

## بازسازی شبکه هم‌بیانی ژن *ampC* به‌عنوان عامل اصلی مقاومت باکتری سودوموناس (*Pseudomonas aeruginosa*) به آنتی‌بیوتیک جدید Ceftolozane/Tazobactam

یعثوب شیرى\*<sup>۱</sup>، زینب محکمی<sup>۱</sup>، فاطمه بیدرنامنی<sup>۱</sup>

۱- استادیار گروه پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، پژوهشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۱۷ تیر ۱۴۰۱، بازنگری: ۲۹ تیر ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۱ مرداد ۱۴۰۱

### چکیده

*Pseudomonas aeruginosa* یک باکتری میله‌ای گرم‌منفی و هوازی است که باعث عفونت در دستگاه ادراری، سیستم تنفسی، غشای میانی پوست، بافت‌های نرم، باکتری‌می و غیره می‌شود. سفنولوزان-تازوباکتام (C/T) یک آنتی‌بیوتیک مؤثر در کنترل این باکتری می‌باشد. اما اخیراً گزارش‌هایی مبنی بر ظهور سویه‌های مقاوم نسبت به این آنتی‌بیوتیک چالشی جدی را در راه مبارزه با عفونت‌های ناشی از *P. aeruginosa* ایجاد کرده است. ژن *ampC* یکی از ژن‌های اصلی سنتز بتالاکتاماز می‌باشد. مطالعات نشان داده سفنولوزان-تازوباکتام نفوذپذیری غشای خارجی بهتر و پایداری بیشتری در برابر *ampC* بتالاکتاماز کروموزومی نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام دارد. با توجه به اهمیت ژن *ampC* در فرایند مقاومت باکتری *P. aeruginosa* به آنتی‌بیوتیک ترکیبی سفنولوزان-تازوباکتام شبکه هم‌بیانی ژن *ampC* بازسازی شده و فرایند بروز مقاومت مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تعداد ۳۱ ژن در فرایند بتالاکتامازی در باکتری *P. aeruginosa* با ژن *ampC* همبستگی نشان دادند. آنالیزهای توپولوژی شبکه نشان داد به ترتیب پنج ژن *ampC*، *ampD*، *ampR*، *poxB* و *nagZ* بالاترین اهمیت را در شبکه دارا می‌باشند. ژن *ampC* با ۱۶ ارتباط، بالاترین تعداد ارتباط مستقیم با سایر ژن‌های موجود در شبکه را دارا بود. تعداد هشت فرایند سلولی بالاترین تعداد نماینده را در میان ژن‌ها دارا بودند. بر اساس آنالیز آماری فرایندهای سلولی معنادار در میان ژن‌های مورد مطالعه، به نظر می‌رسد ارتباط مستقیمی بین متابولیسم پیرووات و مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام وجود داشته باشد. نتایج نشان داد ژن اصلی مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک سفنولوزان-تازوباکتام *ampC* می‌باشد. علی‌رغم اینکه مطالعات نشان داده دو ژن *poxA* و *poxB* تأثیر قابل توجهی در مقاومت باکتری *P. aeruginosa* ندارند. اهمیت این دو ژن در شبکه بازسازی شده تأکید می‌کند که مطالعات بیشتری بر روی آنها صورت گیرد.

واژه‌های کلیدی: شبکه ژنی، ژن آنتولوژی، پروکاریوت، بتالاکتاماز

## مقدمه

سودوموناس (*Pseudomonas aeruginosa*) يك باكتري ميله‌اى گرم‌منفى و هوازى از خانواده سودوموناداسه (*Pseudomonadaceae*) است. اين خانواده شامل ۱۲ عضو ديگر نيز مى‌باشد كه همگى معمولاً در خاك و آب و همچنين در گياهان و انسان يافت مى‌شوند (۱). در حالى كه باكتري سودوموناس يكي از معدود پاتوژن‌هاى واقعى براى گياهان است، به يك پاتوژن فرصت‌طلب در حال ظهور در كلينيك‌ها تبديل شده است. مطالعات اپيدميولوژيك اخير آن را جزوء پاتوژن‌هاى بيمارستانى نشان مى‌دهد، به‌ويژه وجود سويه‌هاى با مقاومت آنتى‌بيوتيكي (۲). به همين دليل باكتري سودوموناس توسط سازمان بهداشت جهانى به‌عنوان يك پاتوژن الويت‌دار در نظر گرفته مى‌شود كه نيازمنده راه حل‌هاى درمانى جديد در برابر آن مى‌باشيم. اين باكتري مى‌تواند باعث عفونت در دستگاه ادرارى، سيستم تنفسى، غشاي مياني پوست، بافت‌هاى نرم، باكتريمى (bacteraemia) (حضور باكتري در خون)، استخوان و مفاصل، دستگاه گوارش و خون شود، به‌ويژه در بيماران مبتلا به سوختگى شديد، سل، سرطان و ايدز (۲). نكته مهم افزايش ۵۰ درصدى احتمال مرگ بيماران بسترى سرطان، سوختگى و انسداد كيستيك روده‌هاى گوارشى و مجارى تنفسى (Cystic fibrosis) در صورت آلودگى بيمار به اين باكتري مى‌باشد. بروز كلّى عفونت‌هاى *P. aeruginosa* در بيمارستان‌هاى ايالات متحده به‌طور متوسط حدود ۰/۴ درصد بوده، و اين باكتري چهارمين پاتوژن شايع جدا شده بيمارستانى است و ۱۰ درصد از كل عفونت‌هاى بيمارستانى را تشكيل مى‌دهد (۳).

سودوموناس - تازوباكتام (Ceftolozane/Tazobactam) و سفنازيديم - آوى باكتام (Ceftazidime/Avibactam) دو

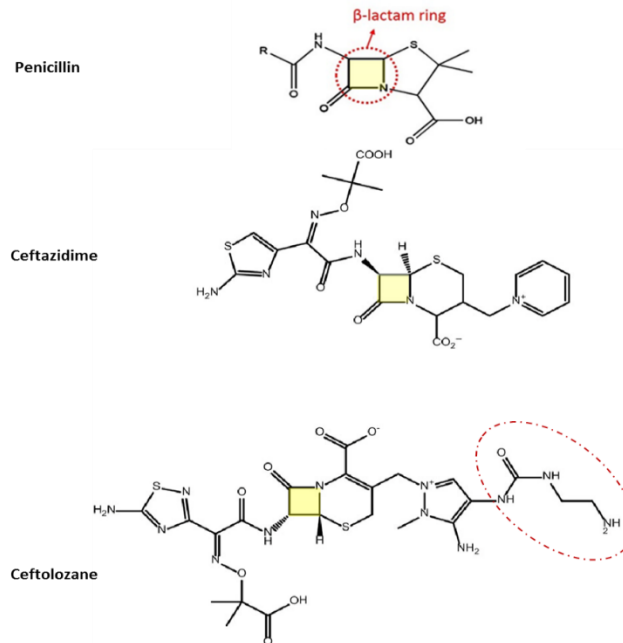
آنتى‌بيوتيک جديد ترکيبى بتالاكتام/ بتالاكتاماز هستند (۴). اخيراً ترکيب سفنولوزان- تازوباكتام (C/T) به‌عنوان مهارکننده آنزيم بتالاكتام/ بتا-لاكتاماز كه عامل اصلى مقاومت باكتري در مقابل آنتى‌بيوتيک هست معرفى شده است و به نظر مى‌رسد يك گزينه ارزشمند براى درمان بيماران شديداً آلوده به *P. aeruginosa* مقاوم به چند دارو مى‌باشد (۵). به دليل يك گروه حجيم پيوند شده در زنجيره جانبى ۳ موقعيت حلقه بتالاكتام (شكل ۱)، كه يك مانع فضايى ايجاد مى‌کند در نتيجه سفنولوزان در برابر حمله آنزيم‌هاى بتالاكتاماز کلاس C بهتر از ترکيب اصلى خود سفنازيديم مقاومت مى‌کند (۴). بتالاكتامازها بر اساس توالى اسيد آمينه‌هاى اوليه به چهار کلاس، A، B، C و D تقسيم مى‌شوند (۶). هر چهار کلاس در *P. aeruginosa* ثبت شده است (۶، ۷). با وجود مقاومت در برابر آنزيم‌هاى بتالاكتاماز کلاس C، سفنولوزان هيچ مزيتى نسبت به سفنازيديم در هنگام مواجهه با بتالاكتامازهاى (ESBL-Extended  $\beta$ -lactamases Spectrum) و کارباپنمازها (Carbapenemases) ندارد (۸).

آنتى‌بيوتيک‌هاى خانواده بتالاكتام در ساختار مولكولى خود داراى يك حلقه بتالاكتام مى‌باشند (شكل ۱). اين آنتى‌بيوتيک‌ها با اتصال به آنزيم ترانس پپتيداز در باكتري‌هاى گرم‌منفى و گرم‌مثبت از فعاليت آن كه مسئول سنتز ديواره باكتريايى مى‌باشد جلوگيرى مى‌کنند (۹). در نتيجه باكتري از بين مى‌رود. در مقابل باكتري‌ها از سه طريق مختلف نسبت به اين آنتى‌بيوتيک مقاومت مى‌کنند. اولين مکانيسم جلوگيرى از ورود آنتى‌بيوتيک به داخل باكتري از طريق تغيير در ساختار منافذ موجود در ديواره باكتري (Porin) مى‌باشد كه در باكتري‌هاى گرم‌منفى مشاهده مى‌گردد. دومين مکانيسم كه در هر دو گروه باكتري‌هاى گرم‌منفى و مثبت وجود

## بازسازی شبکه هم‌بیانی ژن *ampC* به‌عنوان عامل اصلی مقاومت باکتری سودوموناس ...

نهایتاً سومین مکانیسم تغییر در ساختار آنزیم ترانس‌پپتیداز و ممانعت از اتصال آنتی‌بیوتیک به آن می‌باشد (۱۰، ۱۱).

دارد، فعالیت آنزیم‌های بتالاکتاماز می‌باشد که قابلیت شکستن پیوند C-N در حلقه بتالاکتام را داشته و از این طریق آنتی‌بیوتیک را خنثی می‌کنند.



شکل ۱- مقایسه ساختار مولکولی آنتی‌بیوتیک‌های سفترولوزان و سفتازیدیم با آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین که هر سه جزو آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتا-لاکتام هستند. گروه پیوند شده در زنجیره جانبی حلقه بتالاکتام یک مانع فضایی ایجاد کرده و سفترولوزان را در برابر حمله آنزیم‌های بتالاکتاماز کلاس C مقاوم می‌کند

۱۲). در سال ۲۰۱۴ محققین امکان ایجاد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفترولوزان-تازوباکتام را در سویه‌های وحشی و جهش یافته *P. aeruginosa* بررسی کردند. نتایج نشان داد سویه‌های وحشی به راحتی با این آنتی‌بیوتیک نابود شدند و میزان مقاومت در سویه‌های جهش یافته بسیار ناچیز است. بررسی دقیق‌تر ترانس‌سکرپتوم سویه‌های دارای مقاومت نسبی به آنتی‌بیوتیک سفترولوزان-تازوباکتام نشان داد جهش‌های متعدد ضمن تغییرات ساختاری در توالی ژن *ampC* منجر به افزایش بیان آن شده است. لذا تنها احتمال بروز مقاومت به آنتی‌بیوتیک سفترولوزان-تازوباکتام جهش در ژن *ampC* معرفی شد (۱۳). نهایتاً در سال ۲۰۱۷ در کارولینای جنوبی عفونت باکتری *P. aeruginosa*

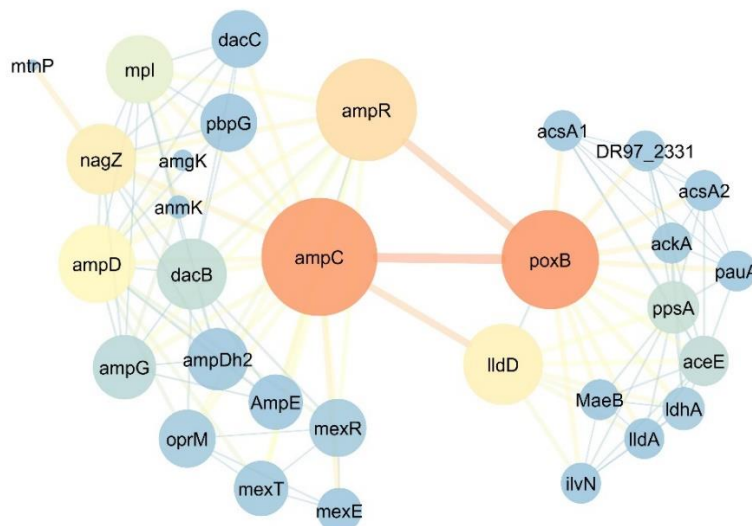
آنزیم بتالاکتاماز یکی از مکانیسم‌های اصلی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در بسیاری از باسیل‌های گرم‌منفی مانند *E. coli*, *A. baumannii* و *P. aeruginosa* است. ژن *ampC* یکی از ژن‌های اصلی سنتز بتالاکتاماز می‌باشد. دو ویژگی عمده که *ampC* بتالاکتامازها را از سایر بتالاکتامازها مانند بتالاکتامازهای ESBL متمایز می‌کند عبارت است از مقاومت آنها در برابر مهارکننده‌هایی مانند کلوالانات که ESBLها را مهار می‌کنند و ویژگی دوم توانایی آنها در هیدولیز کردن سفامایسین‌ها (Cephameycins). مطالعات نشان داده سفترولوزان-تازوباکتام نفوذپذیری غشای خارجی بهتر و پایداری بیشتری در برابر *ampC* بتالاکتاماز کروموزومی نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام دارد (۴)،

مقاوم به آنتی‌بیوتیک سفتولوزان-تازوباکتام در پیرمرد ۷۵ ساله‌ای مشاهده شد (۱۴). بررسی‌ها نشان داد یک تغییر کوچک ساختاری در ژن *ampC* سبب ایجاد مقاومت در باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک سفتولوزان-تازوباکتام گردیده است (۱۴).

با توجه به اهمیت ژن *ampC* در فرایند مقاومت باکتری *P. aeruginosa* به آنتی‌بیوتیک ترکیبی سفتولوزان-تازوباکتام در این مطالعه با بررسی پایگاه‌های اطلاعاتی ژنوم باکتریایی و بهره‌مندی از ابزارهای بیوانفورماتیکی جدید، شبکه هم‌بیانی ژن *ampC* بازسازی شده و فرایند بروز مقاومت مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است.

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه با استفاده از پایگاه داده Uniprot اطلاعات جامع در خصوص ژن *AmpC* به‌عنوان ژن کلیدی درگیر در فرایند سنتز آنزیم‌های بتالاکتاماز در باکتری *P. aeruginosa* جمع‌آوری شد (۱۵). بر اساس پارامترهای Text Co-Expression



شکل ۲- شبکه ژن‌های درگیر در فرایند سنتز آنزیم بتالاکتاماز در باکتری *P. aeruginosa* اندازه *node* بر اساس میزان *Betweenness Centrality* (اندازه کوچک برای مقادیر کمتر)، و رنگ *node* از آبی (*Closeness Centrality* پایین) تا قرمز (*Closeness Centrality* بالا) متغیر می‌باشد. 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

## نتایج

تعداد ۳۱ ژن در فرایند بتالاکتامازی در باکتری *P. aeruginosa* با ژن *ampC* همبستگی نشان دادند (شکل ۲). بر اساس آنالیزهای توپولوژی شبکه ژن *ampC* با ۱۶ ارتباط، *ampD* با ۱۵ ارتباط و *poxB* با ۱۴ ارتباط دارای بیشترین تعداد ارتباط با سایر ژن‌های شبکه هم‌بیانی بودند. همچنین در ادامه ژن‌های *ampR*، *nagZ*، *dacB* و *ppsA* هرکدام با ۱۲ ارتباط هم‌بیانی با سایر ژن‌ها در ردیف بعدی قرار گرفته‌اند.

از منظر مؤلفه *Centrality* - *Betweenness* ژن‌های *poxB* (0.386)، *ampC* (0.375)، *ampR* (0.162)، *nagZ* (0.097) و *lldD* (0.087) به‌ترتیب بالاترین مقادیر را دارا بودند. همچنین با توجه به میزان *Centrality* - *Closeness* به‌دست آمده، بیشترین مقادیر به‌ترتیب به ژن‌های *ampC* (0.681)، *ampR* (0.625)، *poxB* (0.612)، *lldD* (0.545) و *ampD* (0.535) اختصاص یافت (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج آنالیز توپولوژی شبکه ژن‌های درگیر در فرایند سنتز آنزیم بتالاکتاماز در باکتری *P. aeruginosa*. بر اساس نتایج به‌دست آمده در آنالیز شبکه، ژن *ampC* بالاترین ضریب تأثیر را در القای مقاومت دارا می‌باشد.

Gene Name	Number Of Directed Edges	Betweenness Centrality	Closeness Centrality
<i>ampC</i>	16	0.375413	0.681818
<i>ampD</i>	15	0.070241	0.535714
<i>poxB</i>	14	0.386918	0.612245
<i>ampR</i>	12	0.162529	0.625
<i>nagZ</i>	12	0.097531	0.508475
<i>dacB</i>	12	0.015402	0.508475
<i>ppsA</i>	12	0.017953	0.447761
<i>mpl</i>	11	0.030865	0.5
<i>aceE</i>	11	0.014559	0.441176
<i>ampG</i>	9	0.012397	0.483871
<i>lldD</i>	8	0.087356	0.545455
<i>ampDh2</i>	8	0.001149	0.47619
<i>ldhA</i>	8	0.003394	0.422535
<i>oprM</i>	7	0.003087	0.461538
<i>mexR</i>	7	0.003087	0.461538
<i>ackA</i>	7	0.002299	0.416667
<i>acsA1</i>	7	3.28E-04	0.416667
<i>acsA2</i>	7	3.28E-04	0.416667
<i>pauA</i>	7	3.28E-04	0.416667
<i>DR97_2331</i>	7	3.28E-04	0.416667
<i>MaeB</i>	7	0	0.416667
<i>ilvN</i>	7	0	0.416667
<i>lldA</i>	7	0	0.416667
<i>dacC</i>	6	0	0.461538
<i>pbpG</i>	6	0	0.461538
<i>mexT</i>	6	0.001861	0.454545
<i>AmpE</i>	6	0	0.454545
<i>mexE</i>	4	0	0.428571
<i>anmK</i>	4	0	0.37037
<i>amgK</i>	3	0	0.365854
<i>mtnP</i>	1	0	0.340909
<b>Average amounts</b>	<b>8.193548387</b>	<b>0.041527516</b>	<b>0.463967645</b>

تقسیم کرد. گروه ژن‌های اصلی بتالاکتامازی که عبارتند از (*ampG*, *mexR*, *oprM*, *ampC*, *ampR*, *nagZ*) و گروه دوم ژن‌های درگیر در متابولیسم پیرووات که ۱۲ ژن غیر از شش ژن فوق‌الذکر را شامل می‌شوند که عبارتند از (*ldhA*, *acsA1*, *ackA*, *ppsA*, *acsA2*, *lldD*, *DR97\_2331*, *aceE*, *MaeB*, *poxB*, *lldA*, *pauA*). به نظر می‌رسد ارتباط مستقیمی بین متابولیسم پیرووات و مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام وجود داشته باشد. هر چند در مطالعه‌ای که اثر آنتی‌بیوتیک کلروتراسایکلین بر روی تغییرات پروتئوم باکتری *Aeromonas hydrophila* صورت گرفته به نظر می‌رسد تحت تاثیر آنتی‌بیوتیک، بسیاری از مسیرهای متابولیسم متابولیکی مانند متابولیسم کربن، متابولیسم پیرووات و گلیکولیز/گلوکونئوژنز روند کاهشی دارند در حالی که مقاومت بتالاکتام، تخریب RNA و فرآیندهای بیوسنتز اسیدهای آمینه احتمالاً افزایش یابد (۲۳).

میزان بالای مقادیر به دست آمده *Betweenness Centrality* و *Closeness Centrality* برای یک ژن در آنالیز شبکه، بیانگر اهمیت بالای آن ژن در فرایند بیولوژیکی مربوطه و نقش کلیدی آن می‌باشد. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌گردد ژن *ampC* کلیدی‌ترین ژن موجود در شبکه می‌باشد.

شکل ۳ فرایندهای سلولی، عملکردهای مولکولی و مسیرهای بیولوژیکی معنادار که ژن‌های تشکیل‌دهنده شبکه مقاومت به آنتی‌بیوتیک سفنولوزان-تازوباکتام را در باکتری *P. aeruginosa* نشان می‌دهد. در فرایندهای سلولی مقاومت به آنتی‌بیوتیک خانواده بتالاکتام بالاترین سطح معنی‌داری و ضریب قدرت 1.65 را دارا بود (جدول ۲). این امر به روشنی نشان می‌دهد شبکه بازسازی شده به درستی مسیر مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌باشد. به‌طور کلی ژن‌های موجود در شبکه را به دو گروه اصلی می‌توان

جدول ۲- آنالیز آماری فرایندهای سلولی کلیدی در شبکه هم‌بیانی مقاومت به آنتی‌بیوتیک سفنولوزان-تازوباکتام در باکتری *P. aeruginosa*

Term ID	Term Description	observed gene count	Background gene count	Strength	p-value	Matching proteins in your network (labels)
paeb01501	beta-Lactam resistance	6	27	1.65	5.07E-07	<i>ampG</i> , <i>mexR</i> , <i>oprM</i> , <i>ampC</i> , <i>ampR</i> , <i>nagZ</i>
paeb00620	Pyruvate metabolism	12	61	1.6	3.12E-14	<i>ldhA</i> , <i>acsA1</i> , <i>ackA</i> , <i>ppsA</i> , <i>acsA2</i> , <i>lldD</i> , <i>DR97_2331</i> , <i>aceE</i> , <i>MaeB</i> , <i>poxB</i> , <i>lldA</i> , <i>pauA</i>
paeb00680	Methane metabolism	4	26	1.49	0.0002	<i>acsA1</i> , <i>ackA</i> , <i>ppsA</i> , <i>acsA2</i>
paeb00010	Glycolysis / Gluconeogenesis	6	40	1.48	2.73E-06	<i>acsA1</i> , <i>ppsA</i> , <i>acsA2</i> , <i>DR97_2331</i> , <i>aceE</i> , <i>pauA</i>
paeb00640	Propanoate metabolism	5	48	1.33	0.00012	<i>acsA1</i> , <i>ackA</i> , <i>acsA2</i> , <i>DR97_2331</i> , <i>pauA</i>
paeb01200	Carbon metabolism	6	123	1	0.00047	<i>acsA1</i> , <i>ackA</i> , <i>ppsA</i> , <i>acsA2</i> , <i>aceE</i> , <i>MaeB</i>
paeb01120	Microbial metabolism in diverse environments	9	274	0.82	0.00012	<i>ldhA</i> , <i>acsA1</i> , <i>ackA</i> , <i>ppsA</i> , <i>acsA2</i> , <i>DR97_2331</i> , <i>aceE</i> , <i>MaeB</i> , <i>pauA</i>
paeb01100	Metabolic pathways	17	968	0.55	1.49E-05	<i>ldhA</i> , <i>acsA1</i> , <i>ackA</i> , <i>ppsA</i> , <i>ilvN</i> , <i>acsA2</i> , <i>lldD</i> , <i>DR97_2331</i> , <i>aceE</i> , <i>MaeB</i> , <i>poxB</i> , <i>amgK</i> , <i>dacC</i> , <i>nagZ</i> , <i>mtnP</i> , <i>lldA</i> , <i>pauA</i>

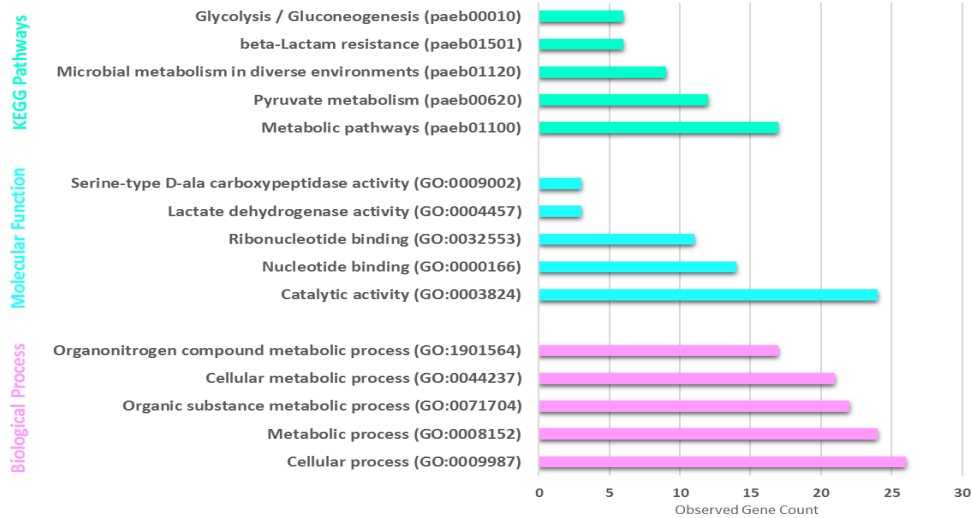
*carboxypeptidase activity* را در زمره عملکردهای مولکولی فعال نشان می‌دهد که بیانگر فعالیت‌های

شکل ۳- همچنین عملکردهای Lactate و D-ala dehydrogenase activity

## بازسازی شبکه هم‌بیانی ژن *ampC* به‌عنوان عامل اصلی مقاومت باکتری سودوموناس ...

سفتولوزان - تازوباکتام یک فرایند هوشمند باکتریایی و نیازمند تغییرات بیانی در مجموعه ای از ژن‌های کروموزومی می‌باشد.

آنزیم‌های بتالاکتامازی می‌باشد. همچنین میزان بالای عملکرد Nucleotide binding و Ribonucleotide binding این نکته را نشان می‌دهد که مکانیسم مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک



شکل ۳- نمودار بررسی ژن‌های درگیر در فرایند مقاومت باکتری *P. aeruginosa* به آنتی‌بیوتیک سفتولوزان-تازوباکتام

می‌باشد (۲۵). به‌طور معمول، پروتئین تنظیم کننده *ampR* بیان *ampC* را به سطوح بسیار پایین کاهش می‌دهد. مطالعات نشان داده برخی از اجزای محلول جدا شده از دیواره باکتریایی تحت عنوان موروپپتید Muropeptides ضمن تشکیل کمپلکسی با *ampR* افزایش یا کاهش بیان *ampC* را تنظیم می‌کنند (۲۶). ژن‌های *ampR* و *ampC* یک اپرون واگرا را با پروموترهای همپوشانی تشکیل می‌دهند و قطعه‌ای که در بین آنها قرار دارد به‌عنوان یک محل اتصال *ampR* عمل می‌کند (۲۷). برای درک دقیق مکانیسم عمل این دو ژن لازم است فرایند سنتز دیواره باکتریایی را مرور کنیم. در فرایند رشد باکتری، اندازه باکتری افزایش یافته و زیرواحدهای موروپپتید دیواره باکتریایی به مرور توسط آنزیم‌های هیدرولیتیک hydrolytic enzymes از هم جدا می‌شوند (۲۸). این موروپپتیدها به‌وسیله *ampG*-پرماز جهت بازیافت به سیتوپلاسم منتقل شده در

## بحث و نتیجه‌گیری

مکانیسم‌های القای مقاومت به آنتی‌بیوتیک به‌وسیله ژن *ampC* را می‌توان به سه گروه تقسیم کرد. گروه اول؛ مقاومت القایی از طریق بیان ژن‌های *ampC* کروموزومی (مانند *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa* و غیره)، گروه دوم؛ مقاومت کروموزومی غیر قابل القای ناشی از جهش‌های پروموتر و یا تضعیف کننده ( promoter and/or attenuator mutations) (مانند *Escherichia coli*, گونه‌های *Shigella* و *Acinetobacter baumannii*، گروه سوم؛ مقاومت با واسطه پلاسמיד (مانند *Escherichia coli*, گونه‌های *Shigella*, *Klebsiella pneumoniae* و غیره) (۲۴).

تولید بیش از حد *ampC* کروموزومی، مکانیسم اصلی ایجاد مقاومت به بتالاکتام در سودوموناس

به‌طور قابل توجهی با سایر آنزیم‌های شناخته شده متفاوت است (۳۶). مطالعات نشان داده ژن‌های *poxA* و *poxB* بر روی کروموزوم باکتری تنها ۴۹ باز با یکدیگر فاصله داشته و یک اپرون را تشکیل می‌دهند (۳۵). از آنجایی که *poxA* و *poxB* بخشی از یک اپرون واحد هستند، به‌طور بالقوه می‌توانند عملکردهای مرتبطی داشته باشند. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی نشان داده که توالی‌های نوکلئوتیدی تشکیل‌دهنده این اپرون در هیچ جای دیگری به جز *P. aeruginosa* یافت نمی‌شوند (۳۵). با این حال، از مطالعات بیانی، ما می‌دانیم که محصول *poxA* یک آنزیم بتالاکتاماز نیست همچنین در جهش یافته‌های فاقد ژن‌های *poxA* و *poxB* فرایند مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مختل نشد، اما در حضور این دو و فقدان فعالیت ژن *ampC* باکتری‌ها به شدت حساس به آنتی‌بیوتیک بودند (۳۵). این نشان می‌دهد ژن اصلی مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک سفتولوزان-تازوباکتام *ampC* می‌باشد.

بروز کلی عفونت‌های *P. aeruginosa* در بیمارستان‌های دنیا و مشاهده مقاومت اکتسابی سویه‌های مختلف در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها زنگ خطر است که سازمان بهداشت جهانی را بر آن داشته تا آن را به‌عنوان یک پاتوژن الویت‌دار در نظر گیرد و امروزه نیازمند راه‌حل‌های درمانی جدید در برابر آن هستیم. سفتولوزان-تازوباکتام (C/T) به نظر می‌رسد یک گزینه ارزشمند برای درمان بیماران شدیداً آلوده به *P. aeruginosa* مقاوم به چند دارو باشد. ژن *ampC* یکی از ژن‌های اصلی سنتز بتالاکتاماز می‌باشد. مطالعات نشان داده سفتولوزان-تازوباکتام نفوذپذیری غشای خارجی بهتر و پایداری بیشتری در برابر *ampC* بتالاکتاماز کروموزومی نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام دارد. با توجه به اهمیت ژن *ampC* در فرایند مقاومت باکتری *P. aeruginosa* به آنتی‌بیوتیک ترکیبی

سیتوزول به‌وسیله *NagZ* زیرواحدهای N-آستیل-گلوکزآمین و در ادامه به‌وسیله آنزیم *ampD*-آمیداز ساقه پپتیدی آن جدا می‌شود (۲۸، ۲۹). منوساکاریدهای باقیمانده و پپتیدهای به‌دست آمده مجدداً در فرایند سنتز دیواره جدید باکتریایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این زیرواحدها که به اختصار UDP-NAM-P5 (Uridine 5'-pyrophosphoryl-) نامیده می‌شوند در شرایط نرمال به *ampR* متصل شده و کمپلس حاصل بیان *ampC* را سرکوب می‌کند (۲۹). اما وقتی باکتری در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام نظیر سفتولوزان-تازوباکتام قرار می‌گیرد، پروتئین‌های متصل شونده به پنی‌سیلین (Penicillin Binding Protein) PBP سبب افزایش اتولیز پپتیدوگلیکان‌ها و در نتیجه افزایش ناگهانی میزان موروپپتیدها در سیتوزول می‌گردند (۳۰). این امر سبب می‌شود میزان موروپپتیدها از ظرفیت فعالیت آنزیم‌های *NagZ* و *ampD* فراتر رفته موروپپتیدهای آزاد جایگزین زیرواحدهای UDP-NAM-P5 بر روی پروتئین‌های *ampR* گردند. نهایتاً کمپلکس جدید موروپپتید-*ampR* افزایش بیان آنزیم بتالاکتامازی *ampC* را تحریک می‌کند (۳۳-۳۱). علاوه بر این فرایند برای القای مقاومت به آنتی‌بیوتیک، جهش در ژن *ampD* و کاهش فعالیت آن منجر به افزایش بیان دائمی در ژن *ampC* می‌گردد که مکرراً در باکتری سودوموناس گزارش شده است (۳۴).

*poxB* متعلق به کلاس D بتالاکتامازها است و به دلیل توانایی برخی از اعضای این کلاس در تجزیه ایزوکسازولیل پنی‌سیلین‌ها (Isoxazolyl penicillins)، مانع از گزاسیلین (Oxacillin) و متی‌سیلین (Methicillin)، از گزاسیلیناز (Oxacillinase) نیز نامیده می‌شوند (۳۵). به نظر می‌رسد *poxB* نوع جدیدی از گزاسیلیناز است که



داشته باشد. بررسی‌ها نشان داد ژن اصلی مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک سفتولوزان-تازوباکتام ampC می‌باشد. علیرغم اینکه مطالعات نشان داده دو ژن *poxB* و *poxA* تأثیر قابل توجهی در مقاومت باکتری *P. aeruginosa* ندارند. اهمیت این دو ژن در شبکه بازسازی شده تأکید می‌کند که مطالعات بیشتری بر روی آنها صورت گیرد.

#### سپاسگزاری

ضمن قدردانی از همکاران حوزه معاونت محترم پژوهشی پژوهشگاه زابل اعلام می‌گردد این تحقیق با حمایت مالی پژوهشگاه زابل انجام شده است.

#### References

- 1- Tang Y-W, Sussman M, Liu D, Poxton IR, Schwartzman JD. Chapter 1- Molecular Medical Microbiology – The Expanding Concept. In: Tang Y-W, Sussman M, Liu D, Poxton I, Schwartzman J, editors. *Molecular Medical Microbiology* (Second Edition). Boston: Academic Press. 2015: 1-4.
- 2- Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017;7.
- 3- Jones P, Palser S, Prave A, Hurley M, Smyth A. WS20. 1 Secular trends in *Pseudomonas aeruginosa* acquisition in the United Kingdom: a registry study. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2016;1(15): S31.
- 4- van Duin D, Bonomo RA. Ceftazidime /Avibactam and Ceftolozane/Tazobactam: Second-generation  $\beta$ -Lactam/ $\beta$ -Lactamase Inhibitor Combinations. *Clin Infect Dis*. 2016; 63(2): 234-41.
- 5- Gallagher JC, Satlin MJ, Elabor A, Saraiya N, McCreary EK, Molnar E, et al. Ceftolozane-Tazobactam for the Treatment of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections: A Multicenter Study. *Open Forum Infect Dis*. 2018; 5(11): 280.
- 6- Kong K-F, Jayawardena SR, del Puerto A, Wiehlmann L, Laabs U, Tümmeler B, et al. Characterization of *poxB*, a chromosomal-encoded *Pseudomonas aeruginosa* oxacillinase. *Gene*. 2005; 358: 82-92.
- 7- Tawfik AF, Shibl AM, Aljohi MA, Altammami MA, Al-Agamy MH. Distribution of

سفتولوزان-تازوباکتام شبکه هم‌بیانی ژن ampC بازسازی شده و فرایند بروز مقاومت مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تعداد ۳۱ ژن در فرایند بتالاکتامازی در باکتری *P. aeruginosa* با ژن ampC همبستگی نشان دادند. آنالیزهای توپولوژی شبکه نشان داد به‌ترتیب پنج ژن *ampC*، *ampD*، *ampR*، *poxB* و *nagZ* بالاترین اهمیت را در شبکه دارا می‌باشند. بر اساس آنالیز آماری فرایندهای سلولی معنادار در میان ژن‌های مورد مطالعه، به نظر می‌رسد ارتباط مستقیمی بین متابولیسم پیرووات و مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام وجود

Ambler class A, B and D  $\beta$ -lactamases among *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Burns*. 2012; 38(6): 855-60.

8- Ortiz de la Rosa JM, Nordmann P, Poirel L. ESBLs and resistance to ceftazidime/avibactam and ceftolozane/tazobactam combinations in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 2019; 74(7): 1934-9.

9- Shiri Y, Karimiyan Ma. Reconstitution of Gene Network on Penicillin Resistance in *E. coli* Using Databases Information. *New Findings in Veterinary Microbiology*. 2020; 2(2): 1-9.

10- Patterson J, Tsilimigras M, Livesay D, Jacobs D. Evolution of Stability/Flexibility Relationships in Beta-Lactamase. *Biophysical Journal*. 2019; 116: 472.

11- Subedi D, Vijay AK, Willcox M. Overview of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an ocular perspective. *Clin Exp Optom*. 2018; 101(2): 162-71.

12- Shortridge D, Castanheira M, Pfaller MA, Flamm RK. Ceftolozane-Tazobactam Activity against *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from U.S. Hospitals: Report from the PACTS Antimicrobial Surveillance Program, 2012 to 2015. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61(7).

13- Cabot G, Bruchmann S, Mulet X, Zamorano L, Moyà B, Juan C, et al. *Pseudomonas aeruginosa* ceftolozane-tazobactam resistance development requires multiple mutations leading to overexpression and structural modification of AmpC. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(6):

3091-9.

14- MacVane SH, Pandey R, Steed LL, Kreiswirth BN, Chen L. Emergence of Ceftolozane-Tazobactam-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* during Treatment Is Mediated by a Single AmpC Structural Mutation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(12).

15- 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): 115-9.

16- 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.

17- 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.

18- Assenov Y, Ramirez F, Schelhorn SE, Lengauer T, Albrecht M. Computing topological parameters of biological networks. *Bioinformatics.* 2008; 24(2): 282-4.

19- 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.

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

21- 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.

22- 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.

23- Li W, Yao Z, Zhang X, Huang F, Lin W, Lin X. Global protein expression profile response of planktonic *Aeromonas hydrophila* exposed to chlortetracycline. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2017; 33(4): 68.

24- Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22(1): 161-82, Table of Contents.

25- Torrens G, Hernández SB, Ayala JA, Moya B, Juan C, Cava F, et al. Regulation of AmpC-Driven  $\beta$ -Lactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Different Pathways, Different Signaling. *mSystems.* 2019; 4(6).

26- Irazoki O, Hernandez SB, Cava F. Peptidoglycan Muropeptides: Release, Perception, and Functions as Signaling Molecules. *Frontiers in Microbiology.* 2019; 10.

27- Juan C, Torrens G, González-Nicolau M, Oliver A. Diversity and regulation of intrinsic  $\beta$ -lactamases from non-fermenting and other Gram-negative opportunistic pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* 2017; 41(6): 781-815.

28- Vermassen A, Leroy S, Talon R, Provot C, Popowska M, Desvaux M. Cell Wall Hydrolases in Bacteria: Insight on the Diversity of Cell Wall Amidases, Glycosidases and Peptidases Toward Peptidoglycan. *Front Microbiol.* 2019; 10: 331.

29- Zamorano L, Reeve TM, Deng L, Juan C, Moyá B, Cabot G, et al. NagZ inactivation prevents and reverts beta-lactam resistance, driven by AmpD and PBP 4 mutations, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(9): 3557-63.

30- Lee M, Heseck D, Blázquez B, Lastochkin E, Boggess B, Fisher JF, et al. Catalytic spectrum of the penicillin-binding protein 4 of *Pseudomonas aeruginosa*, a nexus for the induction of  $\beta$ -lactam antibiotic resistance. *J Am Chem Soc.* 2015; 137(1): 190-200.

31- Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22(4): 582-610.

32- Dik DA, Fisher JF, Mobashery S. Cell-Wall Recycling of the Gram-Negative Bacteria and the Nexus to Antibiotic Resistance. *Chem Rev.* 2018; 118(12): 5952-84.

33- Fisher JF, Mobashery S. The sentinel role of peptidoglycan recycling in the  $\beta$ -lactam resistance of the Gram-negative Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorg Chem.* 2014; 56: 41-8.

34- López-Causapé C, Cabot G, Del Barrio-Tofiño E, Oliver A. The Versatile Mutational Resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.* 2018; 9: 685.

35- Zincke D, Balasubramanian D, Silver LL, Mathee K. Characterization of a Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme, PoxB, in *Pseudomonas*

aeruginosa PAO1. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60(2): 936-45.

**36- Schneider I, Queenan AM, Bauernfeind A.** Novel carbapenem-hydrolyzing oxacillinase

OXA-62 from *Pandoraea pnomenusa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(4): 1330-5.

# Reconstruction of co-expression network of *ampC* gene as the main factor of *Pseudomonas aeruginosa* resistance to the new antibiotic Ceftolozane/Tazobactam

Yasoub Shiri\*<sup>1</sup>, Zeynab Mohkami<sup>1</sup>, Fatemeh Bidarnamani<sup>1</sup>

1- Assistant Professor of Agronomy and Plant Breeding Department, Agriculture Research Center, Zabol Research Institute, Zabol, Iran.

Receive: July 8, 2022; Revise: July 20, 2022; Accept: July 23, 2022

## Summary

*Pseudomonas aeruginosa* is a Rod-shaped Gram-negative and strict aerobic bacterium that can cause infection in the urinary system, respiratory system, middle membrane of the skin, soft tissues, bacteremia, etc. Ceftolozan-tazobactam (C/T) is an effective antibiotic in controlling of this bacterium. But, recently, reports of the emergence of resistant strains have created a serious challenge in the fight against infections caused by *P. aeruginosa*. *AmpC* is one of the main genes for  $\beta$ -lactamase synthesis. Studies have shown that Ceftolozane-tazobactam has better outer membrane permeability and improved stability against chromosomal *ampC*  $\beta$ -lactamase than do other  $\beta$ -lactam antibiotics. Considering the importance of *ampC* in the process of *P. aeruginosa* resistance to the Ceftolozane-tazobactam antibiotic, the co-expression network of *ampC* was reconstructed and the resistance emerging process was analyzed. 31 genes in the beta-lactamase process in *P. aeruginosa* showed correlation with *ampC*. Network topology analysis showed that five genes *ampC*, *ampD*, *poxB*, *ampR* and *nagZ* have the highest importance in the network. *AmpC* gene had the highest number of direct connections with other genes in the network with 16 connections. Eight pathways had the highest number of representatives among genes. Based on the statistical analysis of the significant pathways among the studied genes, it seems there is a direct relationship between pyruvate metabolism and resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. Results showed *ampC* is the main gene for resistance to Ceftolozane-tazobactam. Although studies have shown that *poxA* and *poxB* genes do not have a significant effect on *P. aeruginosa* resistance to the antibiotics, the importance of these two genes in the reconstructed network emphasizes that more studies should be conducted on them.

**Key words:** gene network, gene ontology, prokaryote, beta-lactamase