بررسی وابستگی جهش زایی سیپروفلوکساسین به UmuC در *اشرشیا کلی*

سیده مرضیه نوربخش رضایی[۱]، راضیه پوراحمد[۱*] و محمدرضامحزونیه[۲]

[۱] **ایران، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک**

[۲] **ایران، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروبیولوژی**

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۵

چکیده

سیپروفلوکساسین یکی از فلوروکینولونهای مؤثر بر باکتریهای گرم منفی از جمله *اشرشیا کلی* است. در باکتری *اشرشیا کلی* قرارگرفتن در معرض سیپروفلوکساسین منجربه جهش زایی و افزایش مقاومت می شود، علاوه براین با قرارگرفتن در معرض اشعه UV رونویسی از *umuC* در این باکتری القاء می شود. اهمیت پروتئینهای دیگر در جهش زایی مشخص نشده است. بنابراین بررسی جهش زایی درعدم حضور UmuC ضروری می‌باشد. هدف از این تحقیق بررسی وابستگی جهش زایی سیپروفلوکساسین به UmuC در *اشرشیا کلی*، بود. دراین مطالعه از سویه والدی $umuC^-$ و سویه تیپ وحشی ($umuC^+$) باکتری *اشرشیا کلی* استفاده شد و مقاومت به سیپروفلوکساسین به صورت پلکانی در سویه والدی $umuC^-$ القاء شد. برای تعیین MIC سیپروفلوکساسین از روش رقت متوالی در محیط مایع استفاده شد. فراوانی موتاسیون در حضور سیپروفلوکساسین و اشعه UV در این سویه ها تعیین شد. نتایج نشان داد درعدم حضور*umuC* موتانهایی با مقاومت کم و متوسط را می توان از سویه والدی $umuC^-$ تولید نمود اما موتانهایی با مقاومت بالا حاصل نشد و فراوانی موتاسیون در حضور سیپروفلوکساسین در موتان $umuC^-$ پایین بود ولی بیشتر از سویه والدی $umuC^-$ و تیپ وحشی بود. فراوانی موتاسیون در مجاورت اشعه UV در موتان $umuC^-$ در مقایسه با تیپ وحشی پایین بود. بنابراین حضور UmuC برای ایجاد موتانهایی با مقاومت بالا به سیپروفلوکساسین لازم است. فراوانی موتاسیون پیشنهاد می کند؛ در عدم حضور UmuC فاکتورهای دیگری هم می توانند تاثیر گذار باشند.

واژ ه های کلیدی: سیپروفلوکساسین، جهش زایی، UmuC، باکتری *اشرشیا کلی*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۸۳۲۳۲۴۴۰۱، پست الکترونیکی: Razieh_Jaktaji@yahoo.com

مقدمه

از زمان شناخت باکتریها، بشر همواره در پی یافتن دارویی مؤثر برای درمان عفونتهای ناشی از آنها بوده است و باکتریها نیز به مکانیسم های مؤثری برای مقابله با آنتی بیوتیکها دست یافته اند (۱، ۲ و ۳). آنتی بیوتیکها عوامل ضد میکروبی تولید شده توسط میکروارگانیسمهای مختلف (باکتریها، قارچها، اکتینومیستها) هستند، که رشد میکروارگانیسمهای دیگر را سرکوب و در نهایت ممکن است آنها را نابود کنند (۳۳). مقاومت میکروبی پاسخ زیستی طبیعی میکروارگانیسم به یک فشار انتخابی، مانند شرایط آب و هوایی، در دسترس بودن مواد غذایی، اکسیژن و یا آب، یا حضور یک داروی ضد میکروبی است (۳۷).

این فرآیند طبیعی سازگاری بدان معنا است که طول عمر مؤثر آنتی بیوتیکها محدود است. مهم ترین عامل مؤثر در پیدایش مقاومت دارویی استفاده بی رویه و نا به جا از آنتی بیوتیکها است. درمان عفونتهای باکتریایی به دلیل توانایی باکتریها برای گسترش مقاومت نسبت به مواد ضدمیکروبی، امر پیچیده ای است (۲۲).

فلوروکینولونها گروهی از داروهای سنتتیک ضد باکتری هستند، که از خانواده کینولونها مشتق شده اند (۱۵) به علت اثر بخشی برروی طیف وسیعی از باکتریهای بیماری زا گرم منفی و گرم مثبت به طور گسترده در سراسر جهان مورد استفاده قرارمی گیرد. فلوروکینولونها، از اواخر دهه ۱۹۸۰، در حرفه پزشکی، برای درمان عفونتهای شدید مانند عفونت دستگاه ادراری، عفونت معده روده ای، عفونت دستگاه تنفسی، بیماریهای واگیردار جنسی و عفونتهای پوستی استفاده می شوند (۷ و ۳۴).

عفونتهای مجرای ادراری، یکی از مهم ترین و شایع ترین بیماریهای عفونی است که در سنین مختلف روی می دهد و در صورت درمان نادرست می تواند منجر به بروز عوارض خطرناکی شود و سالانه بیش از هشت میلیون بیمار را در گیر می کند (۹).

مطالعات انجام شده مختلف نشان می دهد که باسیلهای گرم منفی به عنوان شایع ترین عامل عفونتهای مجرای ادراری بوده ودربین آنها *اشرشیا کلی* بیش از ۸۰ درصد موارد عفونتهای دستگاه ادراری را تشکیل می دهد (۱۲). باکتری *اشرشیا کلی* نوعی باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است که بخشی از فلور عادی روده انسان است (۱۹). در سال ۱۹۹۹–۱۹۹۷ تقریبا ۶۰ درصد از سویه های *اشرشیا کلی* جداشده از نمونه های عفونت بیمارستانی به سیپروفلوکساسین مقاومت نشان دادند (۳۸).

مقاومت به سیپروفلوکساسین ازطریق جهشهای کروموزومی روی ژنهای کدکننده زیرواحدهای آنزیمهای DNA ژیراز و توپوایزومراز IV و همچنین جهش روی ژنهایی که بیان کانالهای ورودی وخروجی دارو در غشای بیرونی را تحت تأثیر قرار می دهند، ایجاد می شود (۱۷).

آنزیم DNA ژیراز تترامری با دو زیر واحد متفاوت است. زیرواحدهای DNA ژیراز GyrA وGyrB هستند . این آنزیم از توپوایزومراز های نوع دو است که با ایجاد شکست در هردو رشته ازیک قطعه DNA و عبور قطعه دیگر از میان شکست عمل می کند (۱۶).

آنزیم DNA ژیراز باعث ایجاد سوپر کویل منفی DNA می شود که برای شروع همانندسازی ضروری می باشد و همچنین سوپرکویل مثبت ایجاد شده در جلوی چنگال همانندسازی را حذف می کند. مکانیسم عمل سیپروفلوکساسین این گونه است که با به دام انداختن آنزیم روی DNA و اخلال در کار آن مانع حرکت چنگال همانندسازی (۱۴)، RNA پلی مراز (۱۵)، DNA هلیکاز (۳۱) و در نهایت باعث مرگ سلول می شود.

به طورکلی هدف کلیدی در باکتریهای گرم مثبت توپوایزومراز IV است در حالی که در باکتریهای گرم منفی مثل *اشرشیا کلی*، DNA ژیراز هدف اصلی قرار می گیرد. در نتیجه جهش در زیرواحد DNA GyrA ژیراز مخصوصاً در ناحیه تعیین کننده مقاومت به کینولون، باعث مقاومت به سیپروفلوکسازین می شود (۵ و ۱۷). در مطالعات قبلی موتانهای مقاوم به سیپروفلوکساسین که همگی دارای جهش در ژن *gyrA* هستند جداسازی شدند (۱۸).

پاسخ SOS به عنوان یک عامل حیاتی در پاسخ به استرسهای محیطی به خصوص آنتی بیوتیکهایی مانند سیپروفلوکساسین شناخته شده است (۱۱،۱۰ و ۲۹). پاسخ SOS معمولاً از طریق القای آسیب به DNA با عوامل خارجی یا استرسهای محیطی بررسی می شود؛ مهم ترین آنها اشعه UV و آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین می باشد (۲۷). سیپروفلوکساسین شکست دورشته ای در DNA به وجود می آورد که فعال کننده پاسخ SOS است (۲۱). یک سطح بالاتری از RecA تولید می شود (۱۳). سپس LexA که یک پروتئین مهارکننده در SOS می باشد ، را برش می دهد. این برش اثر مهارکنندگی LexA را غیرفعال می کند و نتیجه آن القای ژنهای SOS می باشد (۲۳ و ۲۵). القای SOS می تواند همراه با جهش زایی باشد. برخی از دانشمندان معتقدند که تعدادی از آنتی بیوتیکها مثل

سیپروفلوکساسین فراوانی جهش را از طریق القای پاسخ SOS در باکتریها افزایش می دهند (۴۱).

در باکتری *اشرشیا کلی* قرارگرفتن در معرض آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین منجربه جهش زایی و مقاومت آنتی بیوتیکی می شود و UmuC یکی از زیر واحدهای PolV دارای نقش می باشد. همچنین این پروتئین برای جهش زایی ناشی از اشعه UV ضروری است. علاوه براین با قرارگرفتن در معرض اشعه UV رونویسی از *umuC* القاء می شود درحالی که رونویسی از دیگر ژنهای کدکننده پلیمرازهای مستعد خطا همانند *dnaE* و*dinP* تحت تأثیر آسیب DNA قرار نمی گیرد (۳۵). مطالعات صورت گرفته برروی *استرپتوکوکوس یوبریس* نشان داد که آنتی بیوتیک سیپروفلوکسازین منجربه جهش زایی و مقاومت آنتی بیوتیکی می شود اما حضور UmuC برای این فرآیند ضروری نیست. جهشهایی در ژن سازنده زیر واحد β آنزیمRNA پلیمراز (*rpoB*) که مقاومت به ریفامپین را سبب می شود در این امر مؤثر است (۱۹). همچنین در تحقیق قبلی توسط پوراحمد و پسند نشان داده شد که بیان ژن *recA* و *umuC* درجهش یافته های مقاوم به سیپروفلوکساسین *اشرشیا کلی* افزایش یافت (۲۸). اما مشخص نیست که جهش زایی در سلولهای مقاوم به سیپروفلوکسازین *اشرشیا کلی* تنها وابسته به UmuC باشد. بنابراین تصمیم گرفته شد این مسئله با استفاده از موتانی که در آن *umuC* غیر فعال شده و مقاومت به سیپروفلوکسازین در آن القاء شده بررسی شود.

مواد و رو شها

در این مطالعه ابتدا سویه موتان (JW11731) که *umuC*$^-$ است از مرکز کلکسیون *اشرشیا کلی* (*E. coli* Genetic Store Center) خریداری شد. ژن *umuC* در این سویه آزمایشگاهی از طریق یک ترانسپوزون حامل ژن مقاومت به کانامایسین گسسته و غیر فعال شده است (۴). مشخصات ژنتیکی این سویه موتان و سویه MG1655 باکتری *اشرشیا کلی* مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است. موتانهایی با میزان مقامت بالاتر به سیپروفلوکسازین از این سویه تهیه شد و سپس میزان موتان زایی ناشی از سیپروفلوکسازین و اشعه UV در آن بررسی گردید.

جدول ۱- خصوصیات ژنتیکی سویه ها

سویه / موتان	خصوصیات ژنتیکی	مرجع
MG1655	تیپ وحشی *umuC*$^+$	هدیه پروفوسور لوید
JW11731	F$^-$ λ$^-$ *umuC::km*	(۲)

القای مقاومت به سیپروفلوکسازین در سویه موتان(*umuC*$^-$): سویه موتان (JW11731) در معرض غلظتهای افزایشی از سیپروفلوکساسین(۵ µg/ml-۰/۰۱)(سیگما- آمریکا) به روش پلکانی قرارگرفت تا مقاومت آن افزایش یابد (۳۶).

تعیین حداقل غلظت مهاری(MIC): حداقل غلظت مهاری غلظتی است که مانع از رشد یک ارگانیسم خاص می گردد و به عنوان استانداردی برای تعیین حساسیت میکروارگانیسمها به عوامل ضدمیکروبی در نظر گرفته می شود، که می توان با آزمون رقت متوالی در محیط مایع آن را تعیین نمود. از رقتهای متوالی سیپروفلوکساسین (از غلظت ۵ ng/ml تا ۲ µg/ml) استفاده گردید. مایه تلقیح از کشت شبانه باکتری در محیط LB با تراکم 10^6 CFU/ml، تهیه شد. کشتها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمادهی شدند (۳۹). این آزمایش برای هر سویه سه بار انجام گردید. کمترین غلظت عامل ضد میکروبی که پس از ۲۴ساعت در شرایط آزمایشگاهی مانع از ظهور رشد قابل مشاهده میکروارگانیسم گردد به عنوان حداقل غلظت مهاری در نظر گرفته شد. مقاومت به سیپروفلوکساسین در باکتری *اشرشیا کلی* به سه سطح

تقسیم شده است که در جدول ۲ شرح داده شده است (۲۰).

جدول ۲- سطوح مقاومت به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین در باکتری *اشرشیا کلی*

سطوح مقاومت	MIC(μg/mL)
مقاومت کم	MIC: 0.063 to 1 μg/mL
مقاومت متوسط	MIC: 1 to 32 μg/mL
مقاومت زیاد	MIC: >32 μg/mL

جهش زایی با استفاده ازسیپروفلوکساسین: به منظور بررسی میزان موتاسیون در سلولهای دارای *umuC* فعال و غیر فعال، جهش زایی با استفاده از غلظتهای متفاوت سیپروفلوکساسین (۳۰) به روش زیر صورت گرفت: از کشت مایع تازه موتان به محیط کشتهای کنترل (بدون سیپروفلوکسازین) و سیپروفلوکساسین (با غلظتهای ۰/۰۵ – ۱ μg/mL) منتقل شد و به مدت ۲۴ساعت داخل انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سا نتی گراد قرار داده شد تا رشد نماید. بعد از آن از کشتهای مختلف با استفاده از محلول سالین ۰/۹ درصد رقتهای مختلف (۶-، ۵-، ۴-، ۳-، ۲-، ۱-، ۰) تهیه گردید. به منظور بررسی جهش زایی از آنتی بیوتیک ریفامپین استفاده می شود (۳۰ و ۴۰) بنابراین این رقتها روی محیط جامد بدون ریفامپین و با ریفامپین (۲۰μg/mL) کشت داده شد و به مدت۱۶ الی ۱۸ ساعت داخل انکوباتور ثابت با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس تعداد کلنیها شمارش شد و فراوانی موتاسیون (نسبت تعداد کلنیها مقاوم به ریفامپین همان جهش یافته های ایجاد شده به تعداد کلنیهای مقاوم به سیپروفلوکسازین همان انواع اولیه) محاسبه گردید.

جهش زایی با استفاده ازاشعه UV : به منظور بررسی میزان موتاسیون در سلولهای دارای *umuC* فعال و غیر فعال، جهش زایی با استفاده از دزهای مختلف اشعه UV (۴۰) به روش زیر صورت گرفت: پس از رشد در محیط کشت مایع، محلول به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد در دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس مایع فوقانی تخلیه شد و به این ترتیب رسوب باکتری ، در محلول ۰/۱ مولار MgSO4 با نسبت ۱/۵ برابر حجم اولیه حل شد. سپس سوسپانسیون سلولی(در پتری دیش بدون درب در زیرهود لامینار) درمعرض دزهای (ثانیه۶۰، ۴۰، ۳۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۰) اشعه UV با طول موج ۲۵۴ nm قرارگرفت. سوسپانسیون سلولی اشعه دیده به محیط کشت مایع جدیدی که ۲۰ برابر رقیق شده است منتقل شد و به مدت ۲۴ ساعت در محیط تاریک در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد. بعد از آن رقتهای مختلف با استفاده از محلول سالین ۰/۹ درصد از آن تهیه گردید و این رقتها روی محیط جامد بدون ریفامپین و با ریفامپین (۲۰μg/mL) کشت داده شد و به مدت۱۶ الی ۱۸ساعت داخل انکوباتور ثابت با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس تعداد کلنیها شمارش شد و فراوانی موتاسیون (نسبت تعداد کلنیها مقاوم به ریفامپین به تعداد کلنیهای مقاوم به سیپروفلوکسازین) محاسبه گردید.

نتایج

کشتهای مایع مقاوم به غلظتهای مختلف سیپروفلوکسازین حاصل از روش مقاوم سازی پلکانی به محیط جامد منتقل شد (محیط کشت LB آگار). از هر پلیت به صورت تصادفی ۵ کلنی انتخاب و میزان MIC آنها تعیین گردید. کلاً ۴۰ پلیت و ۲۰۰ کلنی تعیین مقاومت شدند. مقاومت آنها در دو سطح کم و متوسط بود. اگرچه بیشتر آنها دارای مقاومت کم بودند (۹۵ درصد). از میان موتانهای به دست آمده نتایج MIC دو سویه در جدول ۳ شرح داده شده است. میزان MIC سویه تیپ وحشی MG1655 از قبل تعیین شده بود (۱۶). مقدار آن ۰/۰۰۸ μg/ml است.

جدول ۳ – نتایج تعیین MIC سیپروفلوکساسین

سویه / موتان	MIC سیپروفلوکساسین (μg/ml)
umuC⁻ (JW11731)	۰/۰۴
MN1	۰/۳
MN2	۲

نتایج جهش زایی سویه والدیJW11731 و MN2 که سویه های $umuC^-$ هستند و MG1655 سویه $umuC^+$ در جدول ۴ مشاهده می شود. درسویه والدی و تیپ وحشی فراوانی جهش پایین است، اما در MN2 با مقاومت متوسط به سیپروفلوکساسین فراوانی جهش بیشتراست. علت بیشتر بودن میزان فراوانی جهش در MN2 که ($umuC^-$) است از سویه تیپ وحشی ($umuC^+$) به میزان مقاومت آنها به سیپروفلوکسازین وابسته است. به طوری که سویه تیپ وحشی قادر به رشد در غلظت ۵۰۰ ng/ml نبود. همچنین بیشتر بودن میزان فراوانی جهش در MN2 نسبت به سویه والدی اش JW11731 که هر دو سویه های $umuC^-$ هستند احتمالاً دلالت بر فعال شدن عوامل یا پروتئینهایی می باشد که در عدم حضور UmuC می توانند در جهش زایی مؤثر باشند.

جدول ۴- تعیین میزان موتاسیون درسویه $umuC^-$ مقاوم به سیپروفلوکسازین درغلظتهای مختلف سیپروفلوکساسین

سویه / موتان	غلظت سیپروفلوکساسین (ng/ml)	فراوانی موتاسیون ($CFU\ Rif^R/CFU\ Cip^R$)
JW11731	۰	۰/۰۰۶
	۵۰۰	۰
MN2	۰	۰/۰۱۷
	۵۰۰	۰/۴۷۶
MG1655	۰	۰/۰۱
	۵۰۰	۰

نتیجه تعیین فراوانی موتاسیون سویه $umuC^-$ با مقاومت متوسط به سیپروفلوکساسین در دزهای مختلف اشعه UV (بر حسب مدت زمان پرتودهی به ثانیه) در جدول ۵ نشان داده شده است. نتایج سویه والدی مشابه با MN2 بود و در جدول آورده نشده. همان طوری که مشاهده می شود موتان زایی در مجاورت UV کاملاً وابسته به UmuC است.

جدول ۵ – تعیین میزان موتاسیون درسویه $umuC^-$ مقاوم به سیپروفلوکسازین در دزهای مختلف اشعه UV

سویه / موتان	تابش پرتوUV (ثانیه)	فراوانی موتاسیون ($CFU\ Rif^R/CFU\ Cip^R$)
MN2	۰	۰/۰۰۶
	۳۰	۰
MG1655	۰	۰/۱
	۳۰	۰/۴

بحث و نتیجه گیری

سازگاری پاتوژنهای باکتریایی به آنتی بیوتیکها یکی از سریع ترین و برجسته ترین پدیده های سیر تکاملی زیست شناختی را به وسیله بشر به وجود آورده است. باکتریها اغلب مقاومت را به واسطه جهشهایی در ژنهای کروموزومی، در طول درمان کسب می کنند. وقتی باکتری در معرض عوامل ضدمیکروبی قرار می گیرد منجربه انتخاب سویه های مقاوم می شود که در نهایت در جمعیت ثابت می شود (۲۶).

فلوروکینولونها آنتی بیوتیکهای مهمی برای درمان عفونتهای ناشی از باکتریهای گرم منفی مانند باکتری *اشرشیا کلی* هستند. با این حال گسترش سویه های مقاوم به فلوروکینولونها کارآیی این آنتی بیوتیکها را کاهش داده است (۱۵). فلوروکینولونهایی مانند سیپروفلوکساسین باعث ایجاد شکست دو رشته ای در DNA می شوند. پاسخ سلولی به آسیب DNA که به طور گسترده مطالعه شده است، پاسخ SOS در باکتری *اشرشیا کلی* است (۱۷). مطالعات بسیاری درمورد جهش زایی سیپروفلوکساسین براساس القای پاسخ SOS و فعالیت نوترکیبی صورت گرفته است.

تجزیه وتحلیل پاسخ SOS منجربه نگرش جدیدی در مورد فرآیندهای تنظیمی قبل و بعد رونویسی که باعث افزایش بقای سلول بعد از آسیب DNA می شود و همچنین نگرش به جهش زایی القاء شده توسط آسیب DNA همانند جهش زایی SOS، شده است. برای جهش زایی SOS، محصولات

ژنهای *recA* و *umuC* مورد نیاز هستند و باعث تغییر در مکانیسم عمل DNA پلیمراز III می شود به طوری که قادر به همانندسازی DNA حاوی آسیب می شود (۳۲).

آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین در باکتری *اشرشیا کلی* باعث جهش زایی و مقاومت آنتی بیوتیکی می شود و UmuC که یکی از زیر واحدهای PolV است نقش مهمی در این فرآیند دارد. همچنین این پروتئین برای جهش زایی ناشی از اشعه UV ضروری است. علاوه براین اشعه UV باعث القای رونویسی از *umuC* می شود (۶).

سیرز و همکاران و رومزبرگ درمطالعات خود به این نتیجه رسیدند که فعال شدن سیستم SOS باعث جهش زایی می شود (۶ و۸) همچنین مطالعات انجام گرفته روی *استرپتوکوکوس آرئوس* نشان داد که فعال شدن SOS باعث القای جهش زایی می شود، (۵) اما در باکتری *اشرشیا کلی* جهش زایی می تواند دراثر افزایش فعالیت نوترکیبی مستقل از پاسخ SOS در اثر افزایش فعالیت RecA هم ایجاد شود (۲۴).

در مطالعه ای که درسال ۲۰۰۸ انجام شد نشان داده شد که در*استرپتوکوکوس یوبریس* مشابه باکتری *اشرشیا کلی* قرارگرفتن در معرض آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین منجربه جهش زایی ومقاومت آنتی بیوتیکی می شود اما حضور UmuC برای این فرآیند ضروری نیست و جهشهایی در ژن سازنده زیر واحد β آنزیم RNA پلیمراز (*rpoB*)که منجر به مقاومت به ریفامپین می شود در این امر مؤثر است (۱۱). در تحقیق قبلی توسط پوراحمد و پسند معلوم شد که بیان ژن *recA* و *umuC* در موتانهای مقاوم به سیپروفلوکساسین *اشرشیا کلی* افزایش می یابد. جهش در ژن *recA* و *lexA* ممکن است القای SOS را افزایش دهد یا مهارکند. یافته های قبلی حاکی از آن است که ژن *recA* و ناحیه کنترلی بالا دست آن در سویه های جهش یافته دست نخورده است و این نشان می دهد که بیان ژن *recA* تحت کنترل پاسخ SOS است و پروتئین RecA فعال شده قادر به برش LexA و UmuD است (۲۸).

اما مشخص نیست که جهش زایی در سلولهای مقاوم به سیپروفلوکساسین *اشرشیا کلی* تنها وابسته به UmuC باشد. بنابراین تصمیم گرفته شد این مسئله با تهیه موتانی از باکتری *اشرشیا کلی* که در آن ژن *umuC* حذف شده بررسی شود و نتایج حاصله نشان داد که در با کتری *اشرشیا کلی* از سویه والدی *umuC*⁻ می توان موتانهایی با مقاومت کم ومتوسط به دست آورد اما موتانهایی با مقاومت بالا حاصل نشد و پروتئین UmuC برای ایجاد مقاومت بالا نیاز است و نقش اصلی در جهش زایی را ایفاء می کند و احتمالاً مشابه *استرپتوکوکوس یوبریس* مقاومت به سیپروفلوکساسین ممکن است به فاکتورهای دیگری مانند جهشهایی در ژن سازنده زیر واحد β آنزیم RNA پلیمراز (*rpoB*) بستگی داشته باشد، که تحقیقات بیشتری باید در این مورد انجام شود.

تشکر وقدردانی

با تشکر از دانشگاه شهر کرد که با حمایت مالی تحقیق در انجام این مطالعه را یاری نمودند.

منابع

۱- محمدی، پ.، پوراحمد، ر.، شارقی، ب.، فرهادیان، ص. (۱۳۹۶). اثر عصاره آلکالوئیدی گیاه تلخ بیان بر میزان MIC و تجمع داخل سلولی سیپروفلوکساسین در موتان مقاوم به سیپروفلوکساسین *اشریشیا کلی*. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی، (انتشار آنلاین).

۲- قلمفرسا، ف.، پوراحمد، ر. شارقی، ب. (۱۳۹۶). برسی خواص ضد میکروبی و بازدارندگی پمپ AcrAB-TolC چند عسل ایرانی به تنهایی و بصورت ترکیب با سیپروفلوکسازین بر روی سویه های *E. coli* با افزایش *بیان* پمپ AcrAB-TolC. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی، (انتشار آنلاین).

3- Astal, ZE. (2005). Increaseing ciprofloxacin resistance among prevalent urinary tract bacterial isolates in the Gaza Strip, Singapor Medicine Journal, 46(9): 457-459.

4-Baba, T. Ara, T. Hasegawa, M. Takai, Y. Okumura, Y. Baba, M. Datsenko, K.A. Tomita, M. Wanner, B.L. Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in- frame single gene knockout mutants: the keio collection, Molecular Systems Biology, 8: 1-11.

5- Cabral, J.H.M. Jackson, A.P. Smith, C.V. Shikotra, N. Maxwell, A. Liddington, R.C. (1997). Crystal structure of the breakage–reunion domain of DNA gyrase, Nature, 388: 903-906.

6- Cirz, R.T. Chin, J.K. Andes, D.R. Crecy-Lagard, V.D. Craig, W.A. Romesberg, F.E. (2005) Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance, PLoS Biology, 3: e176.

7- Cirz, R.T. Jones, M.B. Gingles, N.A. Minogue, T.D. Jarrahi, B. Peterson, S.N. Romesberg, F.E. (2007). Complete and SOS-mediated response of *Staphylococcus aureus* to the antibiotic ciprofloxacin, *Journal of bacteriology*, 189: 531-539.

8- Cirz, R.T. Romesberg, F.E. (2006) Induction and inhibition of ciprofloxacin resistance-conferring mutations in hypermutator bacteria, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50: 220-225.

9- Drlica, K. Malik, M. Kerns, R.J Zhao, X. (2008) Quinolone-mediated bacterial death, Antimicrobial agents and chemotherapy, 52: 385-392.

10- Drlica, K. Zhao, X. (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones, Microbiology and molecular biology reviews, 61: 377-392.

11- Emilia, V. Jari, J. Kirsi, S. Antti, S. Hanna, J. Pekka, V. (2008). Ciprofloxacin induces mutagenesis to antibiotic resistance independent of UmuC in *Streptococcus uberis*, Environmental Microbiology, 10(8): 2179–2183.

12- Foxman, B. Barlow, R. D'Arcy, H. Gillespie, B. Sobel, J.D. (2000) Urinary tract infection: self-reported incidence and associated cost, J Ann Epidemiology, 10(8): 509-515.

13- Friedberg, E. Walker, G. Siede, W. Putte, P. (1995) DNA repair and mutagenesis, Trends in Biochemical Sciences, 20:440.

14- Hiasa, H. Yousef, D.O. Marians, K.J. (1996). DNA strand cleavage is required for replication fork arrest by a frozen topoisomerase-quinolone-DNA ternary complex, Journal of Biological Chemistry, 271: 26424-26429.

15-Hooper, D.C. (2000). New Uses for New and Old Quinolones and the Challenge of Resistance, Clinical Infectious Diseases, 30(2): 243-254.

16- Hooper, D.C. (2001). Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance, Emerging infectious diseases, 7: 337.

17- Jacoby, G.A. (2005). Mechanisms of resistance to quinolones, Clinical Infectious Diseases, 41: S120-S126.

18- Pourahmad Jaktaji, R. Mohiti, E. (2010). Study of mutations in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherchia coli*, IJPR, 9: 43-48.

19- Johnson, J.R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection, Clinical microbiology reviews, 4: 80.

20- Kishii, R. Takei, M. (2009) Relationship between the expression of *ompF* and quinolone resistance in *Escherichia coli*. Journal of infection and chemotherapy, 15(6): 361-366.

21- Kreuzer, K.N. (2005). Interplay between DNA replication and recombination in prokaryotes, Annu Rev Microbiology, 59: 43-67.

22- Levy, S.B. Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses, Nature medicine, 10: S122-S129.

23- Little, J.W. Edmiston, S.H. Pacelli, L.Z. Mount, D.W. (1980) Cleavage of the *Escherichia coli* lexA protein by the *recA* protease, Proceedings of the National Academy of Sciences, 77: 3225-3229.

24- López, E. Elez, M. Matic, I. Blázquez, J. (2007). Antibiotic-mediated recombination: ciprofloxacin stimulates SOS-independent recombination of divergent sequences in *Escherichia coli*. Molecular microbiology, 64: 83-93.

25- Luo, Y. Pfuetzner, R.A. Mosimann, S. Paetzel, M. Frey, E.A. Cherney, M. Kim, B. Little, J.W. Strynadka, N.C. (2001). Crystal structure of LexA: a conformational switch for regulation of self-cleavage, Cell, 106: 585-594.

26- Martins, L.R.L. Pina, S. Simões, R.L.R. Matos, A.G.F. Rodrigues, P. Costa, P.M.R. (2013) Common Phenotypic and Genotypic Antimicrobial Resistance Patterns Found in a Case Study of Multiresistant *E. coli* From

Cohabitant Pets, Humans, and Household Surfaces, Journal of National Environmental Health Association, 75(6): 74-81.

27- O'reilly, E.K. Kreuzer, K.N. (2004). Isolation of SOS constitutive mutants of *Escherichia coli*, Journal of bacteriology, 186: 7149-7160.

28-Pourahmad Jaktaji, R. Pasand, S. (2015). Overexpression of SOS genes in ciprofloxacin resistant *Escherichia coli* mutants, Gene,576: 115-118 .

29- Power, E. Phillips, I. (1992). Induction of the SOS gene (umuC) by 4quinolone antibacterial drugs, Journal of medical microbiology, 36: 78-82.

30- Riesenfeld, C. Everett, M. Piddock, L.J.V. Hall, B.G. (1997). Adaptive Mutation Produce Resistance to Ciprofloxacin, Antimicrobial Agent and Chemotherapy, 41(9):2059-2060.

31- Shea, M.E. Hiasa, H. (1999). Interactions between DNA helicases and frozen topoisomerase IV quinolone-DNA ternary complexes, Journal of Biological Chemistry, 274: 22747-22754.

32- Smith, B.T. Walker, G.C. (1998). Mutagenesis and More: *umuDC* and the *Escherichia coli* SOS Response, Genetics Society of America, 148: 1599–1610.

33- Soares, G.M.S. Figueiredo, L.C. Faueri, M. Cortelli, S.C. Duarte, P.M. Feres, M. (2012) Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs, Journal of applied oral science, 20(3): 295-309.

34- Soni, K. (2012). Fluoroquinolones: chemistry & action—a review, Indo Glob J Pharm Science, 2: 43-53.

35- Varhimo, E. Savijoki, K. Jalava, J. Kuipers, O.P. Varmanen, P. (2007) Identification of a novel streptococcal gene cassette mediating SOS-mutagenesis in *Streptococcus uberis*, J Bacteriology, 189: 5210–5222.

36- Viveiros, M. Dupont, M. Rodrigues, L. Couto, I. Davin-Regli, A. Martins, M. Page`s, J.M. Amaral, L. (2007). Antibiotic Stress, Genetic Response and Altered Permeability of *E. coli.*, PLOS, 4: e365.

37- Walsh, C. (2003). Where will new antibiotics come from? Nat Rev Microbiology, 1: 65-70.

38- Wang, H. Dzink-Fox, J.L. Chen, M. Levy, S.B. (2001). Genetic Characterization of Highly Fluoroquinolone -Resistant Clinical Escherichia coli Strains from China: Role of *acrR* Mutations, Antimicrobial agents and chemotherapy, 45:1515-1521.

39- Wiegand, I. Hilpert, K. E W Hancock, R. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances, Nature, 3(2): 163-175.

40- Yasuda, T. Morimatsu, K. Horii, T. Nagata, T. Ohmori, H. (1998). Inhibition of *Escherichia coli* RecA coprotease activities by DinI, The EMBO Journal, 17 (11):3207–3216.

41- Ysern, P. Clerch, B. Castano, M. Gibert, I. Barbé, J. Llagostera, M. (1990) Induction of SOS genes in *Escherichia coli* and mutagenesis in *Salmonella typhimurium* by fluoroquinolones, Mutagenesis, 5: 63-66.

Study the dependence of Ciprofloxacin-induced mutagenesis on UmuC in *Escherichia coli*

Nourbakhsh Rezaei SM.,[1] Pourahmad R.[1] and Mahzoonieh M.[2]

[1] Dept. of Genetics, Faculty of Basic Science, University of Shahrekord, Shahrekord, I.R. of Iran

[2] Dept. of Microbiology, Faculty of Veterinary, University of Shahrekord, Shahrekord, I.R. of Iran

Abstract

Ciprofloxacin is a fluoroquinolone effective against Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli*. In *Escherichia coli* exposure to ciprofloxacin resulted in mutagenesis and increase in antibiotic resistance. In addition, exposure to UV radiation induces the transcription of *umuC*. The importance of other proteins in mutagenesis has not been investigated. Thus, study mutagenesis in the absence of *umuC* is necessary. The aim of this study was to study the dependence of ciprofloxacin-induced mutagenesis on UmuC in *Escherichia coli*.In this research, *Escherichia coli umuC*$^-$ strain and wild type strain (*umuC*$^+$) was used and resistance to ciprofloxacin was induced stepwise. To determine the MIC of ciprofloxacin serial dilution method in broth medium was used. The mutation frequency was determined in the presence of ciprofloxacin and UV rays.The results showed that in the absence of UmuC mutants with low and medium resistance can be produced from *umuC*$^-$ parent strain but high resistant mutants were not obtained and the mutation frequency was low in the presence of ciprofloxacin in *umuC*$^-$ mutant, but higher than that of parent and wild type strains. Mutation frequency in the presence of UV rays in *umuC*$^-$ mutant was lower than that in wild type strain. In conclusion, UmuC is required to generate mutants with high resistance to ciprofloxacin. The frequency of mutation suggests that other factors might be effective.

Key words: Ciprofloxacin, mutagenesis, UmuC, *Escherichia coli* bacteria