلوکساسین (نانوگرم/ میلی‌لیتر)	نام سویه/ موتان
۳۵	MG1655
۶۲٫۵	EM1
۶۲٫۵	EM2
۷۵	EM3
۷۵	EM4
۱۲۵	EM5
۱۲۵	EM6
۳۱۲	EM7
۳۱۲	EM8
۶۲۵	EM9
۶۲۵	EM10

* داده‌ها میانگین سه تکرار آزمایش می‌باشند.

در مرحله اول حداقل غلظت مهاری (MIC) مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسیکلین و کلرامفنیکل برای سویه تیپ وحشی MG1655 و ۱۰ موتان *gyrA* اولیه (EM1 تا EM10) با استفاده از روش رقیق‌سازی متوالی تعیین شد (Lalitha 2004). MIC کمترین غلظت یک آنتی‌بیوتیک است که رشد مرئی یک میکروارگانیسم را بعد از انکوباسیون مهار خواهد کرد. این آزمایش برای هر سویه، موتان و کلون سه بار تکرار شد و نتایج به صورت میانگین سه تکرار بیان شد.

در مرحله بعد ناحیه *marOR* با استفاده از PCR در سویه تیپ وحشی MG1655 و موتان‌های *gyrA* تکثیر شد. برای این منظور با استفاده از توالی ناحیه *marOR* مربوط به باکتری *E. coli* K12 سویه MG1655 و نرم‌افزار Primer 3 توالی‌های آغازگر طراحی شد. آغازگر رفت و برگشت به ترتیب دارای توالی‌های نوکلئوتیدی 5'-GGTGGTTGTTATCCTGTGTA-3' و 5'-CGGCAGGACTTTCTTAAGC-3' بود. در این مطالعه مستقیماً از کلونی‌های باکتری به منظور استخراج DNA برای انجام واکنش PCR استفاده شد به طوری که با حل کردن کلونی باکتری در آب مقطر و حرارت دادن این محلول تا دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، محلول حاوی DNA ژنومی باکتری به دست آمد. تکثیر DNA طی ۳۰ چرخه شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه با استفاده از دستگاه ترموسایکلر TECHNE انجام شد. بعد از تکثیر قطعات مورد نظر توسط روش PCR، نمونه‌های مورد نظر بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد (Merk Germany)، الکتروفورز شدند. در نهایت پس از تعیین توالی محصولات، توالی‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار Chromas و CLC با توالی ناحیه *marOR* از باکتری *E. coli* K12 سویه MG1655 مقایسه شد. با کشت ۱۰ موتان *gyrA* بر روی محیط‌های LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، کلون‌های مقاوم به این آنتی‌بیوتیک جدا-سازی و از RE1 تا RE22 نامگذاری شدند.

در مرحله بعد MIC کلون‌های مقاوم به تتراسیکلین مشابه با روش گفته شده در قبل تعیین شد. این آزمایش سه بار تکرار شد و نتایج به صورت میانگین سه تکرار بیان شد. در مرحله بعد تحمل حلال آلی کلون‌های مقاوم به تتراسیکلین تعیین شد (Asako et al. 1997). برای این منظور محیط کشت انتخابی تهیه شد این محیط همان محیط LB آگار است که به ازاء هر ۱۰۰ میلی‌لیتر آن ۰/۱ گرم گلوکز و سولفات منیزیم (MgSO₄) ۱۰ میلی‌مولار نیز به آن اضافه می‌شود. سپس از کلون‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، رقت‌های متوالی تهیه شد. در مرحله بعد بر روی پلیت محتوی محیط کشت انتخابی، ۵ میکرولیتر از هر رقت به صورت یک قطره اضافه شد و ۵ میلی‌لیتر از حلال‌های هگزان و سیکلو هگزان با نسبت‌های

جدول ۲- MIC تتراسیکلین و کلرامفنیکل برای موتان‌های *gyrA* و کلون-های حاصل از آنها. داده‌ها میانگین سه تکرار آزمایش می‌باشند

موتان/کلون	MICs (میکروگرم/ میلی‌لیتر)	
	تتراسیکلین	کلرامفنیکل
EM1	۳	۴
EM2	۳	۴
EM3	۴	۵
EM4	۴	۵
EM5	۳	۴
EM6	۳	۴
EM7	۳	۴
EM8	۳	۴
EM9	۵	۵
EM10	۳	۴
RE1	۳۰	۴۰
RE2	۳۰	۴۰
RE3	۳۵	۴۰
RE4	۳۵	۴۰
RE5	۴۵	۴۵
RE6	۴۵	۴۵
RE7	۴۵	۴۵
RE8	۴۵	۴۵
RE9	۳۰	۳۵
RE10	۳۰	۳۵
RE11	۳۵	۴۰
RE12	۲۰	۳۰
RE13	۳۵	۴۰
RE14	۳۰	۳۵
RE15	۳۰	۴۰
RE16	۳۰	۴۰
RE17	۳۰	۳۵
RE18	۳۰	۳۵
RE19	۲۰	۳۰
RE20	۳۰	۳۵
RE21	۲۰	۳۰
RE22	۳۰	۳۵

مختلف (۳:۱) (۱:۱) (۱:۳) به این پلیت‌ها اضافه شد. سپس پلیت-ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرما گذاری شدند. پس از ۲۴ ساعت پلیت‌ها از نظر رشد یا عدم رشد باکتری‌ها بررسی شدند (Asako et al. 1997). این آزمایش برای هر سویه، موتان و کلون سه بار انجام شد و نتایج به صورت میانگین سه تکرار بیان شد.

در مرحله بعد مجدداً PCR مطابق با مراحل گفته شده برای موتان‌های *gyrA* در مورد کلون‌های جداسازی شده مقاوم به تتراسیکلین نیز انجام گرفت و نتایج به دست آمده پس از تعیین توالی با ناحیه *marOR* از باکتری *E. coli* K12 سویه MG1655 مقایسه شد.

نتایج و بحث

MIC آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین و کلرامفنیکل برای سویه MG1655، به ترتیب ۳ و ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. این مقادیر مشابه با مقداری بود که قبلاً برای این سویه گزارش شده بود (Kohanski et al. 2010). MIC این دو آنتی‌بیوتیک برای ۱۰ موتان *gyrA* مقاوم به سیپروفلوکساسین و کلون‌های جداسازی شده مقاوم به تتراسیکلین نیز تعیین شد (جدول ۲). موتان‌های EM3، EM4 و EM9 نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسیکلین و کلرامفنیکل در مقایسه با سویه تیپ وحشی مقاوم‌تر بودند (جدول ۲).

لازم به ذکر است که تحمل حلال سویه تیپ وحشی و موتان‌های *gyrA* قبلاً تعیین شده بود به طوری که تحمل حلال هفت موتان، مشابه سویه تیپ وحشی (MG1655) بود. به این صورت که همگی در مجاورت هگزان قادر به رشد بودند ولی در مجاورت نسبت‌های مختلف از هگزان-سیکلو هگزان قادر به رشد نبودند. ولی سه موتان (EM3، EM4 و EM9) دارای میانگین کلنی‌های بیشتری روی هگزان نسبت به سویه تیپ وحشی بودند (Pourahmad Jaktaji et al. 2012). کلون‌های مقاوم‌تر به تتراسیکلین به شرح زیر به دست آمدند: کلون‌های RE1 تا RE11 از EM3، RE12 تا RE15 از EM4 و RE16 تا RE22 از EM9. کلون‌های حاصل مقاومت سطح متوسط به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسیکلین و کلرامفنیکل دارند.

جدول ۳- تحمل حلال آلی سویه کنترل، موتان‌های *gyrA* و کلون‌های حاصل از آنها. داده‌ها میانگین سه تکرار آزمایش می‌باشند

تعداد باکتری درلکه (هگزان)	تعداد باکتری درلکه (بدون حلال)	موتان/ کلون	تعداد باکتری درلکه (هگزان)	تعداد باکتری درلکه (بدون حلال)	سویه/ موتان/ کلون
۲۴×۱۰ ^۵	۲۰×۱۰ ^۶	RE10	۱۹×۱۰ ^۴	۳۰×۱۰ ^۶	MG1655
۴×۱۰ ^۶	۲۴×۱۰ ^۶	RE11	۶×۱۰ ^۵	۲۲×۱۰ ^۶	EM3
۱۷×۱۰ ^۵	۱۰×۱۰ ^۶	RE12	۶×۱۰ ^۵	۲۲×۱۰ ^۶	EM4
۶×۱۰ ^۶	۲۵×۱۰ ^۶	RE13	۵×۱۰ ^۵	۱۷×۱۰ ^۶	EM9
۳۰×۱۰ ^۵	۲۰×۱۰ ^۶	RE14	۲۴×۱۰ ^۵	۱۹×۱۰ ^۶	RE1
۲۷×۱۰ ^۵	۲۲×۱۰ ^۶	RE15	۲۵×۱۰ ^۵	۱۹×۱۰ ^۶	RE2
۲×۱۰ ^۶	۵×۱۰ ^۶	RE16	۳×۱۰ ^۶	۲۵×۱۰ ^۶	RE3
۲۵×۱۰ ^۵	۲۰×۱۰ ^۶	RE17	۴×۱۰ ^۶	۲۵×۱۰ ^۶	RE4
۲۷×۱۰ ^۵	۲۱×۱۰ ^۶	RE18	۶×۱۰ ^۶	۲۸×۱۰ ^۶	RE5
۱۹×۱۰ ^۵	۱۱×۱۰ ^۶	RE19	۶×۱۰ ^۶	۲۷×۱۰ ^۶	RE6
۷×۱۰ ^۶	۱۹×۱۰ ^۶	RE20	۸×۱۰ ^۶	۲۸×۱۰ ^۶	RE7
۲۷×۱۰ ^۵	۱۹×۱۰ ^۶	RE21	۷×۱۰ ^۶	۲۹×۱۰ ^۶	RE8
۲۸×۱۰ ^۵	۲۳×۱۰ ^۶	RE22	۲۸×۱۰ ^۵	۲۲×۱۰ ^۶	RE9

تحمل حلال آلی کلون‌های جدا شده، تعیین شد (جدول ۳). هیچکدام از کلون‌ها قادر به رشد در مجاورت تراکم‌های مختلف سیکلوهگزان نبودند. ولی همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود برخی از آنها مانند RE3, RE4, RE5, RE6, RE7, RE8, RE11, RE13, RE16 و RE20 دارای رشد بهتری روی هگزان نسبت به سویه تیپ وحشی و موتان‌های *gyrA* مادری بودند. این کلون‌ها، کلون‌هایی هستند که مقادیر MIC تتراسیکلین و کلرامفنیکل بالاتری نیز نسبت به بقیه کلون‌ها دارند.

ناحیه *marOR* در سویه تیپ وحشی، موتان‌های *gyrA* اولیه و کلون‌های جداسازی شده مقاوم به تتراسیکلین، PCR و بر روی ژل آگارز الکتروفورز شد (شکل ۱). اندازه ژن *marR* ۴۳۵ جفت باز بوده و کل ناحیه تکثیر شده در این مطالعه ۷۰۰ جفت باز بود. پس از تعیین توالی ناحیه *marOR* در سویه تیپ وحشی، موتان‌های *gyrA* اولیه و کلون‌های جداسازی شده و مقایسه آن با توالی این ناحیه از باکتری *E. coli* K12 سویه MG1655، مشخص شد که EM3 دارای جایگزینی سیتوزین به جای تیمین (C→T) در موقعیت ۲۲۱ در توالی نوکلئوتیدی ژن *marR* بود که کدون متیونین ۷۴ به ترئونین تبدیل شد (شکل ۲). اگرچه نواحی پروموتور و *marbox* آن بدون تغییر بود. این ناحیه یعنی کدون ۷۴

جزء موتیف اتصال به DNA مربوط به MarR می‌باشد. کلون‌های حاصل از EM3 (RE1→RE11) نیز به غیر موتاسیون در کدون ۷۴ هیچ تغییر جدیدی را نشان ندادند. EM9 دارای اضافه شدن ۲۰ جفت باز (GCAACTAATTACTTGCCAGG) در ناحیه اپراتور *marO* بود که این ناحیه ۶ جفت باز پایین دست موقعیت ۱۰- از پروموتور مفروض شروع می‌شود (شکل ۳). *marbox* مربوط به EM9 بدون تغییر بود. همچنین کلون‌های حاصل از EM9 (RE16→RE22) تنها حاوی همین تکرار پشت سر هم ۲۰ جفت باز در ناحیه اپراتور بودند و حاوی تغییر اضافی نبودند. به علاوه EM4، کلون‌های حاصل از EM4 (RE12→RE15) و سایر موتان‌های *gyrA* فاقد هر گونه تغییر در ناحیه *marOR* بودند.

در این تحقیق از موتان‌های *gyrA* مقاوم به سیپروفلوکساسین برای جداسازی موتان‌های دارای فنوتیپ مقاومت آنتی‌بیوتیک چند گانه استفاده شد بدین ترتیب از آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین که منجر به القای مقاومت چند گانه در *E. coli* می‌شود استفاده شد.

علت استفاده از موتان‌های *gyrA* مقاوم به سیپروفلوکساسین برای جداسازی کلون‌های دارای فنوتیپ مقاومت چند دارویی آن بود که معمولاً کلون‌های با فنوتیپ مقاومت چندگانه از سویه‌های حساس به آنتی‌بیوتیک به طور مستقیم جداسازی نمی‌شوند و

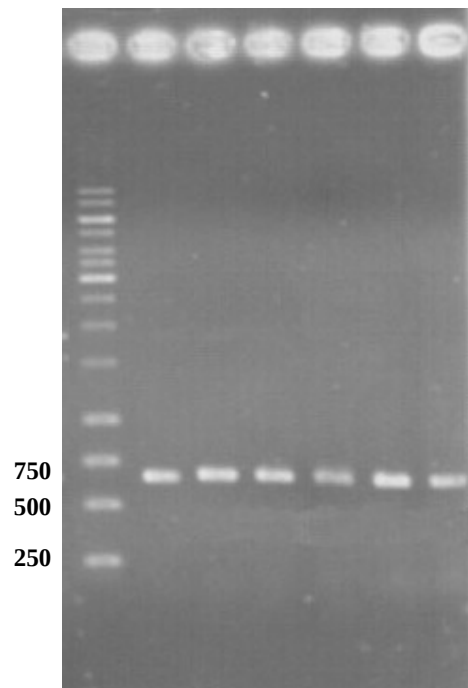
نتایج نشان داد که هیچکدام از موتان‌های *gyrA* حتی انواع با MIC بیشتر برای سیپروفلوکساسین، به خودی خود دارای فنوتیپ مقاومت چند دارویی نیستند ولی برخی از موتان‌های *gyrA* (EM3، EM4 و EM9) ممکن است به تدریج این فنوتیپ را به دنبال قرار گرفتن در معرض القاکننده اپرون *marRAB* نظیر تتراسیکلین کسب کنند. این مسئله با این یافته که این سه موتان *gyrA* اندکی به تتراسیکلین مقاوم‌تر هستند و در مقایسه با سویه تیپ وحشی بهتر روی هگزان رشد می‌کنند، آشکار شد.

این یافته که هفت موتان *gyrA* از لحاظ حساسیت به تتراسیکلین و تحمل حلال مانند سویه تیپ وحشی بوده و فاقد موتاسیون در *marOR* بودند، دلالت بر این دارد که علت بالاتر بودن MIC برای سیپروفلوکساسین نسبت به سویه تیپ وحشی ممکن است در ارتباط با حضور موتاسیون در سایر ژن‌های هدف سیپروفلوکساسین نظیر *gyrB*، *parC* و *parE* باشد. دو ژن آخر کد کننده زیرواحدهای توپوایزومراز IV می‌باشند که هدف فرعی آنتی‌بیوتیک فلوروکینولون در *E. coli* است (Hooper 2000).

جهش در کدون ۷۳ پروتئین MarR که باعث جایگزینی یک اسیدآمینه هیدروفیل، سیستئین، به جای آرژنین، یک اسیدآمینه بازی، می‌شود قبلاً گزارش شده‌است و نقش بسیار اساسی در اتصال MarR به DNA دارد. همچنین گزارش شده که تغییر دیگری در این کدون که باعث جایگزینی یک اسیدآمینه هیدروفیل، سرین، به جای آرژنین می‌شود باعث ایجاد مقاومت چند گانه و تحمل سیکلوهگزان می‌شود (Cohen et al. 1993; Asako et al. 1997; Alekshun et al. 2000).

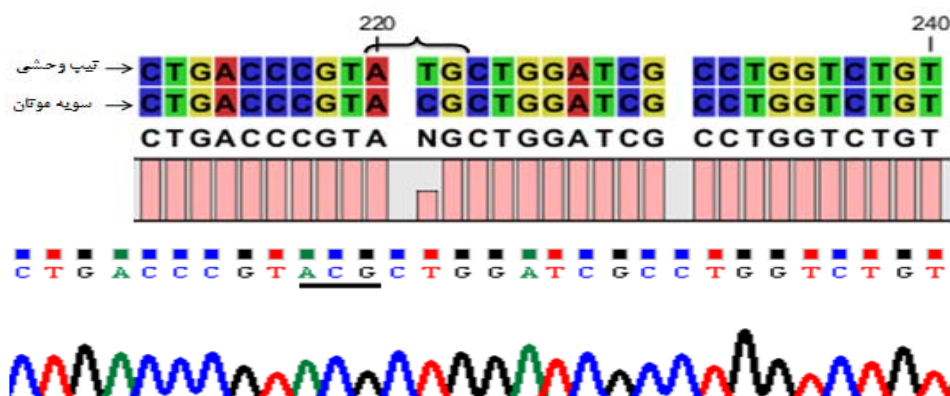
همچنین موتان EM3 دارای جهش در کدون ۷۴ پروتئین MarR است که باعث قرار گرفتن ترئونین، یک اسیدآمینه هیدروفیل، به جای متیونین، یک اسیدآمینه هیدروفوب می‌شود. این تغییر موجب تحمل سیکلوهگزان نشد. تغییر در کدون ۷۴ که باعث جایگزینی ایزولوسین، یک اسیدآمینه هیدروفوب، به جای متیونین می‌شود گزارش شده‌است. موقعیت کدون در هلیکس $\alpha 4$ پروتئین MarR اعلام شده و جزء موتیف اتصال به DNA این پروتئین (MarR-M) می‌باشد (Alekshun et al. 2000).

حتماً باید از موتان‌های مقاوم به یک نوع آنتی‌بیوتیک نظیر سیپروفلوکساسین برای جداسازی آنها استفاده کرد (Lindgren et al. 2003). تماس افزایش یافته موتان‌های *mar* با عوامل انتخابی منجر به موتان‌هایی با مقاومت بسیار بالا به داروهای متعدد می‌شود و فنوتیپ مقاومت آنتی‌بیوتیک چند گانه را تشدید می‌کند (George and Levy 1983).

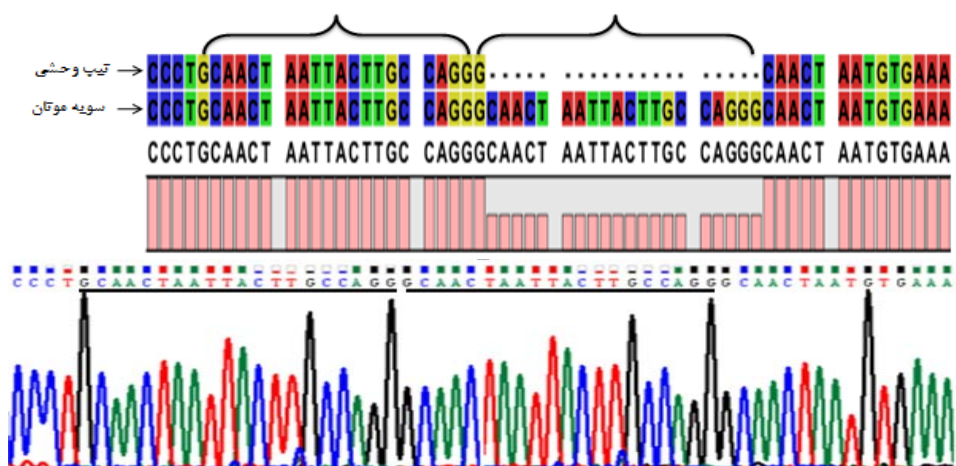


شکل ۱- ژل الکتروفورز محصولات PCR کلون‌های مقاوم به تتراسیکلین و موتان‌های *gyrA* اولیه بر روی ژل آگارز. از چپ به راست به ترتیب نشانگر با اندازه 1 kb، EM3، EM9، RE16، RE21، RE3، RE6.

بررسی موتان‌های *E. coli* از لحاظ حضور موتاسیون ایجاد کننده مقاومت چند دارویی از این نظر اهمیت دارد که *E. coli* شایع‌ترین عامل ایجاد برخی از عفونت‌های باکتریایی نظیر عفونت ادراری و گوارشی می‌باشد و اخیراً موارد زیادی از مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های گوناگون در این باکتری مشاهده شده‌است. از آن جا که هومولوگ‌های این پمپ‌ها حتی در حیوانات عالی نیز وجود دارند از این باکتری می‌توان به عنوان موجود مدل در بررسی مقاومت چند دارویی از جمله مقاومت سلول‌های سرطانی نسبت به عوامل شیمی درمانی در موجودات پیچیده‌تر استفاده کرد (Alekshun et al. 2000; Altmann et al. 2004).



شکل ۲- تبدیل متیونین ۷۴ (ATG) به ترئونین (ACG) در *MarR*. نتیجه حاصل از بررسی همولوژی بین تیپ وحشی و سویه موتان با استفاده از نرم‌افزار CLC (تغییر حاصله به صورت کروشه) و منحنی کروماتوگرام مربوطه (تغییر حاصله به صورت خط در زیر ناحیه تغییر یافته).



شکل ۳- تکرار ۲۰ جفت باز (GCAACTAATTACTTGCCAGG) در اپراتور *marO*. نتیجه حاصل از بررسی همولوژی بین تیپ وحشی و سویه موتان با استفاده از نرم‌افزار CLC (تغییر حاصله به صورت کروشه) و منحنی کروماتوگرام مربوطه (تغییر حاصله به صورت خط در زیر ناحیه تغییر یافته).

وحشی و فاقد موتاسیون در ژن *marR* می‌باشد، شاید دلالت بر وجود موتاسیون در ژن *acrR* و یا موتاسیون در ژن‌های سازنده پورین‌ها و یا مهارکننده‌های بیان این ژن‌ها در این موتان *gyrA* داشته باشد. از طرف دیگر کلون‌های حاصل از سه موتان *gyrA* (EM3، EM4 و EM9) فاقد موتاسیون اضافی در ژن *marR* بودند. علت افزایش MIC تتراسیکلین در این کلون‌ها تداوم تماس با تتراسیکلین و احتمالاً القای پمپ AcrAB-TolC می‌باشد.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد جهت تامین بودجه و کارشناس آزمایشگاه ژنتیک این دانشگاه آقای بنی مهدی کمال تشکر و قدردانی را داریم.

علاوه بر تغییر در دمین اتصال به DNA پروتئین *MarR*، تغییر در مکان اتصال پروتئین هم مانع از فعالیت آن می‌شود. موتان EM9 دارای تغییر در مکان اپراتور و در ناحیه اتصال *MarR* می‌باشد. این جهش که به صورت تکرار پشت سر هم ۲۰ جفت باز می‌باشد قبلاً گزارش شده‌است. همچنین نشان داده شده که این موتاسیون باعث افزایش رونویسی *MarA* می‌شود (Cohen et al. 1993). به علاوه موتاسیون در ژن *acrR* کد کننده رپرسور پمپ AcrAB-TolC باعث افزایش بیان پمپ می‌شود و یا تغییر در میزان بیان پورین‌های غشایی می‌تواند باعث افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها شود. این یافته که موتان EM4 که مانند موتان‌های EM3 و EM9 اندکی نسبت به سویه تیپ وحشی به تتراسیکلین مقاوم‌تر بوده و حاوی MIC سیپروفلوکساسین بیشتر از تیپ

منابع

- Alekshun MN, Levy SB (1997) Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41:2067-2075.
- Alekshun MN, Levy SB, Mealy TR, Seaton BA, Head JF (2001) The crystal structure of MarR, a regulator of multiple antibiotic resistance, at 2.3 Å resolution. *Nature Structural Biology* 8: 704-710.
- Alekshun MN, Yang SK, Levy SB (2000) Mutational analysis of MarR, the negative regulator of *marRAB* expression in *Escherichia coli*, suggests the presence of two regions required for DNA binding. *Molecular Microbiology* 35:1394-1404.
- Altmann SW, Davis HR, Zhu LJ (2004) Niemann-Pick C1 Like protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 303:1201-1204.
- Asako H, Nakajima H, Kobayashi K, Kobayashi M, Aono R (1997) Organic solvent tolerance and antibiotic resistance increased by overexpression of *marA* in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 63:1428-1433.
- Bennett PM (2008) Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology* 153:347-357.
- Cirz RT, Chin JK, Andes DR, Crecy-Lagard V, Craig WA, Romesberg FE (2005) Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. *PLOS Biology* 3: 1024-1033.
- Cohen SP, Hachler H, Levy SB (1993) Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (*mar*) locus in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 175:1484-1492.
- George AM, Levy SB (1983) Amplifiable resistance to tetracycline, chloramphenicol, and other antibiotics in *Escherichia coli*: involvement of a non-plasmid determined efflux of tetracycline. *Journal of Bacteriology* 155:531-540.
- Hooper DC (2000) Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases* 31:24-28.
- Kohanski MA, Depristo MA, Collins JJ (2010) Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical- induced mutagenesis. *Molecular Cell* 37:311-320.
- Lalitha MK (2004) Manual on antimicrobial susceptibility testing. *Journal of the Indian Microbiology Association* 17-22.
- Li XZ, Nikaido H (2006) Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* 19:382-402.
- Li XZ, Nikaido H (2009) Efflux-mediated drug resistance in Bacteria: an Update. *Drugs* 69:1555-1623.
- Lindgren PK, Karlsson A, Hughes D (2003) Mutation rate and evolution of fluoroquinolon resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrobial. Agents and Chemotherapy* 47: 3222-3232.
- Maneewannakul K, Levy SB (1996) Identification of *mar* mutants among quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40:1695-1698.
- Pourahmad Jaktaji R, Mohiti E (2010) Study of mutations in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 9: 43-45.
- Nikaido H (2009) Multidrug resistance in bacteria. *Annual Review of Biochemistry* 78:119-146.
- Piddock LJV (2006) Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical Microbiology Review* 19: 382-402.
- Pourahmad Jaktaji R, Ebadi R, Karimi M (2012) Study of organic solvent tolerance and increased antibiotic resistance properties in *E. coli gyrA* mutants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 11:596-600.
- Rosner JL (1985) Nonheritable resistance to chloramphenicol and other antibiotics induced by salicylates and other chemotactic repellants in *Escherichia coli* K-12. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 82:8771-8774.
- Seoane AS, Levy SB (1995) Characterization of MarR, the repressor of the multiple antibiotic resistance (*mar*) operon of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 177:3414-3419.