

بازسازی شبکه ژنی مقاومت به پنی‌سیلین در *E.coli* با استفاده از اطلاعات موجود در پایگاه‌های داده

یعثوب شیری^{۱*}، محمدعلی کریمیان^۲

۱- استادیار گروه پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲- مربی گروه پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۱۰ آذر ۱۳۹۸، بازنگری: ۱۸ دی ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۲۱ دی ۱۳۹۸

چکیده

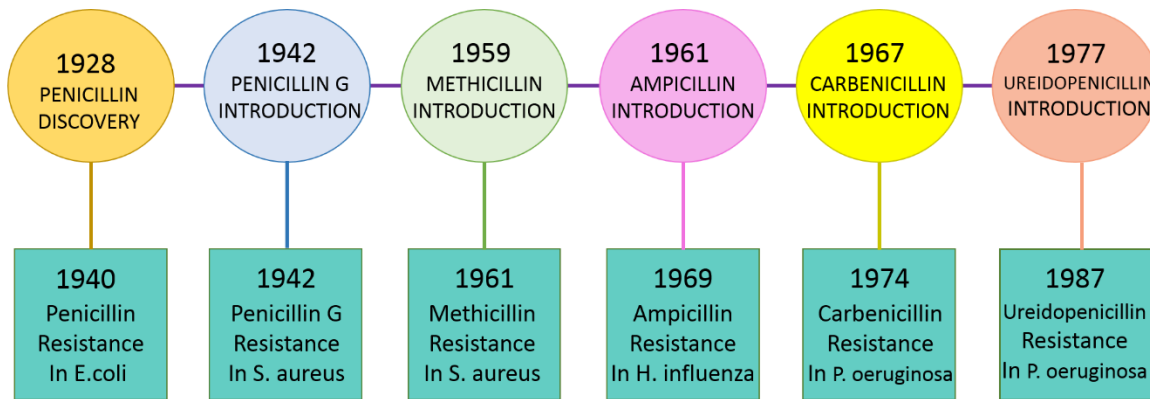
کشف پنی‌سیلین، انقلابی را در صنعت پزشکی ایجاد کرد و جان هزاران نفر را نجات داد. اما با گذشت زمان باکتری‌های مقاوم به این آنتی‌بیوتیک یکی پس از دیگری شناسایی شدند. آنتی‌بیوتیک‌های خانواده پنی‌سیلین در ساختار مولکولی خود دارای یک حلقه‌ی بتا-لاکتام هستند. پنی‌سیلین و دیگر آنتی‌بیوتیک‌های دارای حلقه بتا-لاکتام با اتصال به آنزیم ترانس‌پپتیداز به صورت رقابتی فعالیت آن را مهار می‌کنند. مهار آنزیم ترانس‌پپتیداز از سنتز دیواره باکتریایی جلوگیری کرده و سبب مرگ باکتری می‌گردد. باکتری‌های مقاوم دارای آنزیم بتا-لاکتاماز هستند که توانایی شکستن پیوند C-N را در حلقه بتا-لاکتام دارند. در این مطالعه بازسازی شبکه ژن‌های شناخته شده بتا-لاکتاماز در باکتری *E.coli* صورت گرفت. نتایج نشان داد ژن *ampC* نقش محوری در القای مقاومت در *E.coli* دارد. بررسی عملکرد مولکولی سایر ژن‌های شبکه بتا-لاکتامازی نشان داد ویژگی بتا-لاکتامازی برای آنها، صرفاً یک قابلیت ثانویه بوده و وظیفه اصلی آنها مشارکت در سایر فرایندهای غیر مرتبط سلولی می‌باشد. بررسی ژن آنتولوژی نشان داد فرآیند مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتا-لاکتام همبستگی مثبت با زنجیره انتقال الکترون دارد. همچنین بررسی جایگاه سلولی ژن‌ها نشان داد غشای سلولی فعال‌ترین اندامک سلولی در زمان مواجهه با آنتی‌بیوتیک‌های بتا-لاکتام در باکتری *E.coli* می‌باشد و مقاومت به آنتی‌بیوتیک وابسته به عملکرد بتالاکتامازی پروتئین‌های فعال در غشای سلولی است.

واژگان کلیدی: آنتی‌بیوتیک، بتا-لاکتام، شبکه ژنی، باکتری

مقدمه

آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (Penicillin) اولین بار در سال ۱۹۲۸ توسط دانشمند انگلیسی الکساندر فلمینگ* معرفی شد. بعدها در سال ۱۹۴۲ هاوارد والتر فلوری^۱ و ارنست بوریس چاین^۲ مکانیسمی برای تولید انبوه این ماده ارزشمند را طراحی کردند (۱). کشف پنی‌سیلین انقلابی را در صنعت پزشکی ایجاد کرد و جان هزاران نفر را نجات داد. اما با گذشت زمان باکتری‌های مقاوم به این آنتی‌بیوتیک یکی پس از دیگری شناسایی شدند که اولین مورد

آن در سال ۱۹۴۰ به وسیله‌ی سویه *E. coli* گزارش شد (۲). در سال ۱۹۴۲ چهار سویه *Staphylococcus aureus* مقاوم شناسایی شدند و تا اواخر دهه ۶۰ میلادی بیش از ۸۰ سویه *S. aureus* مقاوم به پنی‌سیلین گزارش شده بود (۳). بعدها مقاومت به پنی‌سیلین در طیف گسترده‌ای از باکتری‌ها شناسایی شدند. همزمان با گزارش‌های مقاومت به پنی‌سیلین دانشمندان نسل‌های جدیدی از پنی‌سیلین را معرفی کردند اما گزارش‌های مقاومت به آنها نیز یکی پس از دیگری ارائه شدند (شکل ۱).



شکل ۱- تاریخچه شناسایی آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتا-لاکتام (پنی‌سیلین) و گزارش‌های مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها

آنتی‌بیوتیک‌های خانواده پنی‌سیلین در ساختار مولکولی خود دارای یک حلقه‌ی بتا-لاکتام^۳ هستند (شکل ۲)، به همین دلیل آنها را آنتی‌بیوتیک‌های بتا-لاکتام نیز می‌نامند (۴). باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت در دیواره سلولی خود دارای ساختار پپتیدو گلیکان هستند که از تکرار زیرواحدهای دی‌ساکارید با پیوند متقاطع آمینواسیدها به دست آمده است (۵). آنزیم

ترانس‌پپتیداز نقش کلیدی در فرایند تشکیل این ساختار در دیواره باکتریایی ایفا می‌کند. پنی‌سیلین و دیگر آنتی‌بیوتیک‌های دارای حلقه بتا-لاکتام با اتصال به آنزیم ترانس‌پپتیداز به صورت رقابتی فعالیت آن را مهار می‌کنند. مهار آنزیم ترانس‌پپتیداز از سنتز دیواره باکتریایی جلوگیری کرده و سبب مرگ باکتری می‌گردد (۳).

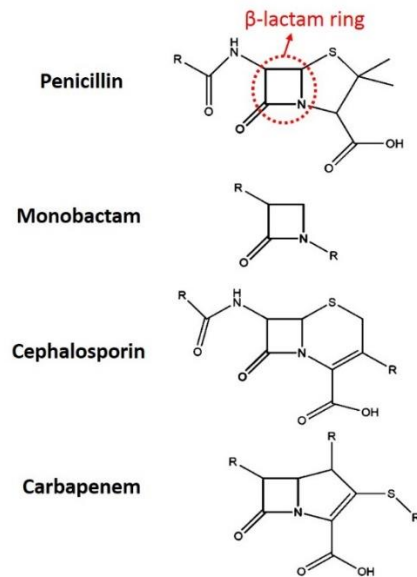
4. β -lactam

1. Alexander Fleming
2. Howard Walter Florey
3. Ernst Boris Chain

همان‌طور که گفته شد، مکانیسم دوم مقاومت به پنی سیلین و سایر آنتی بیوتیک‌های خانواده بتا-لاکتام در طیف گسترده‌ای از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت مشاهده می‌شود. شناسایی و مطالعه ژن‌های درگیر در فرایند آنزیم بتا-لاکتاماز می‌تواند در شکستن این مکانیسم دفاعی باکتریایی در مقابل آنتی بیوتیک‌های بتا-لاکتام مؤثر باشد. به همین دلیل در این مطالعه با استفاده از اطلاعات موجود در پایگاه‌های داده و با بهره‌گیری از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی شبکه ژنی درگیر در فرایند سنتز آنزیم بتا-لاکتاماز در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی ترسیم می‌گردد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ابتدا ژن‌های شناخته شده بتا-لاکتاماز در باکتری *E. coli* از مقالات و پایگاه داده پروتئین Uniprot جمع‌آوری شدند (۸). سپس این ژن‌ها وارد پایگاه داده STRING-db شدند (۹) و با استفاده از پارامترهای Text mining، Neighborhood Databases، Co-Expression، Gene Experiments، Co-occurrence و نهایتاً fusion سایر ژن‌های درگیر در فرایند سنتز بتا-لاکتاماز مشخص شدند. میزان همبستگی این ژن‌ها با یکدیگر بر اساس پارامترهای اشاره شده تعیین گردید. نتایج به دست آمده از آنالیز STRING-db استفاده از نرم‌افزار Cytoscape جهت بازسازی شبکه ژنی بتا-لاکتاماز مورد استفاده قرار گرفت (۱۰). توپولوژی شبکه بر اساس مؤلفه‌های Betweenness Centrality و Closeness Centrality با استفاده از نرم‌افزار NetworkAnalyzer مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (۱۱). مؤلفه Betweenness Centrality عبارت است از میزان مرکزیت یک node در یک شبکه پیچیده و بر اساس تعداد خطوط ارتباطی هر node محاسبه می‌گردد. در مقابل Closeness Centrality عبارت است از کوتاه‌ترین فاصله از یک



شکل ۲- حلقه بتا-لاکتام در آنتی بیوتیک‌های خانواده بتا-لاکتام (پنی سیلین)

فرایند مقاومت به آنتی بیوتیک‌های خانواده بتا-لاکتام به سه طریق متفاوت صورت می‌گیرد. اولین مکانیسم مقاومت مربوط به باکتری‌های گرم منفی می‌باشد که با تغییر در ساختار پورین‌ها (منافذ موجود در دیواره باکتریایی) مانع ورود آنتی بیوتیک به داخل باکتری می‌شوند. دومین مکانیسم مقاومت در باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت مشترک می‌باشد. این باکتری‌های مقاوم دارای آنزیم بتا-لاکتاماز هستند که توانایی شکستن پیوند C-N را در حلقه بتا-لاکتام دارد. باکتری‌های گرم مثبت نظیر *S. aureus*، با ترشح آنزیم بتا-لاکتاماز (پنی سیلیناز) از اتصال آنتی بیوتیک به دیواره خارجی پپتیدو گلیکان جلوگیری می‌کنند. اما در باکتری‌های گرم منفی آنزیم بتا-لاکتاماز ترشح نشده و متصل به غشای سیتوپلاسمی می‌باشد. بنابراین فرایند تجزیه آنتی بیوتیک به صورت موضعی در فضای پری پلاسمیک صورت می‌گیرد. نهایتاً در مکانیسم سوم مقاومت به آنتی بیوتیک‌های خانواده بتا-لاکتام، باکتری‌ها ساختار مولکولی آنزیم ترانس‌پپتیداز را تغییر می‌دهند به نحوی که دیگر آنتی بیوتیک قادر به اتصال به آن نباشد (۶، ۷).

ampH ampD ampE cyoC cyoA cyoD بالایی *rseP* و *ygdD nadB nadA* Closeness Centrality برابر با (۱) بودند. در مقابل *ampC* برابر با (۰/۰۷۲۶) بالایی *ampC* Closeness Centrality را دارا بود. ژنهای *yfeW* و *ampE* (۰/۰۱۷۴)، *yajG* (۰/۰۱۷۲)، *dacA* (۰/۰۱۴۹) و *ampE* (۰/۰۱۲۹) به ترتیب در ردیف بعدی بالایی *ampE* Closeness Centrality قرار داشتند.

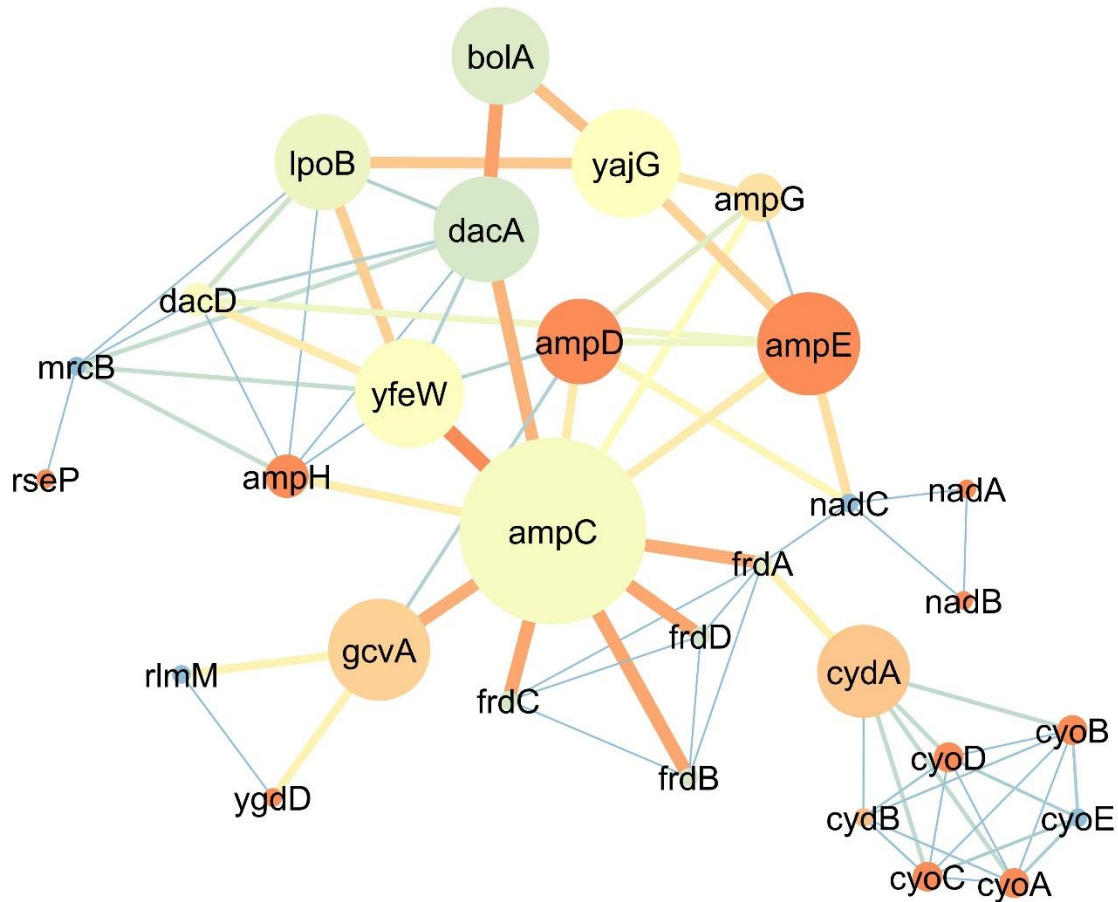
محصول ژن *ampC* یک آنزیم بتا-لاکتاماز سرین می باشد که سوسترای اختصاصی آن آنتی بیوتیک cephalosporin می باشد (۱۸). این آنزیم واکنش شکل (۴) را کاتالیز کرده و در حضور مولکول آب حلقه بتا-لاکتام را شکسته و یک مولکول بتا-آمینو اسید تولید می کند (۱۹). شبکه ترسیم شده نشان می دهد ژن *ampC* یکی از اصلی ترین ژنهای مقاومت به آنتی بیوتیکهای بتا لاکتام می باشد. چرا که حذف ژن *ampC* از شبکه ترسیم شده ارتباط بخش بزرگی از ژنهای موجود در شبکه را با یکدیگر قطع می کند. ژن *ampD* یک پروتئین سیتوپلاسمی ۲۰/۵ کیلودالتون را کد می کند در حالی که محصول ژن *ampE* یک پروتئین ۳۲/۱ کیلودالتونی غشایی با یک سایت اتصال ATP می باشد. از آنجا که نه *ampD* و نه *ampE* برای القاء بتا-لاکتام مورد نیاز نیستند و از آنجا که این پروتئینها نمی توانند به صورت کووالانسی توسط بنزیل پنی سیلین نشان دار شوند، تصور نمی شود که آنها مستقیماً حضور بتا-لاکتام را در محیط سلولی گزارش دهند. بلکه به نظر می رسد که *ampD* و *ampE* اثر حضور بتا-لاکتام را در بیوسنتز پپتیدوگلیکان حس می کنند و این سیگنال را به *ampR* منتقل می کنند (۲۰، ۲۱). از همین خانواده ژن *ampH* نیز نقش بتا-لاکتامزی دارد، اما در مقایسه با سایر ژنها نظیر *ampC* بسیار محدود بوده و نقش اصلی آن بازسازی زنجیره پپتیدوگلیکان در

node به سایر node ها. به عبارت ساده تر میزان Closeness Centrality و Betweenness Centrality برای یک node نشان دهنده اهمیت بالای آن node در شبکه می باشد (۱۲، ۱۳). آنالیزهای آنتولوژی ژنهای موجود در شبکه با استفاده از نرم افزار تحت وب DAVID انجام شد (۱۴). سپس برای تک تک ژنها P-Benjaminه value محاسبه شدند (۱۵).

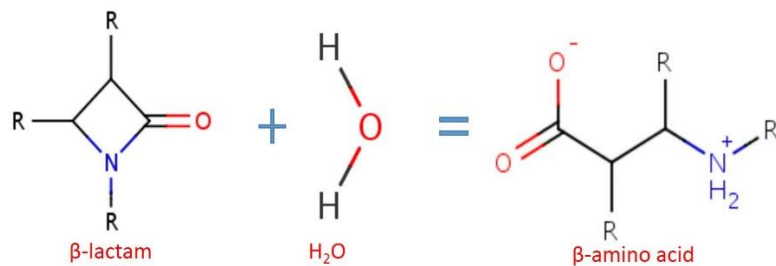
نتایج و بحث

دو دسته آنزیم بتا-لاکتاماز وجود دارند که دسته اول کلاس A, C و D هستند که از سرین برای هیدرولیز بتا-لاکتام استفاده می کنند و دسته دوم کلاس B هستند که از یونهای دیوالانت روی برای هیدرولیز سوسترها بهره می گیرند (۱۶). دانشمندان بیش از ۱۹۰ پروتئین را شناسایی کرده اند که می توانند با مولکولهای حاوی حلقه بتا-لاکتام واکنش داده و آنها را تجزیه و یا از فعالیت آنها ممانعت کنند (۱۷).

با بررسی مقالات و اطلاعات موجود در پایگاه داده Uniprot تعداد ۲۳ ژن با کارکرد بتا-لاکتاماز در باکتری *E. coli* مشخص شد. با استفاده از پایگاه داده STRING-db همبستگی این ژنها محاسبه شد. نهایتاً شبکه ژنی مربوطه با استفاده از نرم افزار Cytoscape بازسازی شد. همان طور که در شکل ۳ مشاهده می شود تعداد ۳۰ ژن اصلی در فرایند سنتز آنزیم بتا-لاکتاماز نقش کلیدی دارند. آنالیزهای توپولوژی شبکه نشان داد ژن *ampC* با (۱۱) ارتباط، بالایی ترین تعداد ارتباط با سایر ژنهای موجود در شبکه را داشت و ژنهای *yfeW* و *dacA* هر کدام با (۷) ارتباط در ردیف بعدی بودند. همچنین ژنهای *ampB*، *ampC*، *ampD*، *ampE*، *ampH*، *ampR*، *ampS*، *ampT*، *ampU*، *ampV*، *ampW*، *ampX*، *ampY*، *ampZ*، *ampAA*، *ampAB*، *ampAC*، *ampAD*، *ampAE*، *ampAF*، *ampAG*، *ampAH*، *ampAI*، *ampAJ*، *ampAK*، *ampAL*، *ampAM*، *ampAN*، *ampAO*، *ampAP*، *ampAQ*، *ampAR*، *ampAS*، *ampAT*، *ampAU*، *ampAV*، *ampAW*، *ampAX*، *ampAY*، *ampAZ*، *ampBA*، *ampBB*، *ampBC*، *ampBD*، *ampBE*، *ampBF*، *ampBG*، *ampBH*، *ampBI*، *ampBJ*، *ampBK*، *ampBL*، *ampBM*، *ampBN*، *ampBO*، *ampBP*، *ampBQ*، *ampBR*، *ampBS*، *ampBT*، *ampBU*، *ampBV*، *ampBW*، *ampBX*، *ampBY*، *ampBZ*، *ampCA*، *ampCB*، *ampCC*، *ampCD*، *ampCE*، *ampCF*، *ampCG*، *ampCH*، *ampCI*، *ampCJ*، *ampCK*، *ampCL*، *ampCM*، *ampCN*، *ampCO*، *ampCP*، *ampCQ*، *ampCR*، *ampCS*، *ampCT*، *ampCU*، *ampCV*، *ampCW*، *ampCX*، *ampCY*، *ampCZ*، *ampDA*، *ampDB*، *ampDC*، *ampDD*، *ampDE*، *ampDF*، *ampDG*، *ampDH*، *ampDI*، *ampDJ*، *ampDK*، *ampDL*، *ampDM*، *ampDN*، *ampDO*، *ampDP*، *ampDQ*، *ampDR*، *ampDS*، *ampDT*، *ampDU*، *ampDV*، *ampDW*، *ampDX*، *ampDY*، *ampDZ*، *ampEA*، *ampEB*، *ampEC*، *ampED*، *ampEE*، *ampEF*، *ampEG*، *ampEH*، *ampEI*، *ampEJ*، *ampEK*، *ampEL*، *ampEM*، *ampEN*، *ampEO*، *ampEP*، *ampEQ*، *ampER*، *ampES*، *ampET*، *ampEU*، *ampEV*، *ampEW*، *ampEX*، *ampEY*، *ampEZ*، *ampFA*، *ampFB*، *ampFC*، *ampFD*، *ampFE*، *ampFF*، *ampFG*، *ampFH*، *ampFI*، *ampFJ*، *ampFK*، *ampFL*، *ampFM*، *ampFN*، *ampFO*، *ampFP*، *ampFQ*، *ampFR*، *ampFS*، *ampFT*، *ampFU*، *ampFV*، *ampFW*، *ampFX*، *ampFY*، *ampFZ*، *ampGA*، *ampGB*، *ampGC*، *ampGD*، *ampGE*، *ampGF*، *ampGG*، *ampGH*، *ampGI*، *ampGJ*، *ampGK*، *ampGL*، *ampGM*، *ampGN*، *ampGO*، *ampGP*، *ampGQ*، *ampGR*، *ampGS*، *ampGT*، *ampGU*، *ampGV*، *ampGW*، *ampGX*، *ampGY*، *ampGZ*، *ampHA*، *ampHB*، *ampHC*، *ampHD*، *ampHE*، *ampHF*، *ampHG*، *ampHH*، *ampHI*، *ampHJ*، *ampHK*، *ampHL*، *ampHM*، *ampHN*، *ampHO*، *ampHP*، *ampHQ*، *ampHR*، *ampHS*، *ampHT*، *ampHU*، *ampHV*، *ampHW*، *ampHX*، *ampHY*، *ampHZ*، *ampIA*، *ampIB*، *ampIC*، *ampID*، *ampIE*، *ampIF*، *ampIG*، *ampIH*، *ampII*، *ampIJ*، *ampIK*، *ampIL*، *ampIM*، *ampIN*، *ampIO*، *ampIP*، *ampIQ*، *ampIR*، *ampIS*، *ampIT*، *ampIU*، *ampIV*، *ampIW*، *ampIX*، *ampIY*، *ampIZ*، *ampJA*، *ampJB*، *ampJC*، *ampJD*، *ampJE*، *ampJF*، *ampJG*، *ampJH*، *ampJI*، *ampJJ*، *ampJK*، *ampJL*، *ampJM*، *ampJN*، *ampJO*، *ampJP*، *ampJQ*، *ampJR*، *ampJS*، *ampJT*، *ampJU*، *ampJV*، *ampJW*، *ampJX*، *ampJY*، *ampJZ*، *ampKA*، *ampKB*، *ampKC*، *ampKD*، *ampKE*، *ampKF*، *ampKG*، *ampKH*، *ampKI*، *ampKJ*، *ampKK*، *ampKL*، *ampKM*، *ampKN*، *ampKO*، *ampKP*، *ampKQ*، *ampKR*، *ampKS*، *ampKT*، *ampKU*، *ampKV*، *ampKW*، *ampKX*، *ampKY*، *ampKZ*، *ampLA*، *ampLB*، *ampLC*، *ampLD*، *ampLE*، *ampLF*، *ampLG*، *ampLH*، *ampLI*، *ampLJ*، *ampLK*، *ampLL*، *ampLM*، *ampLN*، *ampLO*، *ampLP*، *ampLQ*، *ampLR*، *ampLS*، *ampLT*، *ampLU*، *ampLV*، *ampLW*، *ampLX*، *ampLY*، *ampLZ*، *ampMA*، *ampMB*، *ampMC*، *ampMD*، *ampME*، *ampMF*، *ampMG*، *ampMH*، *ampMI*، *ampMJ*، *ampMK*، *ampML*، *ampMN*، *ampMO*، *ampMP*، *ampMQ*، *ampMR*، *ampMS*، *ampMT*، *ampMU*، *ampMV*، *ampMW*، *ampMX*، *ampMY*، *ampMZ*، *ampNA*، *ampNB*، *ampNC*، *ampND*، *ampNE*، *ampNF*، *ampNG*، *ampNH*، *ampNI*، *ampNJ*، *ampNK*، *ampNL*، *ampNM*، *ampNO*، *ampNP*، *ampNQ*، *ampNR*، *ampNS*، *ampNT*، *ampNU*، *ampNV*، *ampNW*، *ampNX*، *ampNY*، *ampNZ*، *ampOA*، *ampOB*، *ampOC*، *ampOD*، *ampOE*، *ampOF*، *ampOG*، *ampOH*، *ampOI*، *ampOJ*، *ampOK*، *ampOL*، *ampOM*، *ampON*، *ampOO*، *ampOP*، *ampOQ*، *ampOR*، *ampOS*، *ampOT*، *ampOU*، *ampOV*، *ampOW*، *ampOX*، *ampOY*، *ampOZ*، *ampPA*، *ampPB*، *ampPC*، *ampPD*، *ampPE*، *ampPF*، *ampPG*، *ampPH*، *ampPI*، *ampPJ*، *ampPK*، *ampPL*، *ampPM*، *ampPN*، *ampPO*، *ampPP*، *ampPQ*، *ampPR*، *ampPS*، *ampPT*، *ampPU*، *ampPV*، *ampPW*، *ampPX*، *ampPY*، *ampPZ*، *ampQA*، *ampQB*، *ampQC*، *ampQD*، *ampQE*، *ampQF*، *ampQG*، *ampQH*، *ampQI*، *ampQJ*، *ampQK*، *ampQL*، *ampQM*، *ampQN*، *ampQO*، *ampQP*، *ampQQ*، *ampQR*، *ampQS*، *ampQT*، *ampQU*، *ampQV*، *ampQW*، *ampQX*، *ampQY*، *ampQZ*، *ampRA*، *ampRB*، *ampRC*، *ampRD*، *ampRE*، *ampRF*، *ampRG*، *ampRH*، *ampRI*، *ampRJ*، *ampRK*، *ampRL*، *ampRM*، *ampRN*، *ampRO*، *ampRP*، *ampRQ*، *ampRR*، *ampRS*، *ampRT*، *ampRU*، *ampRV*، *ampRW*، *ampRX*، *ampRY*، *ampRZ*، *ampSA*، *ampSB*، *ampSC*، *ampSD*، *ampSE*، *ampSF*، *ampSG*، *ampSH*، *ampSI*، *ampSJ*، *ampSK*، *ampSL*، *ampSM*، *ampSN*، *ampSO*، *ampSP*، *ampSQ*، *ampSR*، *ampSS*، *ampST*، *ampSU*، *ampSV*، *ampSW*، *ampSX*، *ampSY*، *ampSZ*، *ampTA*، *ampTB*، *ampTC*، *ampTD*، *ampTE*، *ampTF*، *ampTG*، *ampTH*، *ampTI*، *ampTJ*، *ampTK*، *ampTL*، *ampTM*، *ampTN*، *ampTO*، *ampTP*، *ampTQ*، *ampTR*، *ampTS*، *ampTT*، *ampTU*، *ampTV*، *ampTW*، *ampTX*، *ampTY*، *ampTZ*، *ampUA*، *ampUB*، *ampUC*، *ampUD*، *ampUE*، *ampUF*، *ampUG*، *ampUH*، *ampUI*، *ampUJ*، *ampUK*، *ampUL*، *ampUM*، *ampUN*، *ampUO*، *ampUP*، *ampUQ*، *ampUR*، *ampUS*، *ampUT*، *ampUU*، *ampUV*، *ampUW*، *ampUX*، *ampUY*، *ampUZ*، *ampVA*، *ampVB*، *ampVC*، *ampVD*، *ampVE*، *ampVF*، *ampVG*، *ampVH*، *ampVI*، *ampVJ*، *ampVK*، *ampVL*، *ampVM*، *ampVN*، *ampVO*، *ampVP*، *ampVQ*، *ampVR*، *ampVS*، *ampVT*، *ampVU*، *ampVV*، *ampVW*، *ampVX*، *ampVY*، *ampVZ*، *ampWA*، *ampWB*، *ampWC*، *ampWD*، *ampWE*، *ampWF*، *ampWG*، *ampWH*، *ampWI*، *ampWJ*، *ampWK*، *ampWL*، *ampWM*، *ampWN*، *ampWO*، *ampWP*، *ampWQ*، *ampWR*، *ampWS*، *ampWT*، *ampWU*، *ampWV*، *ampWW*، *ampWX*، *ampWY*، *ampWZ*، *ampXA*، *ampXB*، *ampXC*، *ampXD*، *ampXE*، *ampXF*، *ampXG*، *ampXH*، *ampXI*، *ampXJ*، *ampXK*، *ampXL*، *ampXM*، *ampXN*، *ampXO*، *ampXP*، *ampXQ*، *ampXR*، *ampXS*، *ampXT*، *ampXU*، *ampXV*، *ampXW*، *ampXX*، *ampXY*، *ampXZ*، *ampYA*، *ampYB*، *ampYC*، *ampYD*، *ampYE*، *ampYF*، *ampYG*، *ampYH*، *ampYI*، *ampYJ*، *ampYK*، *ampYL*، *ampYM*، *ampYN*، *ampYO*، *ampYP*، *ampYQ*، *ampYR*، *ampYS*، *ampYT*، *ampYU*، *ampYV*، *ampYW*، *ampYX*، *ampYY*، *ampYZ*، *ampZA*، *ampZB*، *ampZC*، *ampZD*، *ampZE*، *ampZF*، *ampZG*، *ampZH*، *ampZI*، *ampZJ*، *ampZK*، *ampZL*، *ampZM*، *ampZN*، *ampZO*، *ampZP*، *ampZQ*، *ampZR*، *ampZS*، *ampZT*، *ampZU*، *ampZV*، *ampZW*، *ampZX*، *ampZY*، *ampZZ*، *ampAA*، *ampAB*، *ampAC*، *ampAD*، *ampAE*، *ampAF*، *ampAG*، *ampAH*، *ampAI*، *ampAJ*، *ampAK*، *ampAL*، *ampAM*، *ampAN*، *ampAO*، *ampAP*، *ampAQ*، *ampAR*، *ampAS*، *ampAT*، *ampAU*، *ampAV*، *ampAW*، *ampAX*، *ampAY*، *ampAZ*، *ampBA*، *ampBB*، *ampBC*، *ampBD*، *ampBE*، *ampBF*، *ampBG*، *ampBH*، *ampBI*، *ampBJ*، *ampBK*، *ampBL*، *ampBM*، *ampBN*، *ampBO*، *ampBP*، *ampBQ*، *ampBR*، *ampBS*، *ampBT*، *ampBU*، *ampBV*، *ampBW*، *ampBX*، *ampBY*، *ampBZ*، *ampCA*، *ampCB*، *ampCC*، *ampCD*، *ampCE*، *ampCF*، *ampCG*، *ampCH*، *ampCI*، *ampCJ*، *ampCK*، *ampCL*، *ampCM*، *ampCN*، *ampCO*، *ampCP*، *ampCQ*، *ampCR*، *ampCS*، *ampCT*، *ampCU*، *ampCV*، *ampCW*، *ampCX*، *ampCY*، *ampCZ*، *ampDA*، *ampDB*، *ampDC*، *ampDD*، *ampDE*، *ampDF*، *ampDG*، *ampDH*، *ampDI*، *ampDJ*، *ampDK*، *ampDL*، *ampDM*، *ampDN*، *ampDO*، *ampDP*، *ampDQ*، *ampDR*، *ampDS*، *ampDT*، *ampDU*، *ampDV*، *ampDW*، *ampDX*، *ampDY*، *ampDZ*، *ampEA*، *ampEB*، *ampEC*، *ampED*، *ampEE*، *ampEF*، *ampEG*، *ampEH*، *ampEI*، *ampEJ*، *ampEK*، *ampEL*، *ampEM*، *ampEN*، *ampEO*، *ampEP*، *ampEQ*، *ampER*، *ampES*، *ampET*، *ampEU*، *ampEV*، *ampEW*، *ampEX*، *ampEY*، *ampEZ*، *ampFA*، *ampFB*، *ampFC*، *ampFD*، *ampFE*، *ampFF*، *ampFG*، *ampFH*، *ampFI*، *ampFJ*، *ampFK*، *ampFL*، *ampFM*، *ampFN*، *ampFO*، *ampFP*، *ampFQ*، *ampFR*، *ampFS*، *ampFT*، *ampFU*، *ampFV*، *ampFW*، *ampFX*، *ampFY*، *ampFZ*، *ampGA*، *ampGB*، *ampGC*، *ampGD*، *ampGE*، *ampGF*، *ampGG*، *ampGH*، *ampGI*، *ampGJ*، *ampGK*، *ampGL*، *ampGM*، *ampGN*، *ampGO*، *ampGP*، *ampGQ*، *ampGR*، *ampGS*، *ampGT*، *ampGU*، *ampGV*، *ampGW*، *ampGX*، *ampGY*، *ampGZ*، *ampHA*، *ampHB*، *ampHC*، *ampHD*، *ampHE*، *ampHF*، *ampHG*، *ampHH*، *ampHI*، *ampHJ*، *ampHK*، *ampHL*، *ampHM*، *ampHN*، *ampHO*، *ampHP*، *ampHQ*، *ampHR*، *ampHS*، *ampHT*، *ampHU*، *ampHV*، *ampHW*، *ampHX*، *ampHY*، *ampHZ*، *ampIA*، *ampIB*، *ampIC*، *ampID*، *ampIE*، *ampIF*، *ampIG*، *ampIH*، *ampII*، *ampIJ*، *ampIK*، *ampIL*، *ampIM*، *ampIN*، *ampIO*، *ampIP*، *ampIQ*، *ampIR*، *ampIS*، *ampIT*، *ampIU*، *ampIV*، *ampIW*، *ampIX*، *ampIY*، *ampIZ*، *ampJA*، *ampJB*، *ampJC*، *ampJD*، *ampJE*، *ampJF*، *ampJG*، *ampJH*، *ampJI*، *ampJJ*، *ampJK*، *ampJL*، *ampJM*، *ampJN*، *ampJO*، *ampJP*، *ampJQ*، *ampJR*، *ampJS*، *ampJT*، *ampJU*، *ampJV*، *ampJW*، *ampJX*، *ampJY*، *ampJZ*، *ampKA*، *ampKB*، *ampKC*، *ampKD*، *ampKE*، *ampKF*، *ampKG*، *ampKH*، *ampKI*، *ampKJ*، *ampKL*، *ampKM*، *ampKN*، *ampKO*، *ampKP*، *ampKQ*، *ampKR*، *ampKS*، *ampKT*، *ampKU*، *ampKV*، *ampKW*، *ampKX*، *ampKY*، *ampKZ*، *ampLA*، *ampLB*، *ampLC*، *ampLD*، *ampLE*، *ampLF*، *ampLG*، *ampLH*، *ampLI*، *ampLJ*، *ampLK*، *ampLL*، *ampLM*، *ampLN*، *ampLO*، *ampLP*، *ampLQ*، *ampLR*، *ampLS*، *ampLT*، *ampLU*، *ampLV*، *ampLW*، *ampLX*، *ampLY*، *ampLZ*، *ampMA*، *ampMB*، *ampMC*، *ampMD*، *ampME*، *ampMF*، *ampMG*، *ampMH*، *ampMI*، *ampMJ*، *ampMK*، *ampML*، *ampMN*، *ampMO*، *ampMP*، *ampMQ*، *ampMR*، *ampMS*، *ampMT*، *ampMU*، *ampMV*، *ampMW*، *ampMX*، *ampMY*، *ampMZ*، *ampNA*، *ampNB*، *ampNC*، *ampND*، *ampNE*، *ampNF*، *ampNG*، *ampNH*، *ampNI*، *ampNJ*، *ampNK*، *ampNL*، *ampNM*، *ampNO*، *ampNP*، *ampNQ*، *ampNR*، *ampNS*، *ampNT*، *ampNU*، *ampNV*، *ampNW*، *ampNX*، *ampNY*، *ampNZ*، *ampOA*، *ampOB*، *ampOC*، *ampOD*، *ampOE*، *ampOF*، *ampOG*، *ampOH*، *ampOI*، *ampOJ*، *ampOK*، *ampOL*، *ampOM*، *ampON*، *ampOO*، *ampOP*، *ampOQ*، *ampOR*، *ampOS*، *ampOT*، *ampOU*، *ampOV*، *ampOW*، *ampOX*، *ampOY*، *ampOZ*، *ampPA*، *ampPB*، *ampPC*، *ampPD*، *ampPE*، *ampPF*، *ampPG*، *ampPH*، *ampPI*، *ampPJ*، *ampPK*، *ampPL*، *ampPM*، *ampPN*، *ampPO*، *ampPP*، *ampPQ*، *ampPR*، *ampPS*، *ampPT*، *ampPU*، *ampPV*، *ampPW*، *ampPX*، *ampPY*، *ampPZ*، *ampQA*، *ampQB*، *ampQC*، *ampQD*، *ampQE*، *ampQF*، *ampQG*، *ampQH*، *ampQI*، *ampQJ*، *ampQK*، *ampQL*، *ampQM*، *ampQN*، *ampQO*، *ampQP*، *ampQQ*، *ampQR*، *ampQS*، *ampQT*، *ampQU*، *ampQV*، *ampQW*، *ampQX*، *ampQY*، *ampQZ*، *ampRA*، *ampRB*، *ampRC*، *ampRD*، *ampRE*، *ampRF*، *ampRG*، *ampRH*، *ampRI*، *ampRJ*، *ampRK*، *ampRL*، *ampRM*، *ampRN*، *ampRO*، *ampRP*، *ampRQ*، *ampRR*، *ampRS*، *ampRT*، *ampRU*، *ampRV*، *ampRW*، *ampRX*، *ampRY*، *ampRZ*، *ampSA*، *ampSB*، *ampSC*، *ampSD*، *ampSE*، *ampSF*، *ampSG*، *ampSH*، *ampSI*، *ampSJ*، *ampSK*، *ampSL*، *ampSM*، *ampSN*، *ampSO*، *ampSP*، *ampSQ*، *ampSR*، *ampSS*، *ampST*، *ampSU*، *ampSV*، *ampSW*، *ampSX*، *ampSY*، *ampSZ*، *ampTA*، *ampTB*، *ampTC*، *ampTD*، *ampTE*، *ampTF*



شکل ۳- شبکه ژن های درگیر در فرایند سنتز آنزیم بتا-لاکتاماز در باکتری *E. coli* اندازه node بر اساس میزان Betweenness Centrality (اندازه کوچک برای مقادیر کمتر)، و رنگ از آبی (Closeness Centrality پایین) تا قرمز (Closeness Centrality بالا) متغیر می باشد. رنگ و ضخامت خطوط ارتباطی بر مبنای Edge Betweenness از قرمز و ضخیم برای مقادیر زیاد تا آبی و نازک برای مقادیر کم متغیر است



شکل ۴- واکنش کانالیز شده توسط آنزیم بتا-لاکتاماز *ampC* آنزیم *ampC* حلقه بتا-لاکتام موجود در آنتی بیوتیک را در حضور مولکول آب شکسته و یک مولکول بتا-آمینو اسید تولید می کند.

ژن های این زیر شبکه بخشی از خانواده سیتوکروم باکتری *E. coli* هستند که در زنجیره انتقال الکترون نقش دارند. *cydA* یک اکسیداز

cydA نقش کلیدی در شبکه بازسازی شده در شکل (۳) را دارا می باشد. این ژن ارتباطش با سایر ژن های شبکه

ترمینال است که با انتقال ناقل پروتون‌ها به غشای داخلی، نیروی حرکتی پروتون ایجاد می‌کند. این جزء زنجیره تنفسی هوازی *E. coli* است که در هنگام رشد سلول‌ها در هوادهی پایین غالب می‌شود (۲۳).

ژن *yfeW* یکی دیگر از ژن‌های مهم در شبکه بازسازی شده می‌باشد که توانایی اتصال به مولکول آنتی‌بیوتیک و تجزیه آن را دارد (۲۴). بی تردید این ژن نیز در کنار ژن *ampC* مستقیماً با تجزیه ساختار آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتا-لاکتام نقش کلیدی در مقاومت باکتری *E. coli* به این آنتی‌بیوتیک‌ها دارد. بررسی عملکرد سایر ژن‌های موجود در شبکه سنتز بتا-لاکتاماز در باکتری *E. coli* نشان می‌دهد قابلیت بتا-لاکتامازی این ژن‌ها عملکرد جانبی این ژن‌ها بوده و طیف گسترده‌ای از عملکردهای مولکولی را کاتالیز می‌کنند که از مشارکت در زنجیره انتقال الکترون گرفته تا سنتز دیواره باکتریایی را در بر می‌گیرد.

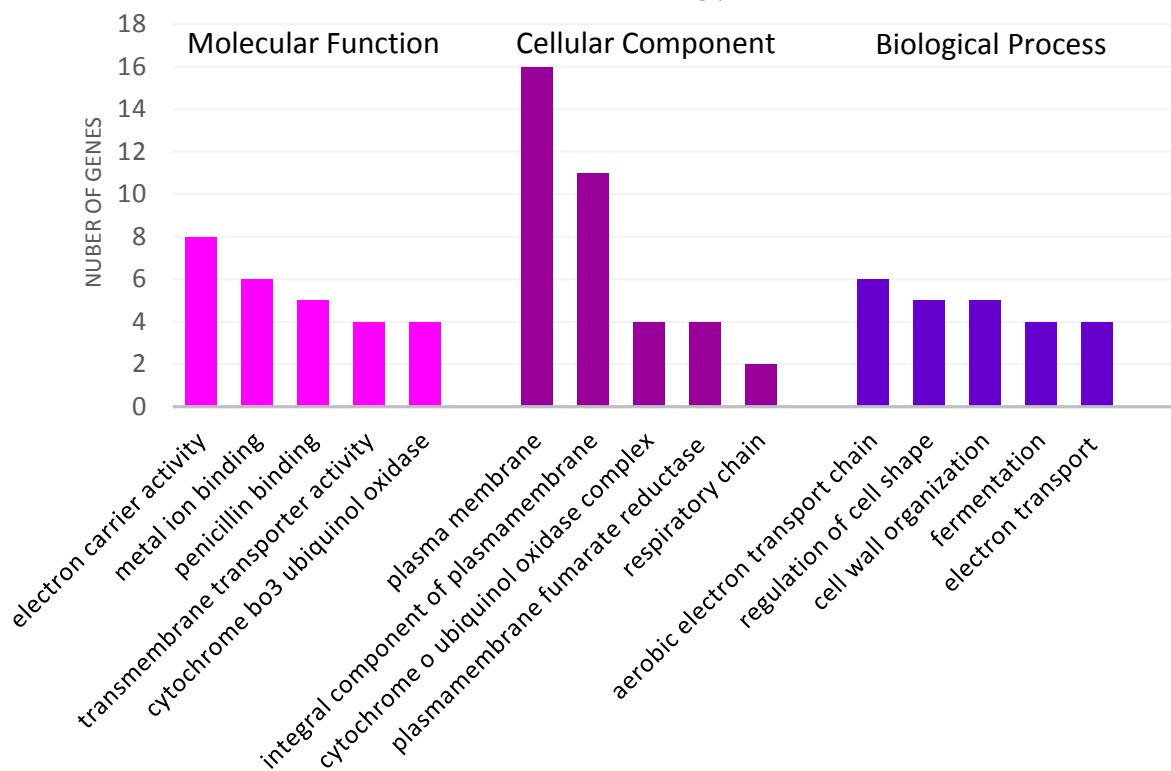
شکل (۵) نمودار حاصل از آنالیز ژن آنتولوژی را نشان می‌دهد. با توجه به گستردگی تعداد عبارت‌های ژن آنتولوژی معنادار در سطح ۰/۰۵ درصد، تنها ۵ عبارت دارای بالاترین تعداد ژن در نمودار آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود از منظر عملکرد مولکولی، فعالیت حمل الکترون با *p-value* برابر با $6.5E-6$ بالاترین تعداد ژن را در شبکه بازسازی شده دارا می‌باشد. همچنین اتصال به عناصر فلزی با *p-value* برابر با $9.1E-2$ و اتصال به پنی‌سیلین با *p-value* برابر با $1.1E-6$ در ردیف بعدی قرار دارند. از منظر جایگاه سلولی ژن‌های مورد مطالعه، ۱۶ ژن با *p-value* برابر با $4.4E-2$ در غشای سلولی جای داشتند. همچنین با بررسی مسیر بیولوژیکی ژن‌های شبکه بتا-لاکتاماز مشاهده شد که زنجیره انتقال الکترون با *p-value*

برابر با $2.6E-9$ و تنظیم شکل و ابعاد سلول و ساخت دیواره سلولی به ترتیب با *p-value* برابر با $5.2E-4$ و $2.3E-3$ فعال‌ترین مسیرهای بیولوژیکی در زمان مواجهه با آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتا-لاکتام می‌باشند. نتایج ژن آنتولوژی به روشنی نشان می‌دهد فرایند مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتا-لاکتام به شدت نیازمند انرژی به‌دست آمده از زنجیره انتقال الکترون می‌باشد. همچنین مقاومت به آنتی‌بیوتیک در باکتری *E. coli* وابسته به عملکرد بتا-لاکتامازی پروتئین‌های فعال در غشای سلولی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

باکتری *E. coli* دارای مکانیسم مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده پنی‌سیلین یا همان بتا-لاکتام می‌باشد. این فرایند از طریق سنتز آنزیم بتا-لاکتاماز صورت می‌گیرد. شبکه بازسازی شده ژن‌های درگیر در فرایند مقاومت به آنتی‌بیوتیک بتا-لاکتام نشان داد ژن *ampC* نقش محوری در القای مقاومت در *E. coli* دارد. همچنین بررسی جزئیات عملکردی تک تک ژن‌های شبکه نشان داد غیر از پنج ژن که وظیفه اصلی آنها تجزیه حلقه بتا-لاکتام آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد، ویژگی بتا-لاکتامازی سایر ژن‌های شبکه، صرفاً یک قابلیت ثانویه بوده و وظیفه اصلی آنها مشارکت در سایر فرایندهای غیر مرتبط سلولی می‌باشد. مطالعات ژن آنتولوژی نشان داد فرایند مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتا-لاکتام همبستگی مثبت با زنجیره انتقال الکترون دارد. همچنین بررسی جایگاه سلولی ژن‌ها نشان داد غشای سلولی فعال‌ترین اندام سلولی در زمان مواجهه با آنتی‌بیوتیک بتا-لاکتام در باکتری *E. coli* می‌باشد.

Gene Anthology



شکل ۵- نمودار بررسی ژن آنولوژی ژن های استفاده شده در ترسیم شبکه ژنی بتا-لاکتاماز

حمایت مالی دانشگاه زابل انجام شده است. شماره گرت ۹۶۱۸-۱۲۷

سپاسگزاری

ضمن قدردانی از همکاران حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه زابل اعلام می گردد این تحقیق با

References

- 1- **Gaynes R.** The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(5):849-53.
- 2- **Abraham EP, Chain E.** An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Reviews of infectious diseases.* 1988;10:(۴)677-8.
- 3- **Lobanovska M, Pilla G.** Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *Yale J Biol Med.* 2017;90(1):135-45.
- 4- **Kong K-F, Schnepfer L, Mathee K.** Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS.* 2010;118(1):1-36.
- 5- **Typas A, Banzhaf M, Gross CA, Vollmer W.** From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol.* 2011;10(2):123-36.
- 6- **Patterson J, Tsilimigras MCB, Livesay DR, Jacobs DJ.** Evolution of Stability/Flexibility Relationships in Beta-Lactamase. *Biophysical Journal.* 2019;116(3):472a.

- 7- **Subedi D, Vijay AK, Willcox M.** Overview of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an ocular perspective. *Clinical and Experimental Optometry.* 2018;101(2):162-71.
- 8- **Apweiler R, Bairoch A, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S, et al.** UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic acids research.* 2004;32(Database issue):D115-D9.
- 9- **Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, et al.** The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic acids research.* 2017;45(Database issue):D362-D8.
- 10- **Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al.** Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research.* 2003;13(11):2498-504.
- 11- **Assenov Y, Ramirez F, Schelhorn SE,**

Lengauer T, Albrecht M. Computing topological parameters of biological networks. *Bioinformatics*. 2008;24(2):282-4.

12- Shiri Y, Solouki M, Ebrahimie E, Emamjomeh A, Zahiri J. Gibberellin causes wide transcriptional modifications in the early stage of grape cluster development. *Genomics*. 2019.

13- Shiri Y, Solouki M, Ebrahimie E, Emamjomeh A, Zahiri J. Unraveling the Transcriptional Complexity of Compactness in Sistan Grape Cluster. *Plant Science*. 2018.

14- Jiao X, Sherman BT, Huang DW, Stephens R, Baseler MW, Lane HC, et al. DAVID-WS: a stateful web service to facilitate gene/protein list analysis. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2012;28(13):1805-6.

15- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)*. 1995;57(1):289-300.

16- Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(3):969-76.

17- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1995;39(6):1211-33.

18- Pierrard A, Ledent P, Docquier JD, Feller G, Gerday C, Frère JM. Inducible class C β -lactamases produced by psychrophilic bacteria.

FEMS microbiology letters. 1998;161(2):311-5.

19- Horsfall LE, Garau G, Lienard BM, Dideberg O, Schofield CJ, Frere JM, et al. Competitive inhibitors of the CphA metallo-beta-lactamase from *Aeromonas hydrophila*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(6):2136-42.

20- Lindquist S, Galleni M, Lindberg F, Normark S. Signalling proteins in enterobacterial AmpC beta-lactamase regulation. *Mol Microbiol*. 1989;3(8):1091-102.

21- Heseck D, Lee M, Zhang W, Noll BC, Mobashery S. Total synthesis of N-acetylglucosamine-1,6-anhydro-N-acetylmuramylpentapeptide and evaluation of its turnover by AmpD from *Escherichia coli*. *Journal of the American Chemical Society*. 2009;131(14):5187-93.

22- Gonzalez-Leiza SM, de Pedro MA, Ayala JA. AmpH, a bifunctional DD-endopeptidase and DD-carboxypeptidase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2011;193(24):6887-94.

23- Borisov VB, Murali R, Verkhovskaya ML, Bloch DA, Han H, Gennis RB, et al. Aerobic respiratory chain of *Escherichia coli* is not allowed to work in fully uncoupled mode. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(42):17320-4.

24- Vega D, Ayala JA. The DD-carboxypeptidase activity encoded by pbp4B is not essential for the cell growth of *Escherichia coli*. *Archives of microbiology*. 2006;185(1):23-7.

Reconstitution of Gene Network on Penicillin Resistance in *E.coli* Using Databases Information

Yasoub Shiri^{1*}, Mohammad ali Karimiyan ²

1- Assistant professor of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran.

2- Lecturer, Research Dept. Of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: December 1, 2019; Revise: January 8, 2020; Accept: January 11, 2020

Summary

The discovery of penicillin has revolutionized the medical industry and saved thousands of lives. But over time, the resistant bacteria to this antibiotic were identified one after another. Antibiotics of the penicillin family have a β -lactam ring in their molecular structure. By competitively binding to transpeptidase, penicillin and other β -lactam antibiotics inhibit its activity. Inhibition of transpeptidase activity prevents cell wall synthesis and causes bacterial death. Resistant bacteria, have β -lactamase enzyme which has the ability to break the C-N bond in the β -lactam ring. In this study, we reconstructed a network of known β -lactamase genes in *E.coli*. The results showed that *ampC* gene plays a central role in induction of resistance in *E.coli*. Molecular function analysis of other β -lactamase genes showed that β -lactamase activity is only a secondary function for them and their main function is to participate in other unrelated cellular processes. Gene ontology analysis showed that the process of resistance to β -lactam antibiotics was positively correlated with electron transport chain. Also, when exposed to β -lactam antibiotics, the cell membrane is the most active cellular component in *E.coli* and antibiotic resistance is dependent on the β -lactamase function of cell membrane proteins.

Key words: Antibiotics, Beta-Lactam, Gene Network, Bacteria