ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۴
صفحه ۴۰۶-۳۹۹

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 کارشناسی‌ارشد، استادیار و استاد دانشگاه شهرکرد، ایران

Ebadi R[1], Pourahmad R*[1], Mahzonieh M[1]

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

در *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 سیکلوهگزان 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 کلون های 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 فعال‌شدن کامل AcrAB-TolC کافی نیست.

واژه‌های کلیدی

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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.10.0]

مقدمه

مقاومت چند دارویی (MDR)[1]، 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 می‌شود (Nikaido 2009). مصرف نامناسب و مکرر آنتی‌بیوتیک‌ها در طول زمان، باعث مقاومت باکتری‌ها در برابر آنها می‌شود (Bennett 2008). مقاومت چند دارویی می‌تواند در نتیجه افزایش انتشار به خارج به وسیله عملکرد پمپ‌های انتشار به خارج چند دارویی ایجاد شود. این پمپ‌ها می‌توانند بیش از یک نوع دارو را به خارج پمپ کنند (Li and Nikaido 2009).

باکتری *E. coli* شایع‌ترین علت بعضی از عفونت‌های باکتریایی مانند عفونت‌های سیستم ادراری، باکتریمی، 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 می‌باشد. در *E. coli* مقاومت آنتی-بیوتیک چندگانه (MAR)[2] و هم تحمل نسبت به حلال‌های آلی به تولید بیش از حد این پمپ نسبت داده شده که به وسیله افزایش بیان تنظیم‌کننده سراسری MarA یا SoxS میانجی‌گری می‌شود. این فعال‌کننده‌های رونویسی، مقدار AcrAB تولید شده را افزایش می‌دهند و به طور موثر انتشار به خارج را بالا می‌برند (Piddock, 2006).

در *E. coli* تنظیم‌کننده MarA توسط جایگاه *mar* کد می‌شود (Cohen et al.1989). اپرون *marRAB* یک واحد رونویسی است که از سه چارچوب ژنی کد کننده پروتئین‌های MarR، MarA و MarB تشکیل شده‌است (Alekshun 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 می‌دارد. غیرفعال شدن MarR منجر به افزایش بیان MarA می‌شود (Cohen et al.1993). ساختار کریستالی MarR نشان می‌دهد که این پروتئین ساختار دایمر داشته که هر زیرواحد آن محتوی یک موتیف اتصال به DNA با ساختار هلیکس- بالدار[3] می‌باشد (Alekshun et al. 2001). پروتئین MarR دارای مهارکننده‌های متعددی مثل سالیسیلات، تتراسیکلین، کلرامفنیکل، استامینوفن، آسپیرین و غیره می‌باشد که مقاومت آنتی‌بیوتیک چندگانه را بالا می‌برند (Rosner 1985; Seone and Levy 1995).

موتان‌های *mar* اپرون *marRAB* را به عنوان نتیجه‌ای از جهش در *marO* یا *marR* بیان می‌کنند اما جهش‌هایی که باعث افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک می‌شوند مکرراً در *marR* قرار گرفته‌اند (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 می‌باشد (Maneewanakul and Levy 1996; Alekshum et al. 2000). با توجه به اهمیت درمان عفونت‌هایی نظیر عفونت ادراری که می‌تواند توسط آنتی بیوتیکی نظیر سیپروفلوکساسین انجام شود بررسی موتان‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین از لحاظ حضور موتاسیون‌های ایجاد کننده فنوتیپ مقاومت چندگانه ضروری می‌باشد.

کینولون‌ها از جمله سیپروفلوکساسین‌ها محسوب شده که از آنتی-بیوتیک‌های ایجاد کننده آسیب در DNA می‌باشند و می‌توانند محرک ظهور موتان‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک 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 میلی‌لیتر از این آنتی‌بیوتیک‌ها تعریف می‌شود. مقاومت سطح متوسط به عنوان مقاومت به غلظت ۱۰ تا ۵۰ میکرو گرم بر میلی-لیتر و مقاومت سطح بالا به عنوان مقاومت به غلظت بیش از ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از این آنتی‌بیوتیک‌ها تعریف می‌شود (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.

[1] Multidrug resistance
[2] Multiple antibiotic resistance
[3] Winged helix

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.10.0]

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) (جدول۱). 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 سیکلوهگزان (Merk Germany) برای تعیین تحمل حلال مورد استفاده قرار گرفتند.

جدول۱- MIC آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین برای موتان‌های *gyrA* مقاوم به آن

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

*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 آنتی بیوتیک تتراسیکلین با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، کلون‌های مقاوم به این آنتی‌بیوتیک جدا‌سازی 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 ($MgSo_4$) 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 سیکلوهگزان با نسبت‌های

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.10.0]

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 مجددا 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 مقادیری 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 (جدول۲).

لازم به ذکر است که تحمل حلال سویه تیپ وحشی و موتان‌های *gyrA* قبلا تعیین شده بود به طوری‌که 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- سیکلوهگزان 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.

جدول۲- 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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.10.0]

جدول۳- 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.

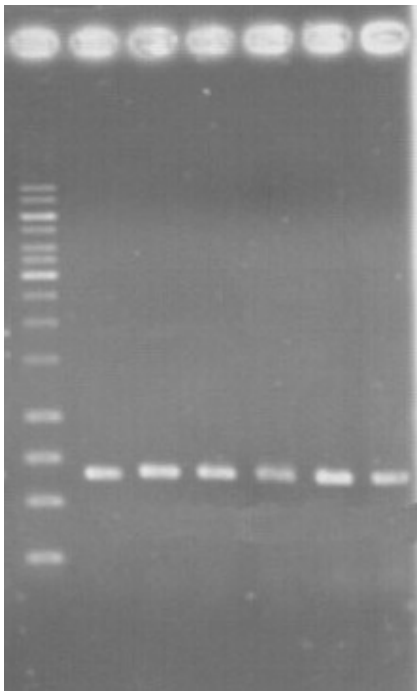
ناحیه *marOR* در سویه تیپ وحشی، موتان‌های *gyrA* اولیه و کلون‌های جداسازی شده مقاوم به تتراسیکلین، PCR و بر روی ژل آگارز الکتروفورز شد (شکل ۱). اندازه ژن *marR*، ۴۳۵ جفت باز بوده و کل ناحیه تکثیر شده در این مطالعه ۷۰۰ جفت باز بود. پس از تعیین توالی ناحیه *marOR* در سویه تیپ وحشی، موتان های *gyrA* اولیه 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 (T→C) در موقعیت ۲۲۱ در توالی نوکلئوتیدی ژن *marR* بود که کدون متیونین ۷۴ به ترئونین تبدیل شد (شکل۲). اگرچه نواحی پروموتر 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 پروموتر 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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.10.0]

حتماً باید از موتان‌های مقاوم به یک نوع آنتی‌بیوتیک نظیر سیپروفلوکساسین برای جداسازی آنها استفاده کرد (Lindgren et al 2003). تماس افزایش‌یافته 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).



شکل۱- 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 و 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 اخیرا 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).

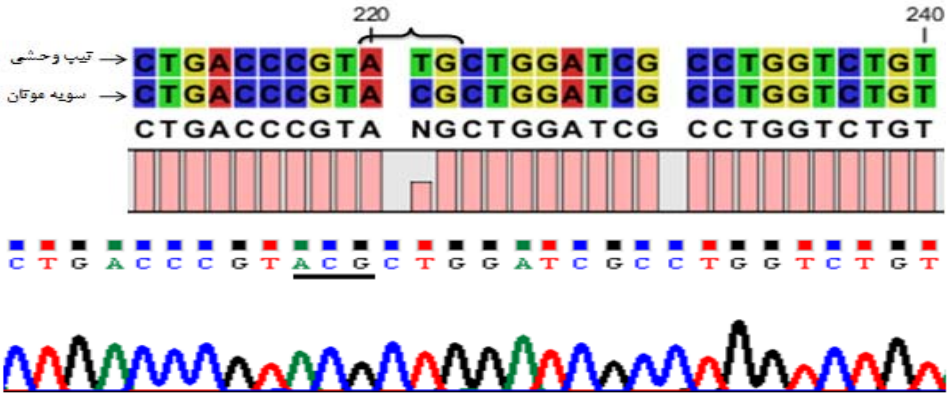
نتایج نشان داد که هیچکدام از موتان‌های *gyrA* حتی انواع با MIC بیشتر برای سیپروفلوکساسین، به خودی خود دارای فنوتیپ مقاومت چند دارویی نیستند ولی برخی از موتان‌های *gyrA* (EM3، EM4 و EM9) ممکن است به تدریج این فنوتیپ را به دنبال قرار گرفتن در معرض القاکننده اپرون *marRAB* نظیر تتراسیکلین کسب کنند. این 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).

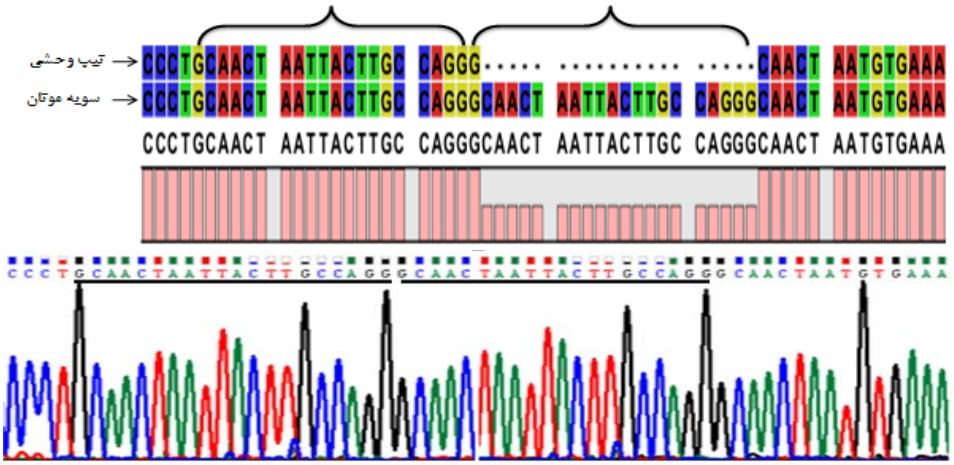
جهش در کدون ۷۳ پروتئین MarR که باعث جایگزینی یک اسیدآمینه هیدروفیل، سیستئین، به جای آرژنین، یک اسیدآمینه بازی، می‌شود قبلاً گزارش شده‌است و نقش بسیار اساسی در اتصال MarR به DNA دارد. همچنین گزارش شده که تغییر دیگری در این کدون که باعث جایگزینی یک اسیدآمینه هیدروفیل، سرین، به جای آرژنین می‌شود باعث ایجاد 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 α4 پروتئین MarR اعلام شده و جزء موتیف اتصال به DNA این پروتئین (MarR-M) می‌باشد (Alekshun et al. 2000).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.10.0]



شکل۲- 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).



شکل۳- 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 تغییریافته).

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 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 احتمالا 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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.10.0]

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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.10.0]