

***recA* gene expression in ciprofloxacin resistant *Escherichia coli* *dinI* mutant**

Sare Mohammadi

M.Sc. student of Genetics, Faculty of Science, Shahrekord University, Iran, mohammadi.sare@gmail.com

Razieh Pourahmad*

Associate professor of Genetics, Faculty of Science, Shahrekord University Iran, razieh_jaktaji@yahoo.com

Mohammad Reza Mahzoonieh

Professor of Microbiology, Faculty of Veterinary medicine, Shahrekord University Iran, mahzoon2@yahoo.com

Abstract

Introduction: Microorganisms in response to drug development, acquire resistance through a variety of mechanisms. The prevalence of resistance to fluoroquinolones (FQ), such as ciprofloxacin in *Escherichia coli* has increased markedly in recent years. Mutagenesis induced by SOS catalyzes the evolution of resistance to fluoroquinolones. A member of the SOS regulon is the *dinI* gene. Protein encoded by the gene *DinI* acts as positive and negative modulator of *RecA* performance. Previous studies showed *recA* gene expression in ciprofloxacin resistant *Escherichia coli* *dinI*⁺ in which mutants increased. The aim of this study was to investigate *recA* gene expression in *dinI* mutant resistant to ciprofloxacin

Materials and Methods: For this purpose, *dinI* mutant became ciprofloxacin resistant by encountering to increase amount of ciprofloxacin via stepwise method and be evaluated for MIC. Then, the expression of *recA* gene was determined in wild type, *dinI* and a *dinI*⁺ mutants by real time PCR.

Results: The results showed that a *dinI* mutant acquired low level of resistance to ciprofloxacin and its MIC was 0.3 µg/ml. *recA* gene expression in the *dinI* mutant was increased in comparison with wild type strain. However, the amount of increase was about one fourth of increase in *dinI*⁺ mutant.

Discussion and conclusion: In conclusion, inactivation of *dinI* gene does not inhibit increase in *recA* gene expression and regulation of *RecA* activity is possibly complex and could be conducted in the absence of *dinI* by other regulatory proteins.

Key words: Ciprofloxacin, SOS response *Escherichia coli*, Real Time PCR

* Corresponding author

Received: April 24, 2016 / **Accepted:** September 11, 2017

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال هفتم، شماره ۲۶، تابستان ۱۳۹۷، ۷۲-۶۵
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۰۵- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۲۰

بیان ژن *recA* در موتان *dinI* مقاوم به سیپروفلوکسازین /شریشیا کلی

ساره محمدی: دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، ایران، mohammadi.sare@gmail.com
راضیه پوراحمد*: دانشیار ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، ایران، razieh_jaktaji@yahoo.com
محمدرضا محزونیه: استاد میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، ایران، mahzoon2@yahoo.com

چکیده

مقدمه: در پاسخ به توسعه داروها، ریز موجودات با سازوکارهای متنوعی به آنها مقاوم می‌شوند. در سال‌های اخیر، شیوع مقاومت به فلوروکینولون‌ها مانند سیپروفلوکسازین در /شریشیا کلی به‌طور چشمگیری افزایش یافته است. موتان زایی ناشی از SOS، مقاومت به فلوروکینولون‌ها را القا می‌کند. ژن *dinI* عضو تنظیمی پاسخ SOS است و پروتئین DinI را کد می‌کند که تعدیل‌کننده مثبت و منفی عملکرد RecA است. در بررسی‌های پیشین مشخص شده است که با بیان ژن *recA* در موتان‌های *dinI*⁺/شریشیا کلی، مقاوم به سیپروفلوکسازین افزایش می‌یابد. هدف پژوهش حاضر، بررسی بیان ژن *recA* در موتان *dinI* مقاوم به سیپروفلوکسازین است.

مواد و روش‌ها: موتان باکتریایی *dinI*⁻ در معرض غلظت‌های افزایشی سیپروفلوکسازین به روش پلکانی مقاوم و MIC تعیین شد. سپس بیان ژن *recA* در سویه تیپ وحشی و موتان‌های مقاوم *dinI*⁻ و *dinI*⁺ با روش Real time PCR بررسی شد.

نتایج: نتایج نشان دادند که مقاومت سویه *dinI*⁻ به سیپروفلوکسازین کم و MIC آن ۰/۳ میکروگرم در میلی‌لیتر است. میزان بیان ژن *recA* در موتان *dinI*⁻ مقاوم به سیپروفلوکسازین نسبت به سویه تیپ وحشی افزایش یافت، هرچند میزان افزایش بیان حدود یک‌چهارم سویه *dinI*⁺ بود.

بحث و نتیجه‌گیری: غیرفعال‌سازی *dinI* مانع افزایش بیان ژن *recA* نمی‌شود و تنظیم فعالیت RecA احتمالاً پیچیده است و در نبود *dinI*، توسط پروتئین‌های تنظیمی دیگر انجام شود.

واژه‌های کلیدی: سیپروفلوکسازین، پاسخ SOS، /شریشیا کلی، Real Time PCR

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

مقاومت آنتی‌بیوتیکی یکی از نگرانی‌های جهانی در پزشکی است؛ با وجود گونه‌های بیماری‌زای بسیار مقاوم، درمان بیماری‌های ناشی از آنها مشکل است و در این زمینه، داروی‌های جدید در حال توسعه هستند. باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون مقاوم می‌شوند و پیشرفت‌هایی در درک مقاومت به این عوامل حاصل شده است (۱). کینولون‌ها و فلوروکینولون‌ها، گروه به نسبت جدیدی از آنتی‌بیوتیک‌های سنتتیک با فعالیت گسترده ضد باکتریایی قوی در برابر تعداد بسیاری از بیماری‌زاهای مهم بالینی مسئول بسیاری عفونت‌ها مانند عفونت‌های مجاری ادراری، عفونت‌های دستگاه گوارش، عفونت‌های دستگاه تنفس، بیماری‌های منتقل‌شونده جنسی و عفونت‌های پوست هستند (۲). در حال حاضر، سیپروفلوکساسین شایع‌ترین فلوروکینولون برای تجویز دارویی است (۱). در سال‌های اخیر، شیوع مقاومت به فلوروکینولون‌ها در *اشریشیا کلی* به طور چشمگیری افزایش یافته است (۳). *اشریشیا کلی* عضو مهمی از میکروفلورهای روده انسان و دیگر پستانداران است و چند سویه مختلف آن به وسیله عوامل بیماری‌زا که بر تعداد وسیعی از فرآیندهای سلولی اثر می‌گذارند، باعث بیماری‌های مختلف روده‌ای و خارج روده‌ای می‌شوند (۴). پاسخ SOS، مسیر کلاسیک پاسخ به تنش باکتریایی است که هنگام آسیب DNA به دلیل محدوده وسیعی از عوامل تنش‌زا مانند آنتی‌بیوتیک‌ها القا می‌شود. فلوروکینولون‌ها، آنتی‌بیوتیک‌های قوی و کشنده‌ای هستند که DNA جیراز را مهار می‌کنند و

باعث تثبیت شکست دو رشته، توقف چنگال همانندسازی و در نهایت مرگ سلولی می‌شوند. از آنجا که فلوروکینولون‌ها باعث تثبیت شکست دو رشته می‌شوند، از القاکننده‌های پاسخ SOS هستند و احتمالاً موتان‌زایی ناشی از SOS، توسعه مقاومت به فلوروکینولون‌ها را القا می‌کند (۵). در *E. coli*، پاسخ SOS به محض آسیب DNA القا می‌شود و در نتیجه، افزایش بیان مجموعه‌ای از ژن‌های درگیر در ترمیم DNA و دیگر عملکردها اتفاق می‌افتد (۶). *RecA*، نقش اصلی را در نوترکیبی، ترمیم و القای SOS از راه شکل‌گیری فیلامنت‌های *RecA-DNA* ایفا می‌کند (۷). ژن *dinI* یک ژن SOS است که روی موقعیت *min ۲۴/۶* کروموزوم *E. coli* قرار دارد و پروتئین کوچکی با ۸۱ آمینواسید را کد می‌کند (۶). با استفاده از NMR اسپکتروسکوپی نشان داده شده است که *DinI* محکم به ناحیه C-ترمینال *RecA* متصل است و این برهم‌کنش به محض الیگومریزاسیون *RecA* افزایش می‌یابد (۸). *DinI* در غلظت نزدیک به غلظت استوکیومتری، آثار تثبیت‌کننده‌ای روی فیلامنت‌های *RecA* دارد و به میزان ناچیزی فعالیت‌های *RecA* را محدود می‌کند (۹). بررسی‌هایی که تاکنون انجام شده‌اند با میان‌کنش پروتئین *DinI* با *RecA* و آثار تنظیمی این پروتئین مرتبط هستند و ضرورت حضور این پروتئین و یا میزان بیان آن در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین مطالعه نشده است. میزان بیان ژن *recA* در سویه‌های *dinI⁺* پیش از این زیاد گزارش شده است (۱۰). هدف پژوهش حاضر، بررسی بیان ژن *recA* در سویه‌های *dinI* بود.

مواد و روش‌ها

در جدول ۱، ویژگی‌های ژنتیکی سویه‌های وحشی و موتان استفاده شده شرح داده شده است.

در جدول ۲، ویژگی‌های پرایمرهای استفاده شده آمده است.

جدول ۱- ویژگی‌های ژنتیکی سویه‌های وحشی و موتان

استفاده شده

ویژگی‌های ژنتیکی	سویه استفاده شده
<i>E. coli K12</i>	MG1655
موتان مضاعف <i>marR</i> و <i>gyrA</i>	PM1
<i>F⁺ K⁻ dinI::km</i>	SM1

جدول ۲- توالی پرایمرهای استفاده شده

نوع پرایمر	ترتیب توالی	طول توالی (جفت باز)	اندازه محصول (جفت باز)	Reference
<i>recA</i> F	5'-ACA CGC TGC TGA TCT TCA TC-3'	۲۰	۲۰۲	(۱۰)
<i>recA</i> R	5'-GCA GCG ATT TTG TTC TTC AC-3'	۲۰		
<i>gapA</i> F	5'-ACT TAC GAG CAG ATC AAA GC-3'	۲۰	۱۷۰	(۱۱)
<i>gapA</i> R	5'-AGT TTC ACG AAG TTG TCG TT-3'	۲۰		

استفاده شدند. سپس، محیط مایع مربوط به مقاومت با غلظت کم سیروفلوکسازین (سیگما-آمریکا) تیمار شد و درون انکوباتور شیکردار و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۸۰rpm قرار گرفت. سپس، OD(optical Density) نمونه‌ها در طول موج ۶۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد که باید برابر ۰/۶ باشد.

برای استخراج RNA از کیت (کیاژن-آمریکا) استفاده شد. با استفاده از کیت (فرمنتاس- فلاندا) (RNase-free, DNaseI) روی نمونه‌هایی که RNA آنها استخراج شده بود، تیمار انجام شد تا DNA حذف شود و فقط RNA خالص در نمونه موجود باشد. آب DEPC (دی‌اتیل‌پیروکربنات) برای به حجم رساندن نمونه طی فرآیند تیمار DNase استفاده شد. برای اطمینان از اینکه نمونه‌های تیمار شده با DNase بدون DNA هستند، واکنش PCR برای هر یک از آنها انجام شد. پس از اطمینان از نبود آلودگی به DNA در نمونه‌های RNA، جذب و غلظت RNA و میزان خلوص آن در هر یک از نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفوتومتر

تعیین MIC: موتان باکتریایی برای مقاوم شدن در معرض غلظت‌های افزایشی سیروفلوکسازین (سیگما-آمریکا) از غلظت ۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر تا ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر) به روش پلکانی قرار داده شد (۱۱). برای تعیین MIC، از روش رقت‌های متوالی در محیط مایع (LB) (۱۲) و رقت‌های متوالی سیروفلوکسازین از غلظت ۵ نانوگرم در میلی‌لیتر تا ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده شد. 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 سانتی‌گراد گرمادهی شدند. آزمایش برای هر سویه، سه بار تکرار و کمترین غلظت عامل ضد میکروبی که پس از ۲۴ ساعت در شرایط آزمایشگاهی مانع رشد درخور مشاهده ریزموجود شد، کمترین غلظت مهارتی در نظر گرفته شد.

استخراج RNA: ابتدا کشت تازه از موتان‌ها روی محیط LB (مرک-آلمان) آگار تهیه شد. کلنی‌های تک سویه‌های کشت شده برای تلقیح در محیط مایع LB

دمایی بهینه برای ژن مدنظر، PCR شد تا درستی سنتز cDNA با مشاهده باند ویژه حاصل از تکثیر cDNA روی ژل آگارز تأیید و از مطلوب بودن شرایط دمایی برای به کار بردن آن در واکنش Real time PCR اطمینان حاصل شود. سپس، بررسی بیان با کمک روش Real time PCR انجام شد. در این بررسی، میزان بیان ژن با روش فافل بررسی و از ژن خانه زاد *gapA* برای تعیین بیان نسبی ژن استفاده شد. بررسی آماری نتایج بیان نسبی ژن با استفاده از آزمون تی^۱ و نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و برنامه اکسل انجام شد. حدود اطمینان برای همه آزمایش‌ها ۹۵ درصد در نظر گرفته و $p < 0/05$ معنادار محسوب شد.

نتایج

نتایج تعیین MIC: مقاومت به سیپروفلوکساسین به سه سطح کم، متوسط و زیاد تقسیم می‌شود (۱۳). نتایج MIC سویه‌ها تعیین شد (جدول ۴). نتایج برای سویه تیپ وحشی MG1655 و PM1 مشابه با پژوهش‌های پیشین بود (۱۴ و ۱۵). مقاومت PM1 و SM1 به سیپروفلوکساسین به ترتیب زیاد و کم بود.

جدول ۴- نتایج تعیین MIC

MIC سیپروفلوکساسین ($\mu\text{g/ml}$)	فوتیپ	ژنوتیپ	نام سویه
۰/۰۰۸	مقاومت کم به سیپروفلوکساسین	<i>dinI</i> ⁺	MG1655
۱۰۰	مقاومت زیاد به سیپروفلوکساسین	<i>dinI</i> ⁺	PM1
۰/۳	مقاومت کم به سیپروفلوکساسین	<i>dinI</i> ⁻	SM1

UV/Visible اندازه‌گیری شد. به‌طور معمول نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر نمونه‌های حاوی RNA، ۲ و بیشتر است. چنانچه نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ برابر ۱/۸ باشد، نمونه، DNA خالص دارد و نسبت کمتر از ۱/۸، وجود ناخالصی با ترکیبات حلقوی و پروتئین‌ها را نشان می‌دهد.

سنتز cDNA: برای سنتز cDNA از کیت (یکتا تجهیز- آلمان) استفاده و تمام مراحل کار مطابق کیت انجام شد. از آنجا که برای سنتز cDNA باید مقدار RNA هر یک از نمونه‌ها برابر و یکسان باشد، حجم مشخصی از نمونه با توجه به غلظت محلول RNA برداشت شد. طبق بروشور کیت، پس از اضافه کردن حجم معینی از RNA که عاری از DNA است، پرایمر هگزامر تصادفی به هر نمونه اضافه شد. dNTP با غلظت ۱ میلی‌مولار، آنزیم ترانس کریپتاز معکوس ۲۰۰ واحد و بافر 5X استفاده شد. در مرحله آخر، نمونه‌ها برای سنتز cDNA در دستگاه PCR قرار گرفتند. شرایط دمایی برای واکنش PCR برای سنتز cDNA در جدول ۳ آمده است. سپس نمونه‌های سنتز شده در منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جدول ۳- شرایط دمایی واکنش PCR برای سنتز cDNA

درجه حرارت	مدت زمان	تعداد چرخه
۲۵	۱۰ دقیقه	۱
۴۲	۶۰ دقیقه	۱
۷۰	۱۰ دقیقه	۱

نمونه‌های cDNA سنتز شده به‌عنوان الگوی برای واکنش Real time PCR و بررسی میزان بیان ژن استفاده شدند. در این مرحله، نمونه cDNA در شرایط

هر قطعه DNA دو رشته‌ای دارای دمای ذوب منحصر به فردی است که ۵۰ درصد مولکول DNA، تک رشته‌ای می‌شود. منحنی ذوب، تکثیر محلول ویژه را مشخص می‌کند و نشان می‌دهد که آیا پرایمر دایمر تشکیل شده است که در واکنش تداخل ایجاد کرده باشد. در واکنش Real time PCR برای ژن‌های مدنظر، تنها یک قله وجود دارد که آلودگی نداشتن به DNA ژنومی و تکثیر اختصاصی ژن مدنظر را نشان می‌دهد. منحنی ذوب برای ژن‌های *recA* و *gapA* به ترتیب در شکل‌های ۴ و ۵ نشان داده شده است.

نتایج بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده:

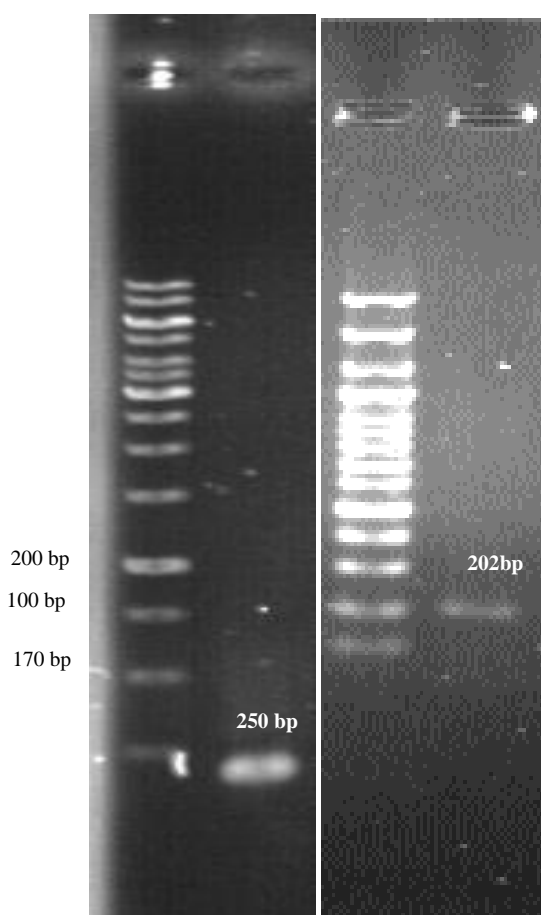
برای بررسی نبود آلودگی DNA در RNA استخراج شده از روش PCR و ژل الکتروفورز استفاده شد. در نمونه‌های RNA تیمار شده با DNase، هیچ بانندی مشاهده نشد که حاکی از نبود آلودگی نمونه‌ها به DNA ژنومی باشد. بررسی غلظت RNAهای استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر انجام شد. کل RNAهای استخراج شده از سویه‌های مدنظر دارای غلظت مناسب بودند و نسبت A_{260}/A_{280} (Absorption) برای تمام نمونه‌ها مناسب و بیش از ۱/۸ بود.

بررسی حضور cDNA در کتابخانه cDNA:

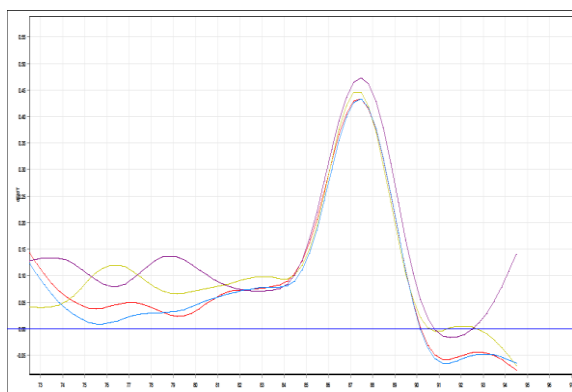
پس از سنتز cDNA با استفاده از کیت یکتا تجهیز، برای اطمینان از سنتز cDNA، واکنش PCR در تمام نمونه‌ها برای ژن *dinI* انجام شد. با توجه به نتایج PCR و شدت رنگ باند می‌توان از سنتز cDNA به شکل کیفی مطمئن شد و دمای بهینه اتصال پرایمر برای Real time PCR را تعیین کرد. نتیجه PCR ژن *recA* در شکل ۱ نشان داده شده است.

نتایج بررسی بیان ژن با روش Real time PCR:

ارزیابی کمی تغییرات بیان ژن‌های *recA* و *gapA* در سویه تیپ وحشی و نمونه‌های جهش یافته با روش Real time PCR انجام شد. پس از تنظیم و بهینه کردن شرایط، منحنی تکثیر نمونه‌ها بررسی شد که افزایش علامت‌های فلورسانس ساطع شده از رنگ سایبرگرین را هنگام پیشروی چرخه‌های واکنش مشخص می‌کند و با ترسیم خط آستانه، چرخه آستانه برای هر یک از نمونه‌ها مشخص شد. منحنی تکثیر برای ژن‌های *recA* و *gapA* به ترتیب در شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است.



شکل ۱- نتیجه PCR ژن *recA* (سمت راست) و *gapA* (سمت چپ) به ترتیب پس از لدر ۱۰۰ جفت بازی و ۱ کیلو بازی



شکل ۵- منحنی ذوب Real time PCR ژن *recA* سویه‌های تیپ وحشی و موتانت؛ رنگ‌های قرمز و کرم، دو غلظت از سویه تیپ وحشی و رنگ‌های آبی تیره و روشن، نمونه‌های موتانت هستند.

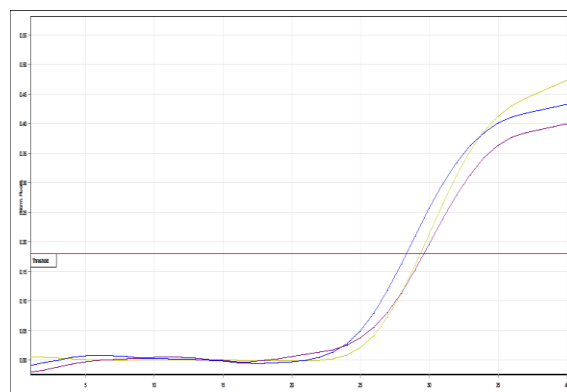
جدول ۵- بیان نسبی ژن *recA*

مقدار P	میزان بیان نسبی ژن <i>recA</i>	نام سویه
-	۱	تیپ وحشی
۰/۰۲	۹/۴	PM1
۰/۰۱	۲/۱۲	SM1

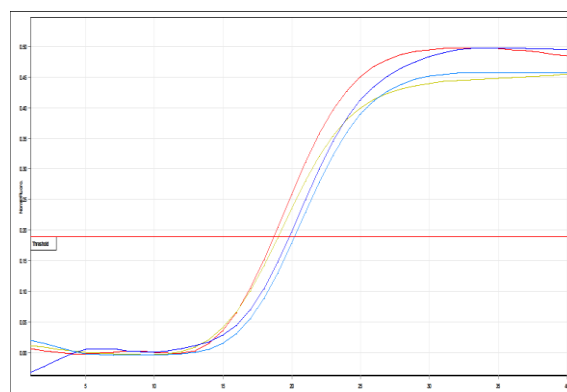
بیان ژن مدنظر با روش فافل بررسی شد (جدول ۵). نتایج Real time PCR نشان دادند که میزان بیان ژن *recA* در سویه SM1 (*dinI*) افزایش یافته است، هرچند میزان افزایش بیان به اندازه PM1 ($dinI^+$) نبود و بنابراین غیرفعال‌سازی *dinI* مانع از افزایش بیان ژن *recA* نمی‌شود.

بحث و نتیجه‌گیری

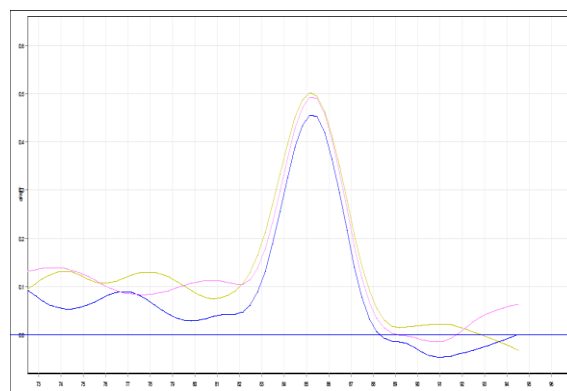
درمان عفونت‌ها با داروهای ضد میکروبی مزایای بسیاری برای سلامتی انسان دارد (۱۶). مقاومت باکتریایی هم‌گام با استفاده از عوامل ضد میکروبی ظهور کرده است. درمان طولانی‌مدت با آنتی‌بیوتیک به توسعه مقاومت در ریزموجوداتی منجر می‌شود که در ابتدا به آنتی‌بیوتیک حساس بوده‌اند (۱۷). در سال‌های اخیر، شیوع مقاومت به فلوروکینولون‌ها در میان *شریشیا*



شکل ۲- منحنی تکثیر واکنش Real time PCR ژن *gapA* سویه‌های تیپ وحشی و موتانت؛ رنگ آبی، سویه تیپ وحشی و رنگ‌های زرد و بنفش نمونه‌های موتانت هستند.



شکل ۳- منحنی تکثیر واکنش Real time PCR ژن *recA* سویه‌های تیپ وحشی و موتانت؛ رنگ‌های قرمز و کرم، دو غلظت از سویه تیپ وحشی و رنگ‌های آبی تیره و روشن، نمونه‌های موتانت هستند.



شکل ۴- منحنی ذوب Real time PCR ژن *gapA* سویه‌های تیپ وحشی و موتانت؛ رنگ آبی، سویه تیپ وحشی و رنگ‌های زرد و بنفش، نمونه‌های موتانت هستند.

است و با آغاز پاسخ SOS، تولید آن القا می‌شود. میان کنش *DinI* و *RecA* در اواخر پاسخ SOS پس از ترمیم DNA آسیب‌دیده و زمانی افزایش می‌یابد که سلول‌ها برای بازگشت به حالت غیر القا آماده می‌شوند و *DinI* به‌عنوان تنظیم‌کننده پایین‌دست پاسخ SOS عمل می‌کند (۲۰). در پژوهش پوراحمد^۳ و پسند^۴ (۲۰۱۶) مشخص شد که بیان ژن *recA* در موتان‌های مقاوم به سیروفلوکسازین *E. coli dinI*⁺ افزایش می‌یابد (۱۰). تاکنون میزان بیان ژن *recA* در سطح mRNA و پروتئین در سویه *dinI* پس از تیمار با سیروفلوکسازین بررسی نشده است و در مطالعه حاضر، بیان ژن *recA* در سویه‌های موتان *dinI*⁻ بررسی شد تا تأثیر غیر فعال‌سازی ژن *dinI* بر میزان بیان ژن *recA* مشخص شود. پژوهش حاضر برای نخستین بار نشان داد که در سویه‌های مقاوم به سیروفلوکسازین، بیان ژن *recA* در نبود *dinI* افزایش می‌یابد. نتایج Real time PCR مشخص کردند که میزان بیان ژن *recA* در سویه جهش‌یافته *SM1 (dinI)* افزایش می‌یابد، هرچند این میزان افزایش بیان، حدود یک‌چهارم میزان افزایش بیان در سویه *PM1 (dinI)* است. این مسئله، ضرورت افزایش فعالیت *recA* برای رفع آسیب‌های ناشی از حضور سیروفلوکسازین را نشان می‌دهد. انتظار می‌رود که پروتئین‌های تنظیمی دیگری مانند *RecF*، *UvrD* و *CRdg*، *RecA* را در نبود *dinI* تنظیم کنند.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه شهرکرد برای حمایت مالی از پژوهش حاضر تشکر می‌شود.

کلی و کلبسیلا پنومونیه به‌طور چشمگیری افزایش یافته است (۳ و ۱۸). در بین کینولون‌ها، سیروفلوکسازین دارای بیشترین تأثیر به‌عنوان آنتی‌بیوتیک نسل دوم روی باکتری‌های گرم منفی و مثبت است و به این ترتیب، مقاومت نسبت به این عوامل باعث نگرانی‌هایی در انتخاب درمان مناسب می‌شود (۱۳). از آنجا که فلوروکینولون‌ها باعث تثبیت شکست در دو رشته می‌شوند، از القاکننده‌های پاسخ SOS هستند و نشان داده شده است که موتان‌زایی ناشی از SOS شاید توسعه مقاومت به فلوروکینولون‌ها را القا کند (۵ و ۱۹). *LexA* (رپرسور) و *RecA* (الفاگر)، دو پروتئین کلیدی در پاسخ SOS هستند. به محض آسیب DNA، *RecA* با اتصال به DNA تک رشته (ssDNA) برای شکل‌دهی فیلامنت نوکلئوپروتئینی فعال می‌شود. *RecA* فعال، خودبرشی *LexA* را تحریک می‌کند و سبب از سرگیری بیان ژن‌های SOS می‌شود. ژن *dinI* کدکننده پروتئین *DinI* با ۸۱ آمینواسید، عضو تنظیمی پاسخ SOS است (۶). *DinI* به‌عنوان تعدیل‌کننده مثبت عملکرد *RecA* فعالیت می‌کند (۸ و ۱۹). در سال ۲۰۰۴، لوستی^۲ و همکاران با بررسی نقش *DinI* در تنظیم نوترکیبی و پاسخ SOS کشف کردند که *DinI* در غلظت نزدیک به غلظت استوکیومتری دارای آثار تثبیت‌کننده روی فیلامنت‌های *RecA* است و به میزان ناچیزی فعالیت‌های *RecA* را محدود می‌کند، در حالی که در غلظت زیاد باعث بی‌ثباتی فیلامنت‌ها می‌شود. آنها نشان دادند که C-ترمینال *RecA*، میان‌کنش *DinI* و *RecA* را تعدیل می‌کند (۹). غلظت زیادی از *DinI* برای این فعالیت‌های بیوشیمیایی و همچنین مهار فعالیت کوپروتئازی *RecA* در خودبرشی پروتئین *UmuD* نیاز است. مقدار پروتئین *DinI* طی فاز نرمال رشد سلول‌های باکتریایی ناچیز

References

- (1) Redgrave LS., Sutton SB., Webber MA., Piddock LJV. Fluoroquinolon resistance: mechanisms, impact on bacteria and role in evolutionary success. *Cell press* 2014; 22: 438-445.
- (2) Levy SB., Marshal B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine* 2004; 10: 122-129.
- (3) Lautenbach E., Metlay JP., Bilker WB., Edelstein PH., Fishman NO. Association between fluoroquinolone resistance and mortality in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* infections: The Role of Inadequate Empirical Antimicrobial Therapy. *Clinical infectious diseases* 2005; 41: 423-429.
- (4) Kaper JB., Nataro JP., Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature* 2004; 2: 123-140.
- (5) Torres- Barcelo C., Kojadinovic M., Moxon R., craig MR. The SOS response, increases bacterial, fitness, but not evolvability, under a sublethal dose of antibiotic. *The royal society* 2015; 282: 1-8.
- (6) Yasuda T., Morimatsu K., Horii T., Nagata T., Ohmori H. Inhibition of *Escherichia Coli RecA* coprotease activities by *DinI*. *EMBO journal* 1998; 17: 3207-3216.
- (7) Renzette N., Gumlaw N., Sandler SJ. DinI and RecX modulate RecA-DNA structures in *Escherichia coli* K-12. *Molecular microbiology* 2007; 63: 103-115.
- (8) Lusetti SL., Drees JC., Stohl EA., Seifert HS., Cox MM. The DinI and RecX Proteins are competing Modulators of *RecA* Function. *Biological Chemistry* 2004; 279: 55073-55079.
- (9) Lusetti SL., Voloshin ON., Inman RB., Camerini-Otero RD, Cox MM. The DinI Stabilizes RecA Protein Filaments. *Biological chemistry* 2004; 279: 30037-30046.
- (10) Pourahmad Jaktaji R., Pasand S. Overexpression of SOS genes in ciprofloxacin resistant *Escherichia coli* mutants. *Gene* 2016; 576: 115-118.
- (11) Viveiros M., Dupont M., Rodrigues L., Couto I., Davin-Regli A., Martins M., et al. Antibiotic Stress, Genetic response and altered permeability of *E.coli*. *PLoS ONE* 2007; 2: e365.
- (12) Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2001; 48 (Suppl 1), 5-16.
- (13) Kishii R., Takei M. Relationship between the expression of ompF and quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Infection and chemotherapy* 2009; 15: 361-366.
- (14) Pourahmad Jaktaji R., Mohiti E. Study of mutations in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2010; 9: 43-45.
- (15) Mohammadi P., Pourahmad R. Effects of *Sophora alopecuroides* L. extract on AcrAB-TolC pump inhibition in *E. coli*. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 2016; 32: 784-794.
- (16) Saga T., Yamaguchi K. History of antimicrobial agents and resistant bacteria. *Journal of Japan Medical Association* 2009; 52: 103-108.
- (17) Dzidic S., Suskovic J., Kos B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technology and Biotechnology* 2008; 46: 11-21.
- (18) Babaei Hemmati T., Mehdipour Moghadam MJ., Salehi Z., Habibzadeh SM. Prevalence of CTX-M type β -lactamases in multi-drug resistant *Escherichia coli* isolates from North of Iran, Rasht. *Biological Journal of Microorganism* 2015; 3: 69-78
- (19) Aldred KJ., McPherson SA., Turnbough ChL., Kerns RJ., Osheroff N. Topoisomerase IV-quinolone interactions are mediated through a water-metal ion bridge: mechanistic basis of quinolone resistance. *Nucleic acids research* 2013; 41: 4628-4639.
- (20) Voloshin ON., Ramirez BE., Bax A, Camerini-otero RD. A model for the abrogation of the SOS response by an SOS protein: a negatively charged helix in DinI mimics DNA in its interaction with RecA. *Genes & development* 2001; 15: 415-427.

¹- T-test

²- Lusetti

³- Pourahmad

⁴- Pasand