دانشکده علوم پایه

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک

بررسی بیان ژن *ompF* در موتان‌های *gyrA* مقاوم به سیپروفلوکساسین

استاد راهنما:
دکتر راضیه پوراحمد

استاد مشاور:
دکتر بهزاد شارقی

پژوهشگر:
فهیمه حیدری سورشجانی

زمستان ۱۳۹۱

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

بنام آن که ملکش بی زوالست

به وصفش نطق صاحب عقل لالست

مفتّح نامه ی جانهاست نامش

سرفهرست دیوانهاست نامش

ز نامش پر شکر شد کام جانها

زیادش پر گهر تیغ زبانها

اگر بی یاد او بوئیست رنگیست

وگر بی نام او نامیست ننگیست

خداوندی که چندائی که هستیست

همه در جنب ذاتش عین پستیست

چو ذاتش برترست از هرچه دانیم

چگونه شرح آن کردن توانیم

الهی

زندگی همه با یاد تو؛ شادی همه با یافت تو؛ جان آنست که در آن شناخت تو است؛ موجود نفسهای جوانمردانی؛ حاضر دلهای ذکر کنندگانی؛ از نزدیک نشانت می دهند و برتر از آنی؛ از دور می پندارند و نزدیک تر از جانی؛ ندانم که در جانی یا خود جانی؛ آنی که خود گفتی و چنانکه خود گفتی آنی...

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم که چراغ وجودشان همواره رو شنگر راه من در سختی ها و مشکلات بوده است.

سپاس بیکران بر همدلی و همراهی خواهر و برادران عزیزم...

و همه کسانی که نفس خیرشان و دعای روح پرورشان بدرقه ی راهم بود.

چکیده

غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی دارای پروتئین‌های مهمی مانند OmpF و OmpC می‌باشد. پورین OmpF به عنوان کانال پروتئینی غیر اختصاصی برای ورود مواد غذایی و ترکیبات مختلف مانند آنتی‌بیوتیک‌ها به درون سلول عمل می‌کند و بیان آن در پاسخ به فاکتورهای استرسی مانند حضور آنتی‌بیوتیک و عوامل محیطی نظیر تغییر فشار اسمزی و دما تنظیم می‌شود. جذب بتالاکتام‌ها و فلوروکینولون‌هایی مانند سیپروفلوکساسین از طریق OmpF به داخل سلول باکتریایی رخ می‌دهد، بنابراین تنظیم بیان ژن *ompF* به عنوان یکی از مکانیسم‌های موثر در مقاومت آنتی-بیوتیکی مورد توجه دانشمندان است. بیان این ژن در سطح ترجمه توسط RNA آنتی‌سنس *micF* مهار می‌شود. بیان ژن *micF* توسط فعال کننده MarA در پاسخ به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مانند فلوروکینولون‌ها القا شده و منجر به کاهش تولید پورین OmpF و افزایش ناپایداری mRNAی آن می‌گردد. اهداف این تحقیق بررسی حضور موتاسیون احتمالی در ژن *micF* در نمونه‌های موتان *gyrA* و موتان مضاعف *gyrA-marR* و همچنین سنجش کمّی بیان ژن *ompF* در موتان‌های فوق‌الذکر نسبت به تیپ وحشی MG۱۶۵۵ ، سویه کنترل، با روش Real Time PCR می‌باشد. برای این منظور، ۵ نمونه موتان با MICهای متفاوت برای سیپروفلوکساسین و تتراسیکلین ارزیابی شد. بررسی نتایج حاصل از تعیین توالی ژن *micF* نشان داد که موتاسیون در این ژن وجود ندارد. بنابراین اطمینان حاصل شد که بیان *ompF* در این نمونه‌ها بطور غیر مستقیم تحت کنترل MarA می‌باشد. آنالیز آماری نتایج حاصل از واکنش Real Time PCR، اختلاف معنی‌داری را بین میزان بیان *ompF* در موتان‌ها و تیپ وحشی نشان نداد. به طور کلی می‌توان گفت فعالیت پورین OmpF در مقاومت به سیپروفلوکساسین و ایجاد فنوتیپ MDR در این موتان‌ها موثر نمی‌باشد.

کلمات کلیدی: فلوروکینولون، پورین OmpF، RNA آنتی‌سنس *micF*، MarA، اپرون *marRAB*

فهرست مطالب

عنوان ..... صفحه

فصل اول: مقدمه و مروری بر تحقیقات گذشته ۱

۱-۱ مقاومت آنتی بیوتیکی ۲

۱-۱-۱ مکانیسم مقاومت به عوامل آنتی بیوتیکی ۳

۱-۲ فلوروکینولون‌ها ۴

۱-۳ موتان‌های *gyrA* ۵

۱-۴ اهمیت پروتئین‌های غشای خارجی ۶

۱-۴-۱ اهمیت توالی انتهای ′۵ mRNA (′۵ UTR) ژن *ompF* ۸

۱-۵ RNAهای کوچک تنظیم کننده بیان پورین ۹

۱-۵-۱ مدل دوبل شدن RNAهای *micF* و *ompF* ۹

۱-۵-۲ تنظیم تولید پورین OmpF توسط *micF* ۱۰

۱-۶ فعالیت *micF* توسط فاکتورهای استرسی ۱۱

۱-۷ فعال کننده های رونویسی *micF* ۱۱

۱-۷-۱ اپرون *marRAB* ۱۲

۱-۸ تنظیم اسمزیته در *E. coli* ۱۴

۱-۸-۱ مشخصات EnvZ ۱۴

۱-۸-۲ خصوصیات OmpR ۱۵

۱-۸-۲-۱ تنظیم رونویسی *ompF* توسط فاکتور رونویسی OmpR ۱۶

۱-۸-۲-۲ نواحی تنظیمی برای اتصال OmpR ۱۶

۱-۹ اثر محدودیت غذایی روی بیان پورین OmpF ۱۸

۱-۱۰ مروری بر مطالعات گذشته ۲۰

۱-۱۱ اهداف تحقیق ۲۱

فصل دوم: مواد و روش‌ها ۲۲

۲-۱ مشخصات دستگاه‌ها و لوازم ۲۳

۲-۲ مواد مورد استفاده ۲۴

۲-۲-۱ مواد مصرفی عمومی ۲۴

۲-۲-۲ مواد مصرفی شیمیایی ۲۵

۲-۲-۳ مواد مصرفی بیولوژیک ۲۵

۲-۳ سویه، موتان وکلون‌های مورد استفاده ۲۶

۲-۴ روش استریل کردن مواد و وسایل ۲۷

۲-۵ بررسی توالی ژن *micF* ۲۸

۲-۶ تهیه محیط کشت LB آگار (LBA) و LB برات ۲۸
۲-۷ کلونی PCR برای تکثیر ژن *micF* ۲۸
۲-۸ رویت محصول PCR ژن *micF* به روش الکتروفورز روی ژل ۳۰
۲-۹ تعیین توالی ۳۰
۲-۱۰ تهیه کشت تازه باکتری جهت استخراج RNA باکتریایی ۳۱
۲-۱۱ استخراج RNA از سلول باکتری ۳۱
۲-۱۲ تیمار DNase ۳۳
۲-۱۳ بررسی صحت تیمار نمونه RNA با DNase ۳۳
۲-۱۴ بررسی خلوص و غلظت RNA تیمار شده با DNase ۳۴
۲-۱۵ سنتز cDNA ۳۴
۲-۱۵-۱ سنتز cDNA با استفاده از کیت فرمنتاز ۳۵
۲-۱۶ بررسی صحت سنتز cDNA توسط واکنش PCR ۳۵
۲-۱۷ تهیه رقت از cDNA ۳۶
۲-۱۸ بررسی بیان ژن ۳۷
۲-۱۹ ارزیابی کمّی توسط واکنش Real Time PCR ۳۹
۲-۱۹-۱ مزایای واکنش Real Time PCR ۴۰
۲-۱۹-۲ معایب واکنش Real Time PCR ۴۱
۲-۲۰ واکنش Real Time PCR ۴۱
فصل سوم ۴۳
۳-۱- انتخاب موتان‌های مقاوم به سیپروفلوکاسین ۴۴
۳-۲-آنالیز PCR ژن *micF* ۴۴
۳-۳ تعیین توالی ژن *micF* ۴۵
۳-۴ آنالیز RNA استخراج شده ۴۵
۳-۵ بررسی عدم آلودگی RNA استخراج شده به DNA ۴۶
۳-۶ آنالیز cDNA سنتز شده ۴۷
۳-۷- نتایج Real time RT-PCR ژن *ompF* و *gapA* ۴۷
۳-۸ آنالیز منحنی ذوب *ompF* و *gapA* ۴۸
۳-۹ تهیه منحنی استاندارد *ompF* و *gapA* ۴۹
۳-۱۰ آنالیز کمّی نتایج واکنش Real time RT-PCR ۵۱
۳-۱۱ بررسی آماری ۵۱
فصل چهارم ۵۳
بحث ۵۴
۴-۱ بررسی توالی ژن *micF* ۵۵
۴-۲ بررسی بیان ژن *ompF* ۵۷

۴-۳ نتیجه‌گیری..... ۵۹
پیشنهادات..... ۶۰
منابع ۶۱

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱: برهمکنش آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین با آنزیم DNA جیراز..... ۶
شکل ۱-۲: مدل دوبل شدن RNA آنتی‌سنس *micF* و *mRNA*ی *ompF*..... ۱۰
شکل ۱-۳: a)تصویری شماتیک از ناحیه تنظیمی *micF* و *ompC*..... ۱۲
شکل ۱-۳: b) ساختار کریستالی از Rob به شکل کمپلکس با پروموتور *micF*..... ۱۲
شکل ۱-۴: تصویر شماتیک از اپرون *mar* در *E. coli*..... ۱۳
شکل ۱-۵: دیاگرامی از پروتئین EnvZ در غشای داخلی و نحوه عملکرد آن بعد از فسفریله شدن ۱۵
شکل ۱-۶: مدل شتابدار اتصال OmpR-P به نواحی تنظیمی ۱۷
شکل ۲-۱: توالی ژن *micF* مربوط به باکتری *E. coli K۱۲* سویه MG۱۶۵۵ ..... ۳۰
شکل ۲-۲: نمودار تکثیر افزایش سیگنال‌های فلورسانس ۳۸
شکل ۲-۳: ترکیبات شیمیایی ساطع کننده نور فلورسانس در واکنش Real Time PCR ۳۸
شکل ۲-۴: منحنی ذوب واکنش Real Time PCR ۳۹
شکل ۳-۱: شکل ۳-۱. آنالیز الکتروفورز محصولات PCR نمونه‌های موتان روی ژل آگارز. ۴۵
شکل ۳-۲: منحنی کروماتوگرام مربوط به یکی از نمونه‌ها ۴۵
شکل ۳-۳: ژل الکتروفورز محصولات PCR ۴۶
شکل ۳-۴: ژل الکتروفورز محصول PCR ۴۷
شکل ۳-۵: منحنی تکثیر واکنش Real Time PCR ژن *ompF* ۴۸
شکل ۳-۶: منحنی تکثیر واکنش Real Time PCR ژن *gapA* ۴۸
شکل ۳-۷: منحنی ذوب ژن *ompF* ۴۹
شکل ۳-۸: منحنی ذوب ژن *gapA* ۴۹
شکل ۳-۹: منحنی استاندارد ژن *ompF* ۵۰
شکل ۳-۱۰: منحنی استاندارد ژن *gapA* ۵۰

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱: تنظیم کننده‌های RNAای پروتئین‌های غشای خارجی..... ۹
جدول ۲-۱: لیست دستگاه‌ها و لوازم مورد استفاده..... ۲۳
ادامه جدول ۲-۱: لیست دستگاه‌ها و لوازم مورد استفاده..... ۲۴
جدول ۲-۲: لیست مواد مصرفی عمومی ۲۴
جدول ۲-۳: لیست مواد مصرفی شیمیایی ۲۵
جدول ۲-۴: لیست مواد مصرفی بیولوژیک ۲۵
ادامه جدول ۲-۴: لیست مواد مصرفی بیولوژیک ۲۶
جدول ۲-۵: ویژگی پرایمرهای مورد استفاده در پایان نامه ۲۶
جدول ۲-۶: مشخصات سویه‌ها ۲۷
جدول ۲-۷: غلظت و مقادیر مواد مورد نیاز واکنش PCR برای ژن *micF* ۲۹
جدول ۲-۸: شرایط دمایی واکنش PCR برای ژن *micF* ۲۹
جدول ۲-۹: مواد مورد نیاز واکنش PCR با پرایمر اختصاصی ژن *rpsl* ۳۳
جدول ۲-۱۰: شرایط دمایی واکنش PCR با پرایمر اختصاصی ژن *rpsl* ۳۴
جدول ۲-۱۱: شرایط دمایی واکنش PCR برای سنتز cDNA ۳۵
جدول ۲-۱۲: شرایط دمایی واکنش PCR برای cDNA با پرایمر اختصاصی ژن *ompF* ۳۶
جدول ۲-۱۳: مواد مورد نیاز واکنش PCR برای cDNA با پرایمر اختصاصی ژن *ompF* ۳۶
جدول ۲-۱۴: غلظت اجزای واکنش Real Time PCR ۴۱
جدول ۲-۱۵: شرایط دمایی واکنش Real Time PCR برای ژن *gapA* ۴۲
جدول ۲-۱۶: شرایط دمایی واکنش Real Time PCR برای ژن *ompF* ۴۲
جدول ۳-۱: بیان نسبی ژن *ompF* ۵۱
جدول ۳-۲: آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم افزار SPSS ۵۲

فصل اول

مقدمه و مروری بر تحقیقات گذشته

فصل اول

مقدمه و مروری بر تحقیقات گذشته

۱-۱ مقاومت آنتی بیوتیکی

در سراسر تاریخ، یک مبارزه پی در پی بین انسان و انبوهی از میکروارگانیسم هایی، که موجب عفونت و بیماری می‌شوند، وجود داشته است. طاعون گاوی، سل (توبرکلوزیز)، مالاریا و اخیراً ویروس نقص سیستم ایمنی انسان (HIV) سهم بزرگی در اثرگذاری روی جمعیت انسانی داشته‌اند و میزان ابتلا به بیماری و مرگ و میر ناشی از آن ها بسیار بالا است. در اواسط قرن بیستم میلادی پیشرفت های وسیعی در ارتقاء داروهای ضد باکتریایی ایجاد شد. زمانی که پنی سیلین در اوایل دهه ۱۹۴۰ استفاده شد، به تدریج وضعیت درمانی بهبود یافت. البته تقریباً به محض اینکه داروهای ضد باکتریایی مورد استفاده قرار گرفتند، باکتری ها نیز اشکالی از مقاومت را آشکار کردند. همانطور که استفاده از مواد ضد باکتریایی افزایش می‌یافت سطوح مختلف و پیچیده-ای از مکانیسم های مقاومت نیز در بیماریزا های باکتریایی مشاهده شد. مبارزه برای به دست آوردن برتری در برابر عفونت ها تا به امروز ادامه دارد. اگرچه تعدادی از دانشمندان عوامل ضد باکتریایی جدیدی تهیه کرده‌اند ولی این ترکیبات هم در ابتدای نقصان هستند و باکتری‌ها مکانیسم‌های ماهرانه‌ایی را برای مقاومت به این مواد به دست می‌آورند [۱].

اغلب عوامل ضد میکروبی که برای درمان عفونت های باکتریایی به کار می‌روند، را می‌توان طبق مکانیسم عملکردشان طبقه‌بندی کرد. پنج مکانیسم عملکردی برای عوامل ضد میکروبی وجود دارد: ۱- تداخل در سنتز دیواره سلولی ۲- مهار سنتز پروتئین ۳- تداخل در سنتز نوکلوئیک اسید ۴- مهار یک مسیر متابولیک ۵- تخریب ساختار غشای خارجی [۲].

عوامل ضد میکروبی که با مهار سنتز دیواره سلولی فعالیت می‌کنند شامل: بتا لاکتام‌هایی از قبیل پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین[۱]ها، کارباپنم[۲]ها، منوباکتام[۳]ها و گلیکوپپتیدهایی از قبیل: ونکومایسین[۴] و تیکوپلانین[۵] می‌باشند. بتا لاکتام ها سنتز دیواره سلولی را از طریق تداخل با آنزیم های لازم برای سنتز لایه پپتیدوگلیکان مهار می‌کنند. فلورکینولون ها اثرات ضد میکروبی خود را از طریق مهار سنتز DNA اعمال می‌کنند و باعث شکست دو رشته DNA (DSB)[۶] طی همانندسازی DNA می‌شوند که کشنده است؛ در حالی که سولفونآمید[۷]ها و تریمتوپرین[۸] مسیر سنتز نوکلوئیک اسید را بلوکه می‌کنند که در نهایت سنتز DNA مهار می‌شود [۳, ۴].

۱-۱-۱ مکانیسم مقاومت به عوامل آنتی بیوتیکی

باکتری ها ممکن است مقاومت به داروهای ضد باکتریایی را از طریق مکانیسم های متنوعی بروز دهند. برخی از گونه های باکتریایی ذاتاً به بیش از یک گروه از عوامل ضد میکروبی مقاوم هستند. در این مورد، همه-ی سویه های گونه مقاوم هم نسبت به تمامی اعضای آن گروه از داروها مقاوم هستند. نگرانی بزرگتر در مورد مقاومت اکتسابی است که در آن صورت جمعیت اولیه از باکتری‌های حساس به یک عامل ضد باکتریایی مقاوم می‌شوند و تحت شرایط انتخابی ناشی از بکار بردن آن عامل ضد باکتریایی ، تکثیر و انتشار می‌یابند. چندین مکانیسم برای ایجاد مقاومت در انواع مختلف جنس‌های باکتریایی وجود دارد و موتاسیون خودبخودی می‌تواند سبب ایجاد مقاومت در باکتری شود که از طریق فرایندهای زیر رخ می‌دهد: ۱- تغییر پروتئین هدفی که عامل ضد باکتریایی به آن متصل می‌شود از طریق تغییر یا حذف جایگاه اتصال (مانند تغییر در پروتئین متصل شونده به پنی سیلین که منجر به بروز مقاومت نسبت به این فاکتور می‌شود). ۲- افزایش بیان آنزیم‌هایی که فاکتور ضد میکروبی را غیرفعال می‌کنند (مانند اریترومایسین متیلاز ریبوزومی در استافیلوکوکسی[۹]). ۳- کاهش بیان یا تغییر در کانال پروتئینی خارج سلولی که دارو برای ورود به سلول به این کانال ها نیاز دارد (مانند OmpF[۱۰] در *E. coli*[۱۱]). ۴- افزایش بیان پمپ هایی که دارو را از سلول خارج می‌کنند (خروج فلوروکینولون[۱۲] ها در استافیلوکوکوس ارئوس[۱۳]) [۵].

در موارد فوق سویه‌های باکتریایی، حامل موتاسیون های اهداکننده مقاومت هستند که این سویه‌ها با استفاده از مواد ضد میکروبی از سایر سویه‌ها جداسازی می‌شوند؛ سویه حساس از بین می رود ولی سویه جدید مقاوم، امکان رشد و بقا دارد. مقاومت اکتسابی به علت موتاسیون کروموزومی توسعه می‌یابد و انتقال عمودی نامیده می‌شود. باکتری ها همچنین مقاومت آنتی بیوتیکی را از طریق کسب مواد ژنتیکی جدید از دیگر ارگانیسم های مقاوم به دست می آورند و اصطلاحاً انتقال افقی نامیده می‌شود که ممکن است بین سویه های یک گونه

---

۱ Cephalosporin
۲ Carbapenem
۳ Monobactam
٤ Vancomycin
٥ Teicoplanin
٦ Double-Strand Break
۷ Sulfonamide
۸ Trimethoprim
۹ *Staphylococci*
۱۰ Outer Membrane Protein F
۱۱ *Escherichia coli*
۱۲ Fluoroquinolone
۱۳ *Staphylococcus aureus*

یا بین گونه‌ها یا جنس‌های مختلف باکتریایی رخ دهد. ترانسپوزون ها[۱] ممکن است انتقال و الحاق ژن های مقاومت را به ژنوم میزبان یا پلاسمیدها تسهیل کنند. طی هم یوغی[۲]، یک باکتری گرم منفی پلاسمید حاوی ژن‌های مقاومت را به باکتری مجاور منتقل می‌کند که این فرایند اغلب از طریق ساختار پروتئینی بلند و نازکی که پیلوس[۳] نامیده می‌شود صورت می‌گیرد که دو ارگانیسم را به هم متصل می کند. طی فرایند ترانس-داکشن[۴]، ژن‌های مقاومت از یک باکتری به باکتری دیگر از طریق باکتریوفاژ[۵] منتقل می‌شود. در ترانسفورماسیون[۶] باکتری بخش‌های DNA را از باکتری دیگری که DNA مکمل خودش را پس از لیز شدن به محیط پیرامون آزاد می کند، به دست می آورد و به این ترتیب ژن های مقاومت می‌توانند به سویه هایی که قبلاً حساس بوده‌اند منتقل شوند [۵]. بنابراین جمعیت های باکتریایی با حساسیت نرمال، احتمال دارد از طریق موتاسیون و انتخاب و یا با به دست آوردن اطلاعات ژنتیکی از دیگر باکتری ها، به عوامل ضد میکروبی مقاوم شوند. [۵].

۱-۲ فلوروکینولون‌ها

فلوروکینولون‌ها یک گروه از فاکتورهای ضد میکروبی سنتزی هستند که به طور گسترده‌ای در درمان انسان و دام از اواخر دهه ۱۹۸۰ و اوایل دهه ۱۹۹۰ بکار می‌روند [۶]. این کاربرد وسیع به دلیل مزیت درمان خوراکی، پتانسیل بالای دارو بر ضد بسیاری از باکتری های گرم منفی و سمیت پایین آن برای میزبان می-باشد. هرچند از اواسط دهه ۱۹۹۰، مطالعه روی چندین ارگانیسم، بروز مقاومت به کینولون ها را نشان داد [۷]. پایداری مقاومت در سطوح بالا می‌تواند ناشی از در معرض قرار گرفتن متوالی باکتری با غلظت های بالای دارو باشد. موتاسیون هایی که باعث مقاومت می‌شوند با تغییر پروتئین های هدف (مانند DNA جیراز[۷] که توسط ژن های *gyrA* و *gyrB* کد می‌شود و توپوایزومراز[۸] IV که توسط ژن های *parC* و *parE* کد می-شود) که برای همانندسازی DNA و رونویسی لازم هستند، عمل می‌کنند [۸].

اولین محصولات کینولون‌ها شامل نالیدیکسیک اسید[۹] و اکسولینیک اسید[۱۰] می‌باشند که فقط برای درمان عفونت های دستگاه ادراری به کار می‌رفتند؛ هرچند تغییر در محصولات بعدی محدوده عملکرد و توانمندی آن ها را افزایش داده است. یکی از ترکیبات ثانویه، آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین[۱۱] است که در موقعیت C-۶ آن یک اتم فلوئور اضافه شده است که منجر به گستردگی فعالیت این ترکیب در مقابل باکتری های گرم منفی شده است [۹, ۱۰]. محدوده فعالیت سیپروفلوکساسین شامل اغلب سویه های باکتری‌های بیماری‌زا است که باعث عفونت های دستگاه تنفسی، ادراری و روده‌ای می‌شوند. انواع باکتری‌های حساس به این آنتی بیوتیک شامل باکتری های گرم منفی مثل: *E. coli*، هموفیلوس انفلونزا[۱۲]، کلبسیلا پنومونیه[۱] و باکتری‌های

---

۱ Transposon
۲ Conjugation
۳ Pilus
٤ Transduction
٥ Bacteriophage
٦ Transformation
۷ DNA gyrase
۸ Topoisomerase
۹ Nalidixic acid
۱۰ Oxolinic acid
۱۱ Ciprofloxacin
۱۲ *Haemophilus influenzae*

گرم مثبت مثل: استافیلوکوکوس ارئوس و استرپتوکوکوس پنومونیه[۲] می‌باشند. سیپروفلوکساسین به تنهایی یا در ترکیب با دیگر داروهای ضد باکتریایی در درمان تجربی عفونت‌ها به کار می‌رود [۱۱] و با آنزیم‌های باکتریایی که منجر به پیچش دوباره DNA پس از همانندسازی می‌شوند تداخل دارد و به این طریق سنتز DNA و پروتئین را متوقف می کند. سیپروفلوکساسین اولین بار در سال ۱۹۸۳ توسط بایر[۳] مورد توجه قرار گرفت و سپس در سال ۱۹۸۷ توسط سازمان غذا و دارو در امریکا (FDA[۴]) تایید شد. سیپروفلوکساسین باعث مهار DNA جیراز (توپوایزومراز II) و توپوایزومراز IV و آنزیم‌های لازم برای جداسازی DNA باکتری می‌شود و بنابراین قادر به مهار تقسیم سلولی است [۱۲]. مقاومت به سیپروفلوکساسین و دیگر فلوروکینولون ها ممکن است سریعاً و حتی طی درمان بیماری توسعه یابد. بیماریزا های متعددی مثل استافیلوکوکوس ارئوس، آنتروکوکوس‌ها[۵] و کلبسیلا پنومونیه به تازگی مقاومت گسترده‌ایی را نشان می‌دهند. استفاده گسترده از فلوروکینولون‌ها در دامپزشکی به ویژه در اروپا مسبب این مقاومت است. فلوروکینولون‌ها رایج‌ترین آنتی-بیوتیک‌هایی بودند که در سال ۲۰۰۲ برای افراد بزرگسال تجویز شدند. تقریباً نیمی از این تجویزها (۴۲درصد) از قبیل تجویز برای برونشیت حاد[۶]، تورم گوش میانی و عفونت حاد مجاری تنفسی فوقانی، مطابق با شرایط مورد تایید FAD نبودند. به علاوه، فلوروکینولون‌ها به طور رایج در شرایطی که باکتری حتی در شروع بیماری نقش ندارد، از جمله در عفونت‌های ویروسی نیز تجویز می‌شوند که بنابراین استفاده وسیع از این ترکیبات در بروز مقاومت آنتی بیوتیکی موثر است [۱۳]. مقاومت به فلوروکینولون‌ها نتیجه ترکیب مکانیسم های است که هرکدام به تنهایی یا در کنار هم عمل می‌کنند تا فنوتیپ مقاوم را ایجاد کنند. این مکانیسم ها شامل موتاسیون های نقطه‌ای در آنزیم DNA جیراز (ژن *gyrA* یا *gyrB*) یا در توپوایزومراز IV(ژن *parC*)، موتاسیون هایی که تجمع درون سلولی فلوروکینولون‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند، یعنی این موتاسیون ها تغییر بیان پروتئین های غشای خارجی (OMP) و همچنین تغییر در ترکیبات لیپوپلی ساکارید می‌باشند و در نتیجه تغییر در انتشار فلوروکینولون‌ها به درون سلول‌های باکتریایی را موجب می‌شوند. موتاسیون‌هایی که پوشش سلول باکتریایی را تغییر می‌دهند باعث ایجاد فنوتیپ مقاومت چند دارویی به چند نوع دارو مختلف که از نظر کلینیکی مهم هستند می‌شوند [۱۴-۱۶].

۱-۳ موتان‌های *gyrA*

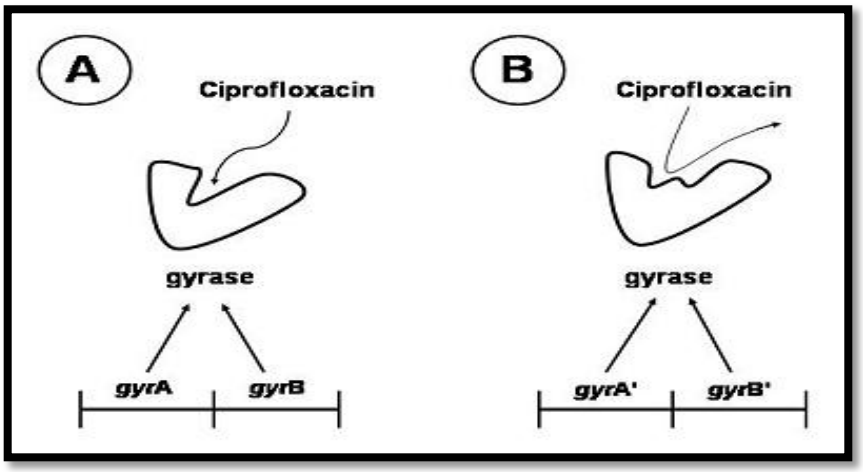
در *E. coli* هدف اصلی کینولون‌ها DNA جیراز است. DNA جیراز یک آنزیم تترامر است که شامل دو زیرواحد A و دو زیرواحد B می‌باشد که به ترتیب توسط ژن های *gyrA* و *gyrB* کد می‌شوند [۱۲, ۱۷, ۱۸]. این آنزیم متعلق به تیپ II خانواده توپوایزومراز می‌باشد که روی پیچش DNA اثر گذاشته و منجر به باز شدن پیچش مارپیچ DNA (از طریق برش در دو رشته DNA) می‌شود. برش در دو رشته DNA (DSB) نیازمند فعالیت هیدرولازی[۷] ATP است. این فعالیت‌ها برای همانندسازی، رونویسی و نوترکیبی DNA ضروری هستند. از طرف دیگر، برخی اهداف کوچکتر برای کینولون‌ها در باکتری گرم منفی *parC* و *parE* می‌باشند

---

۱ *Klebsiella pneumoniae*
۲ *Streptococcus pneumoniae*
۳ Bayer
٤ U.S. Food and Drug Administration
٥ *Enterococci*
٦ Acute bronchitis
۷ Hydrolysis

که زیرواحدهای توپوایزومراز IV را کد می‌کنند. کینولون‌ها به کمپلکس جیراز-DNA متصل شده و کمپلکس سه‌گانه DNA- کینولون- جیراز را تشکیل می‌دهند [۱۷, ۱۸]. دناتوراسیون نهایی یا شکستن جیراز در کمپلکس سه گانه باعث تشکیل DSB شده و بنابراین همانندسازی بلوکه شده و سلول باکتریایی می‌میرد [۱۹, ۲۰]. موتاسیون در هرکدام از ژن‌های *gyrA* یا *gyrB* سبب مقاومت به کینولون می‌شود [۲۱, ۲۲]. هرچند موتاسیون در ژن *gyrA* در *E. coli* مقاوم به کینولون رایج‌تر است [۱۴, ۲۳]. آنالیز توالی DNA نشان می‌دهد که اغلب موتاسیون‌ها در نیمه نخست ژن *gyrA* در ناحیه QRDR[۱] (ناحیه مشخص مقاومت به کینولون) رخ می‌دهد. این ناحیه ارتباط نزدیکی با جایگاه فعال GyrA دارد (Tyr ۱۲۲) که با DNA و کینولون واکنش می‌دهد [۲۱, ۲۴].

موتاسیون در زیرواحدهای جیراز ظاهراً باعث تغییر کنفورماسیون در آنزیم شده، به طوری که میل ترکیبی آن به فلوروکینولون ها را کاهش می‌دهد یا از بین می برد (شکل۱-۱). مطابق شکل ۱-۱ A، سیپروفلوکساسین با جیراز واکنش می‌دهد و فعالیت آنزیمی آن را مهار می کند. در شکل ۱-۱ B، موتاسیون در هر یک از ژن های *gyrA* یا *gyrB* می‌تواند ساختار فضایی آنزیم DNA جیراز را تغییر بدهد و تمایل اتصال آنزیم به سیپروفلوکساسین را کاهش می‌دهد و آنتی بیوتیک قادر به مهار آنزیم نبوده و باکتری مقاوم به آنتی‌بیوتیک می‌شود [۲۴-۲۷].



شکل ۱-۱. برهمکنش آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین با آنزیم DNA جیراز [۲۴].

۱-۴ اهمیت پروتئین‌های غشای خارجی

غشای خارجی باکتری های گرم منفی شامل یک لایه لیپیدی نامتقارن است که به عنوان یک سد برای کنترل ورود و خروج مواد محلول با وزن ملکولی پایین عمل می کند. ورود مواد غذایی و ترکیبات آنتی-بیوتیکی و متابولیت‌ها به فضای پری پلاسمی توسط کانال های پروتئینی که در غشای خارجی(OMP) قرار دارند کنترل و تسهیل می‌شود. اغلب ترکیبات آبدوست از غشای خارجی به کمک منافذ پروتئینی پویا که پورین نامیده می‌شوند، عبور می‌کنند. نام پورین از کلمه منفذ یا پور[۲] گرفته شده است. کانال‌های پورینی از آن جهت مهم می‌باشند که عبور ملکول‌ها از عرض غشا و کنترل این فرایند برای بقای سلول هنگامی که مواد

۱ Quinolone Resistance Determining Region
۲ Pore

غذایی نایاب هستند و یا زمانی که سلول در معرض مواد سمی، ترکیبات آنتی‌بیوتیکی و شرایط ناسازگار است بسیار ضروری می‌باشد. از طرفی پروتئین های شبه پورینی در اندامک‌هایی مثل کلروپلاست و میتوکندری هم شناسایی شده‌اند. ساختار کلی پروتئین های پورینی به شکل استوانه بتا یا بتا بارل[۱] می‌باشد که به صورت درون غشایی پایدار شده‌اند. هر استوانه بتا متشکل از چندین رشته بتا[۲] غیر موازی می‌باشد که به صورت رشته‌های درون غشایی چندین بار از عرض غشا عبور کرده و ساختارهای حلقه مانندی در سطح خارج سلول ایجاد می‌کنند. تعداد رشته های بتا در انواع مختلف پورین‌های باکتریایی بین ۸ تا ۲۲ رشته متفاوت است [۲۸].

پروتئین های بتا بارل دارای طیف وسیعی از عملکردها می‌باشند و می‌توانند به صورت منافذ انتشاری غیر اختصاصی (مانند OmpF و OmpC در *E. coli*) و یا اختصاصی عمل کنند و همچنین برخی پورین ها به صورت ترانسپورترهای فعال عمل می‌کنند و حتی دارای فعالیت آنزیمی نیز می‌باشند، مانند پورین OmpT با خاصیت پروتئازی، پورین OmPlA با خاصیت لیپازی و PagP که دارای خاصیت اسیل ترانسفرازی[۳] می‌باشد [۲۹]. برخی از این کانال‌ها دارای سوبسترای[۴] اختصاصی هستند مانند مالتوپورین که یک جایگاه اختصاصی برای اتصال مالتو-الیگوساکاریدها ارائه می‌دهد تا جذب آن ها را آسان کند [۳۰]. پورین‌ها همچنین به عنوان گیرنده اختصاصی برای باکتریوفاژها عمل می‌کنند، مانند کانال پورینی OmpF که به صورت گیرنده‌ایی برای باکتریوفاژ T۲ نیز عمل می‌کند. کانال‌های آبدوست واقع در غشای خارجی به دو گروه عمده پورین های غیراختصاصی و پورین های اختصاصی تقسیم بندی می‌شوند. انواع غیراختصاصی نفوذپذیری ترکیباتی با وزن ملکولی کمتر از ۶۰۰ دالتون را تسهیل می‌کنند و انتشار مواد از طریق این دریچه‌ها وابسته به ولتاژ می‌باشد در حالی که پورین های اختصاصی فقط عبور ترکیبات معین و ویژه‌ایی را تسهیل می‌کنند و از جمله می‌توان به پورین اختصاصی ساکارز یا ScrY اشاره کرد [۳۱]. در بین باکتری‌های گرم منفی چندین پروتئین غشای خارجی یا OMP شناسایی شده است. غشای خارجی*E. coli K۱۲* دارای چهار پروتئین اصلی است که شامل OmpF، OmpC، OmpA و لیپوپروتئین براون[۵] می‌باشند که از جمله فراوان‌ترین پروتئین‌ها در سلول هستند. این پروتئین‌ها ابتدا به فرم پیش ساز که دارای یک سیگنال پپتید در انتهای $NH_۲$ است، سنتز می‌شوند. دو پروتئین OmpF و OmpC که از مهم‌ترین پروتئین‌های پورینی غشای خارجی در *E. coli* و گاما پروتئوباکتری‌ها[۶] هستند، از نظر وزن ملکولی، ترکیب آمینواسیدی، توالی انتهای آمینو، قدرت پیوستگی با لایه پپتیدوگلیکانی، حجم بسیار بالای ساختارهای بتا در پپتید، ساختارهای تریمر و عملکرد منافذ برای عبور ملکول های آبدوست کوچک، مشابه یکدیگر می‌باشند [۳۲]. دو پورین OmpF و OmpC کانال های پروتئینی غیر اختصاصی هستند که به ترتیب برای ورود مواد غذایی و آنتی بیوتیک‌هایی مانند بتالاکتام ها به درون سلول و انتشار مواد زاید به خارج سلول به کار می‌روند. تشکیل OmpF و OmpC در *E. coli* توسط فاکتورهای محیطی متعددی از قبیل؛ فشار اسمزی، دما و PH محیط تنظیم می‌شوند. تشکیل مناسب پورین در غشای خارجی برای بقای ارگانیسم در شرایط متغیر بسیار ضروری می‌باشد. به طور مثال در شرایطی مثل

---

۱ β-barrel
۲ β-strand
۳ Acyltransferase
٤ Substrate
٥ Braun's lipoprotein
٦ *Gamma-proteobacteria*

دستگاه گوارش جانوران، که غلظت مواد غذایی و مواد سمی مانند نمک های صفراوی نسبتاً بالا است، پروتئین OmpC پورین غالب خواهد بود. برعکس، در شرایطی که غلظت مواد غذایی در محیطی مانند آب تازه پایین است، بیان پورین OmpF غالب بوده و OmpC دارای بیان بسیار پایین است و به این ترتیب باکتری با شرایط جدید سازگار می‌شود [۳۳-۳۵]. OmpA پروتئین پورینی دیگری در غشای خارجی سلول باکتریایی است که دارای عملکرد پیچیده و چندگانه‌ای می‌باشد. به عنوان مثال OmpA در پایداری غشای سلول از طریق اتصال آن به لایه پپتیدوگلیکانی نقش دارد. OmpA در هم یوغی باکتریایی موثر است و به صورت یک پروتئین پورینی در انتشار غیر اختصاصی مواد نیز عمل می‌کند [۳۶, ۳۷]. پایداری mRNA ژن *ompA* با توجه به سرعت رشد باکتری تغییر می‌کند و زمانی که میزان رشد سلول کاهش می‌یابد، مانند حالتی که سلول وارد فاز رکود[۱] می‌شود، mRNA ژن *ompA* سریع‌تر تخریب می‌شود. RNA تنظیمی که توسط ژن *micA* کد می‌شود، به طور منفی پس از رونویسی میزان mRNA ژن *ompA* را تنظیم می کند. *micA* در فاز رکود و در شرایط استرس القا می‌شود. در باکتری *E. coli* هر دو پروتئین OmpC و OmpF نیز مشابه با مکانیسم تنظیمی پورین OmpA، توسط RNAهای کوچک اختصاصی در پاسخ به فاکتورهای استرسی و عوامل محیطی تنظیم می‌شوند [۳۸, ۳۹]. اهمیت تنظیم بیان پورین OmpF نیز به دلیل نقش عمده آن در ورود ترکیبات آنتی‌بیوتیکی به ویژه فلوروکینولون‌ها و سیپروفلوکساسین به درون سلول باکتریایی می‌باشد که در این بخش در مورد ساختار این پورین و مکانیسم‌های تنظیم کننده آن بحث خواهد شد.

۱-۴-۱ اهمیت توالی انتهای ′۵ mRNA (′۵ UTR) ژن *ompF*

طی بررسی‌های بیوانفورماتیکی و ردیف سازی[۲] توالی‌های انتهای ′۵ mRNA (′۵ UTR) ژن *ompF* در شش گونه باکتری گرم منفی مشخص شده است که دو سویه *یرسینیا پستیس*[۳] و *یرسینیا انتروکلیتیکا*[۴] بیشترین تشابه را بر اساس این توالی دارند. حفاظت شدگی بالای این ناحیه از توالی *ompF*، دلالت بر نقش عملکردی مهم این عناصر حفاظت شده دارد. نواحی ′۵ UTR فاکتورهای تعیین کننده مهمی در مورد پایداری *mRNA* و یا تنظیم ترجمه هستند. از جمله این که بخش'۵ UTR mRNA حاصل از ژن *ompF* دوبلکس[۵] مهمRNA / RNA را تشکیل می‌دهد که در موقعیت نوکلئوتید ۹۶+ تا ۱۲۵+ با RNA آنتی سنس[۶] *micF*[۷] جفت می‌شود و با توجه به این عملکرد، بخش '۵ UTR mRNA ژن *ompF* شدیداً در بین گونه های *E. coli*، *سالمونلا تیفیموریوم*[۸]، *سراشیا مارسیسنس*[۹] و *یرسینیا پستیس* و *یرسینیا انتروکلیتیکا* حفاظت شده است. به علاوه این ناحیه شامل جایگاه اتصال ریبوزوم یا توالی S-D (توالی شاین دالگارنو[۱۰]) و کدون شروع ترجمه است. به این ترتیب این عوامل نیز در پایداری تکاملی این ناحیه از توالی ژن *ompF* موثر می‌باشند. با توجه به

---

۱ Stationary
۲ Alignment
۳ *Yersinia pestis*
٤ *Yersinia enterocolitica*
٥ Duplex
٦ Antisense RNA
٧ mRNA-interfering complementaryRNA for *ompF*
٨ *Salmonella typhimurium*
٩ *Serratia marcescens*
١٠ Shine-Dalgarno sequence

درصد تشابه این توالی در شش گونه باکتریایی می‌توان با ترسیم درخت فیلوژنی بر اساس تشابه توالی‌های '۵ mRNA UTR ژن *ompF* ، ارتباط تکاملی و میزان قرابت این گونه‌ها را با هم مقایسه و بررسی نمود [۴۰].

۱-۵ RNAهای کوچک تنظیم کننده بیان پورین

در سال ۱۹۸۴ RNA کد شده از ژنوم *E. coli* با نام *micF* کشف شد و سپس مشخص شد که بیان ژن *ompF* در غشای خارجی را تنظیم می‌کند. حدود بیست سال بعد چندین RNA کوچک تنظیم کننده که بیان پروتئین های غشایی خارجی (OmpC و OmpA و غیره) را تعدیل می کردند، نیز شناسایی شدند (جدول ۱-۱) [۴۱].

جدول ۱-۱. تنظیم کننده‌های RNAای پروتئین‌های غشای خارجی [۴۱].

Name	Alternate names	Flanking genes	Ig length	Strand	sRNA size	Regulators	Expression	Hfq[a]	Targets	Conservation[b]	References
MicF		*ompC/yojN*	738	<>>	93	MarA/Sox/ Rob	High osmolarity, superoxide, heat	Yes	*ompF*	Ec, Sa, Kp, Sm, Yp	Mizuno et al. 1984; Delihas and Forst 2001
MicC	IS063	*ompN/ydbK*	369	<><	109	Unknown	Opposite of MicF?	Yes	*ompC*	Ec, Sa, Sh, Kp	Chen et al. 2002, 2004
MicA	SraD	*luxS (ygaG)/ gshA*	153	<><	~75	σ^E	Stationary	Yes	*ompA*	Ec, Sh, Yp, Ew, Sm, Kp	Rasmussen et al. 2005; Udekwu et al. 2005
RybB		*ybiK/ybiL*	180	>><	80	σ^E	Stationary	Yes	*ompC, ompW*	Ec, Ew, Kp, Sa, Sh, Sm, Yp	Vogel et al. 2003; J.

همان‌طور که قبلاً توضیح داده‌شد، *micF* ژن کد کننده یک RNA آنتی سنس است که در *E. coli* و باکتری های خویشاوند آن یافت می‌شود و بیان *ompF* را پس از رونویسی، هنگام مواجه شدن با استرس های محیطی، کنترل می کند. دو ژن *ompF* و *micF* از نظر موقعیت کروموزومی در نواحی مختلفی از کروموزوم *E. coli* واقع شده‌اند؛ *micF* در *جایگاه* ۴۸ min و *ompF* در جایگاه ۲۱min کروموزوم *E. coli* قرار دارند. *micF* در *E. coli* یک رونوشت غیر ترجمه ای با طول ۹۳ نوکلئوتید کد می‌کند که در انتهای ´۵ تری فسفریله شده است و شامل یک سیگنال خاتمه رونویسی مستقل از رو (ρ)[۱] در انتهای ´۳ است [۴۲].

۱-۵-۱ مدل دوبل شدن RNAهای *micF* و *ompF*

مدل شماتیک اتصال *micF* به mRNAی *ompF* در شکل ۱-۲ نشان داده شده است. مطابق شکل تقریباً یک سوم توالی RNAای *micF* در تشکیل دوبلکس شرکت دارد و در ناحیه اتصال ریبوزوم (توالی شاین دالگارنو) و جایگاه شروع ترجمه (AUG) روی mRNA هدف قرار می گیرد. سپر شدن *micF* باعث مهار اتصال ریبوزوم و مهار ترجمه *ompF* می‌شود [۴۳].

۱ ρ-independent transcription termination signal