



دوره ۷، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۳، صفحات ۸۶-۹۶

بررسی شبکه هم‌بیانی *eptA* ژن مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک کولیستین (*Colistin*) در باکتری *Escherichia coli*

یعثوب شیری^{۱*}، سمیرا سعادت‌جو^۲، زینب محکمی^۳

۱- گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

۲- دانش‌آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، کلینسین دامپزشکی در زابل، زابل، ایران.

۳- گروه زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، پژوهشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۱۵ آبان ۱۴۰۲، بازنگری: ۱۴ آذر ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۱۵ آذر ۱۴۰۲

 10.22034/nfvm.2024.424139.1210

چکیده

کولیستین (پلی‌میکسین E) یک آنتی‌بیوتیک پلی‌میکسین (polymyxin) است. پلی‌میکسین به‌طور فزاینده‌ای به‌عنوان آخرین راه‌حل آنتی‌بیوتیک برای درمان باکتری‌های گرم‌منفی مقاوم به دارو استفاده می‌شود. کولیستین غشای خارجی باکتری را نفوذپذیر می‌کند و یکپارچگی غشای داخلی را مختل می‌کند و در نهایت باعث مرگ سلولی می‌شود. لیپید A لیپوپلی‌ساکارید یک جزء اصلی از لایه بیرونی غشای خارجی اکثر باکتری‌های گرم‌منفی می‌باشد که برخی از باکتری‌ها با ایجاد تغییرات در ساختار آن سبب القای مقاومت به کولیستین می‌شوند. لیپید A فسفاتانولامین ترانسفراز (*EptA*) آنزیمی است که مسئول اصلاح لیپید A در باکتری *E. Coli* می‌باشد. به‌منظور بررسی فرایند ژن‌های درگیر در مقاومت به کولیستین شبکه هم‌بیانی متشکل از ۲۹ ژن بازسازی شد. آنالیز ژن آنولوژی نشان داد مسیرهای سنتز لیپیدهای درگیر در ساختار غشای باکتریایی از قبیل بیوسنتز لیپوساکاریدها، بیوسنتز گلیکولیپیدها و بیوسنتز فسفولیپیدها بالاترین تعداد نماینده را در بین ژن‌های موجود در شبکه دارند. آنالیز توپولوژی شبکه نشان داد ژن *pagP* با ۲۷ ارتباط مستقیم با سایر ژن‌های موجود در شبکه بالاترین تعداد ارتباط را دارا بود. در ادامه ژن‌های *eptB*، *arnT*، *basS* و *phoP* هر کدام با ۲۶ ارتباط در ردیف بعدی قرار داشتند. همچنین ژن‌های *pagP* به‌ترتیب با مقادیر (0.03527178) و (1) بالاترین میزان Betweenness Centrality و Closeness Centrality را نشان داد. همچنین ژن *eptB* از منظر مولفه‌ی Betweenness Centrality و Closeness Centrality با مقادیر (0.96428571) و (0.03332764) دومین ژن کلیدی در این شبکه می‌باشد. دسته‌بندی ژن‌های موجود در شبکه نشان داد از دوازده گروه متمایز شده، ژن *eptB* در ۸ دسته و ژن *pagP* تنها در دو دسته مشاهده می‌شود. این نشان می‌دهد که ژن *eptB* در کنار ژن *eptA* نقش کلیدی در القای مقاومت کولیستین دارد.

واژگان کلیدی: لیپوپلی‌ساکارید، آنتی‌بیوتیک، پلی‌میکسین، شبکه ژنی

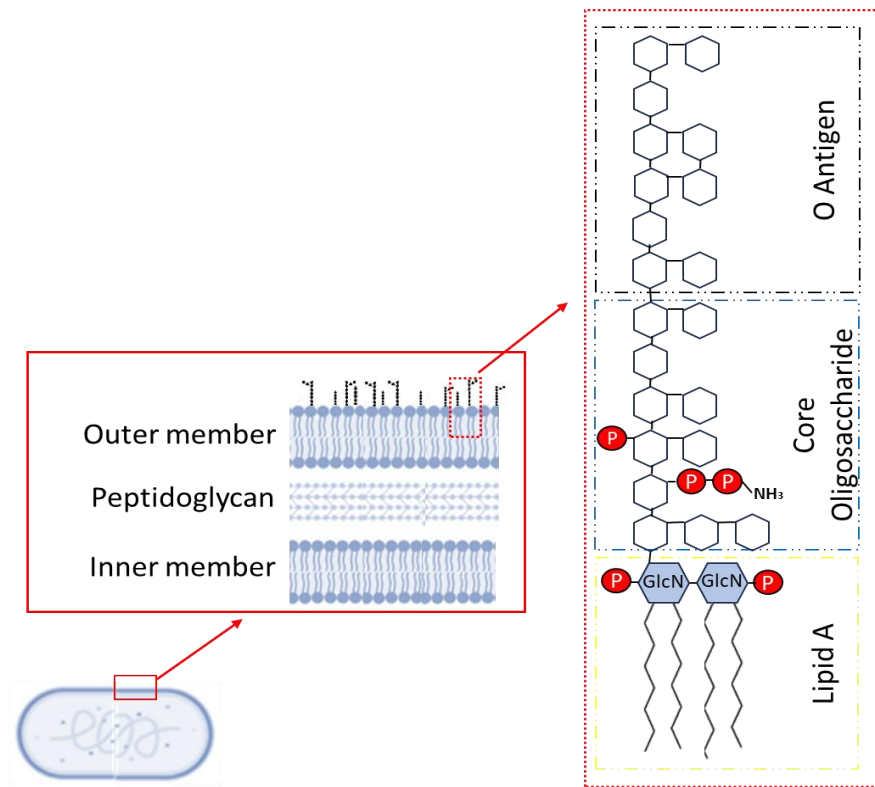
مقدمه

کولیستین (پلی میکسین E) یک آنتی بیوتیک پلی میکسین (polymyxin) است که توسط باکتری خاک *Bacillus polymyxa* تولید می شود (۱). این دارو برای درمان عفونت های حاد و مزمن ناشی از سویه های حساس باکتری های گرم منفی از جمله بیشتر گونه های خانواده انتروباکتریاسه (*Enterobacteriaceae*) تأیید شده است (۲). لیپید A لیپوپولی ساکاریدها (lipopolysaccharides - LPS) یک جزء اصلی از لایه بیرونی غشای خارجی اکثر باکتری های گرم منفی را تشکیل می دهد که به عنوان یک سد محافظ در برابر آنتی بیوتیک ها و استرس های محیطی عمل می کند (۳). LPS از سه جزء تشکیل شده است که شامل یک بخش لیپید A، یک هسته الیگوساکارید و یک گروه آنتی ژن O می باشد (شکل ۱). کولیستین با لیپید A روی غشای خارجی باکتری های گرم منفی برهمکنش می کند و پل های کلسیم و منیزیم را که LPS را تثبیت می کنند جابجا می کند. متعاقباً، کولیستین غشای خارجی باکتری را نفوذپذیر می کند و یکپارچگی غشای داخلی را مختل می کند و در نهایت باعث مرگ سلولی می شود (۴). برخی از پاتوژن های گرم منفی، آنزیم هایی ایجاد کرده اند که برای اصلاح ساختار غشایی و ویژگی های بیوشیمیایی خود عمل می کنند و در نتیجه از عمل آنتی بیوتیک های هدایت شده به غشاء جلوگیری می کنند. یک مثال اصلاح قسمت لیپید A در ساختار LPS/LOS است. ادغام ۴-آمینو-۴-دئوکسی-L-آرابینوز (L-Ara4N) و فسفاتانول آمین (pEtN) به بخش لیپیدی A باعث کاهش حساسیت باکتری های گرم منفی به پپتیدهای ضد میکروبی کاتیونی (CAMP) نظیر کولیستین می شود (۵). افزودن L-Ara4N و pEtN به گروه های فسفات لیپید A با بار منفی، برهمکنش الکترواستاتیکی آن را با

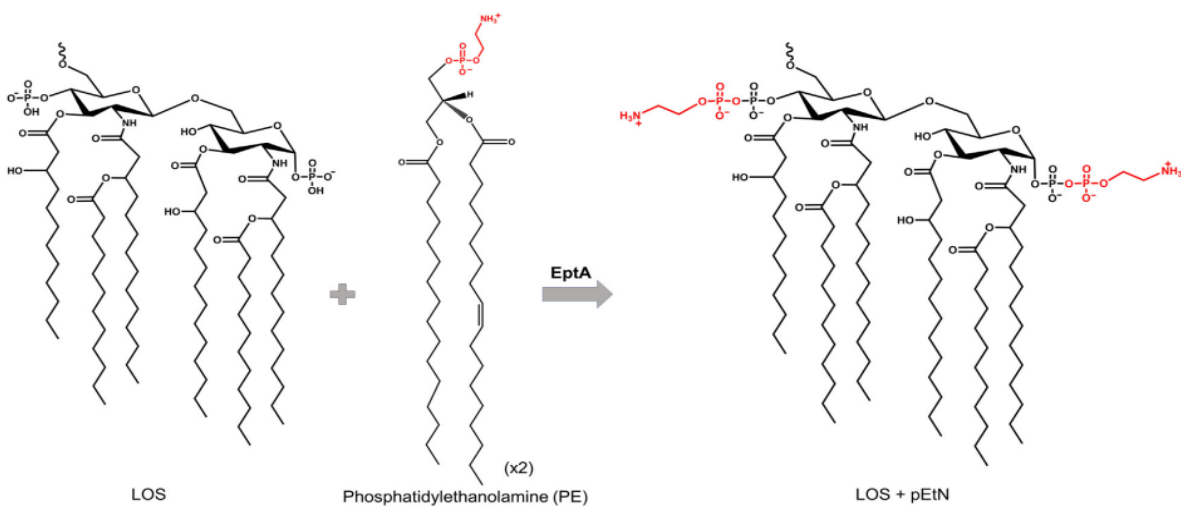
دیامینوبوتیریک اسید (Dab) پلی میکسین با بار مثبت را کاهش می دهد (۶). این برهمکنش کاهش یافته از اختلال غشاء جلوگیری می کند، بنابراین لیز باکتریایی رخ نمی دهد (۷، ۸).

از آنجایی که پلی میکسین به طور فزاینده ای به عنوان آخرین راه حل آنتی بیوتیک برای درمان باکتری های گرم منفی مقاوم به دارو استفاده می شود، این مکانیسم مقاومتی یک مشکل بهداشتی جهانی مهم ایجاد می کند (۹). در یک تحقیق اثر کولیستین را بر روی غشای خارجی نوع وحشی کلبسیلا پنومونیه (*Klebsiella pneumoniae*) با استفاده از میکروسکوپ کرایو الکترونی (cryo-EM) بررسی کردند. سلول ها پس از ۲ ساعت قرار گرفتن در معرض کولیستین، آسیب های غشایی قابل توجهی از جمله پارگی غشای خارجی، ناپیوستگی پپتیدوگلیکان و حباب های غشایی را نشان دادند (۱۰). به دلیل ماهیت غیر اختصاصی برهمکنش های پلی میکسین با غشاهای پلی میکسین ها مشتاقانه به غشای مرزی سلول های کلیه متصل می شوند که منجر به سمیت کلیوی نامطلوب آن می شود. بنابراین، تلاش هایی برای افزودن آنتی اکسیدان ها به مولکول های پپتید با هدف سرکوب آسیب غشایی ناشی از پلی میکسین انجام شده است (۱۱).

لیپید A فسفاتانول آمین ترانسفراز (*epta*) آنزیمی است که مسئول اصلاح لیپید A با pEtN است (شکل ۲). مطالعات نشان داده در فقدان فعالیت *epta*، حساسیت باکتری به کولیستین بیش از ۱۰۰ برابر افزایش یافته است. بی تردید فرایندهای درمانی طراحی شده برای مهار فعالیت *epta* می توانند برای افزایش کارایی آنتی بیوتیک کولیستین و حمایت از پاکسازی عفونت توسط سیستم ایمنی استفاده شوند (۱۲).



شکل ۱- ساختار مولکولی لیپوپلی ساکارید لایه بیرونی غشای خارجی اکثر باکتری‌های گرم‌مثبت



شکل ۲- افزودن pEtN به گروه‌های فسفات لیپید A به وسیله آنزیم لیپید A فسفات‌انولامین ترانسفراز (eptA) سبب مقاومت باکتری به آنتی‌بیوتیک کولیستین می‌گردد.

کولیستین با خطر اجتناب ناپذیر ظهور سویه‌های مقاوم باکتری شده است. در برخی از کشورها به‌طور فعال از کولیستین در درمان بیماری‌های دام استفاده می‌گردد. همین امر موجب افزایش سرعت ظهور سویه‌های مقاوم شده است (۵).

امروزه، برای عفونت‌های جدی ناشی از انتروباکتریاسه تولیدکننده کارباپنماز (carbapenemase)، گزینه‌های درمانی محدود هستند و همیشه به کولیستین تکیه می‌کنند (۱۳). افزایش جهانی انتروباکتریاسه‌های تولیدکننده کارباپنماز منجر به افزایش استفاده از

پارامترهای Text mining Co-Expression و Experiments میزان همبستگی بیانی ژن *eptA* با سایر ژن‌ها در پایگاه STRING-db مشخص شد (۱۵). جهت بازسازی شبکه هم‌بیانی و آنالیزهای توپولوژی شبکه بر اساس مؤلفه‌های Betweenness Centrality و Closeness Centrality به ترتیب از نرم‌افزار Cytoscape (۱۶) و پلاگین NetworkAnalyzer (۱۷) استفاده شد. 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 node به سایر nodeها. به عبارت ساده‌تر میزان بالای Closeness Centrality و Betweenness Centrality برای یک node نشان دهنده اهمیت بالای آن node در شبکه می‌باشد (۱۸-۲۳). آنالیزهای آنتولوژی ژن‌های موجود در شبکه با استفاده از نرم‌افزار تحت وب DAVID انجام شد (۲۴). سپس برای تک تک ژن‌ها Benjamini P-value محاسبه شدند (۲۵).

نتایج

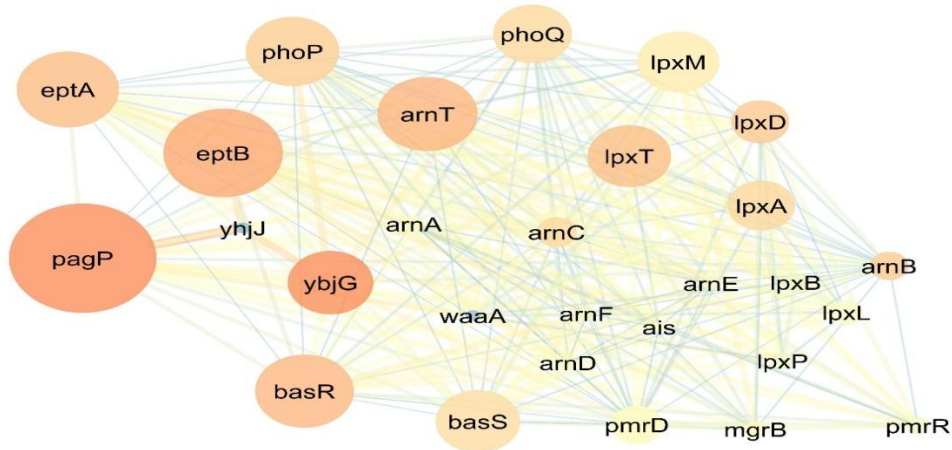
با بررسی مقالات و اطلاعات موجود در پایگاه Uniprot مشخص شد ژن *eptA* همبستگی بالایی با ژن‌های *eptB*، *phoP* و *phoQ* دارد. با وارد کردن این سه ژن به پایگاه داده STRING-db شبکه هم‌بیانی اولیه بر مبنای پارامترهای Co-occurrence، Co-expression و Experiments بازسازی شد. در ادامه با دو مرتبه اضافه کردن ژن‌های پیشنهاد شده پایگاه داده STRING-db نهایتاً شبکه هم‌بیانی متشکل از ۲۹ node به دست آمد (شکل ۳).

توسعه عوامل ضد ویروسی جدید است که اصلاح لیپید A توسط *eptA* را مهار می‌کند یکی از راه‌های اصلی برای مقابله با ظهور مقاومت باکتریایی به آنتی‌بیوتیک کولیسیتین می‌باشد. امیدواریم که مهار *eptA* کارایی پلی‌میکسین را بازیابی کند، از پاکسازی عفونت توسط سیستم ایمنی حمایت کند و تکثیر مقاومت به پلی‌میکسین را به حداقل برساند. مطالعات نشان می‌دهد که *eptA* ممکن است یک هدف عالی برای توسعه دارو برای مبارزه با مقاومت باکتریایی به کولیسیتین باشد. در حالی که پیشتر این کار برای آنزیم Neisseria انجام شده است، تحقیقات بیشتری برای سایر باکتری‌های گرم منفی بیماری‌زا مورد نیاز است. درک بهتر مکانیسم کاتالیزوری *eptA* از جمله دخالت یون‌های فلزی محل فعال و حالت‌های ساختاری آنزیمی مختلف، اطلاعات بیوشیمیایی مهمی را برای کمک به توسعه بیشتر بازدارنده فراهم می‌کند (۲).

با اذعان به اهمیت *eptA* در مکانیسم‌های مقاومت به کولیسیتین و پتانسیل آن برای توسعه دارو، درک جامع از جنبه‌های عملکردی *eptA*، در این مطالعه با بررسی پایگاه‌های اطلاعاتی ژنوم باکتریایی و بهره‌مندی از ابزارهای بیوانفورماتیکی جدید، بازسازی شبکه هم‌بیانی ژن‌های درگیر در فرایند القای مقاومت به واسطه آنزیم لیپید A فسفاتانولامین ترانسفراز، صورت گرفت تا یک دید جامع از ژن‌های کلیدی این مکانیسم ارائه گردد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه با استفاده از پایگاه داده Uniprot اطلاعات جامع در خصوص ژن *eptA* به‌عنوان ژن کلیدی درگیر در فرایند مقاومت باکتری *Escherichia coli* به آنتی‌بیوتیک کولیسیتین جمع‌آوری شد (۱۴). بر اساس



شکل ۳- شبکه هم‌بیانی ژن *eptA* عامل مقاومت پلاسمیدی باکتری *E. Coli* در برابر آنتی‌بیوتیک کولیستین. اندازه *node* بر اساس میزان *Betweenness Centrality* (اندازه کوچک برای مقادیر کمتر)، و رنگ *node* هرچه به قرمز نزدیکتر باشد بیانگر *Closeness Centrality* بالا 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

هرچه به یک نزدیک‌تر باشد بیانگر اهمیت ژن هدف در شبکه می‌باشد، در مورد ژن *pagP* بالاترین مقدار ممکن یعنی یک را نشان داد. همچنین ژن *eptB* از منظر *Betweenness* و *Closeness Centrality* مولفه‌ی *Centrality* با مقادیر (0.96428571) و (0.03332764) دومین ژن کلیدی در این شبکه می‌باشد. جدول (۱) اطلاعات کامل آنالیز توپولوژی شبکه برای تمامی ژن‌های موجود در شبکه را آورده است.

آنالیز توپولوژی شبکه نشان داد ژن *pagP* با ۲۷ ارتباط مستقیم با سایر ژن‌های موجود در شبکه بالاترین تعداد ارتباط را دارا بود. در ادامه ژن‌های *arnT*، *eptB*، *basS* و *phoP* هر کدام با ۲۶ ارتباط در ردیف بعدی قرار داشتند. همچنین ژن *pagP* از نظر پارامتر *Betweenness Centrality* که یک فاکتور مهم در آنالیز توپولوژی شبکه می‌باشد نسبت به سایر ژن‌ها بالاترین میزان *Closeness* (0.03527178) را نشان داد. پارامتر *Centrality* که در دامنه صفر تا یک متغیر می‌باشد و

جدول ۱- نتایج آنالیز توپولوژی شبکه ژن‌های درگیر در فرایند مقاومت پلاسمیدی در برابر آنتی‌بیوتیک کولیستین در باکتری *E. coli*

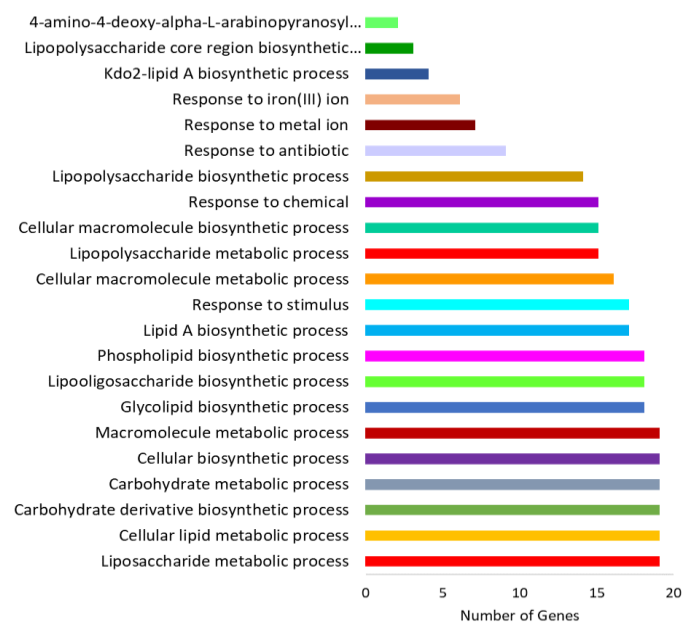
Gene Name	Edge Count	Betweenness Centrality	Closeness Centrality
<i>pagP</i>	27	0.03527178	1
<i>eptB</i>	26	0.03332764	0.96428571
<i>arnT</i>	26	0.01884253	0.96428571
<i>basS</i>	26	0.01884253	0.96428571
<i>phoP</i>	26	0.01884253	0.96428571
<i>phoQ</i>	26	0.01884253	0.96428571
<i>basR</i>	25	0.01467781	0.93103448
<i>eptA</i>	25	0.01467781	0.93103448
<i>lpxM</i>	24	0.01296992	0.9
<i>arnB</i>	24	0.01202343	0.9

<i>lpxT</i>	22	0.01994713	0.84375
<i>pmrD</i>	22	0.00765449	0.84375
<i>arnC</i>	22	0.00734555	0.84375
<i>lpxA</i>	21	0.00590315	0.81818182
<i>lpxD</i>	21	0.00590315	0.81818182
<i>arnA</i>	19	0.01468446	0.77142857
<i>pmrR</i>	18	0.00340865	0.75
<i>ais</i>	17	0.00209116	0.72972973
<i>lpxB</i>	17	0.00130658	0.72972973
<i>lpxL</i>	17	0.00130658	0.72972973
<i>lpxP</i>	16	0.00110431	0.71052632
<i>mgrB</i>	16	5.32E-04	0.71052632
<i>arnD</i>	16	3.18E-04	0.71052632
<i>arnE</i>	16	3.18E-04	0.71052632
<i>arnF</i>	16	3.18E-04	0.71052632
<i>ybjG</i>	13	0.00527066	0.65853659
<i>waaA</i>	13	0	0.65853659
<i>yhjJ</i>	5	6.25E-04	0.55102041

بیوسنتز گلیکولیپیدها و بیوسنتز فسفولیپیدها بالاترین فعالیت را داشتند (شکل ۴).

مسیرهای بیولوژیکی فعال در فرایند القای مقاومت به کولیستین نشان داد مسیرهای سنتز لیپیدهای درگیر در ساختار غشای باکتریایی از قبیل بیوسنتز لیپوساکاریدها،

eptA Co-expression network biological process



شکل ۴- آنالیز مسیرهای بیولوژیکی فعال در فرایند القای مقاومت به کولیستین در باکتری *E. coli*

بحث و نتیجه‌گیری

همان‌طور که در شکل (۳) مشاهده می‌گردد ژن *pagP* بر اساس آنالیز توپولوژی شبکه نقش کلیدی در تغییر ساختار لیپوپلی‌ساکارید در غشای خارجی باکتری‌های گرم‌منفی ایفا می‌کند. *eptA* (که قبلاً *lptA* نامیده می‌شد) اولین بار در *N. meningitidis* به‌عنوان ژنی که یک ترانسفراز pEtN خاص برای لیپید A را کد می‌کند گزارش شد (۲۶). بیان *eptA* توسط سیستم‌های دو جزئی که شامل *pmrA/pmrB* و *phoP/phoQ* هستند، القا یا سرکوب می‌شود (۲۷). *pmrA/pmrB* تنظیم‌کننده اصلی بیان ژن‌هایی است که در اصلاح LPS در گونه‌های مختلف باکتری (مانند *E. coli*، *V. cholerae*، *H. pylori*، *S. Typhimurium*، *S. flexneri* و *N. gonorrhoeae*) نقش دارند (۲۷). سیستم تنظیمی *pmrA/pmrB* از یک تنظیم‌کننده پاسخ سیتوپلاسمی (*pmrA*) و یک حس‌گر کیناز متصل به غشاء (*pmrB*) تشکیل شده است (۲۷). سیستم *phoP/phoQ* از *phoQ* یک حس‌گر کیناز متصل به غشاء، و *phoP* یک تنظیم‌کننده رونویسی مبتنی بر سیتوپلاسم تشکیل شده است (۲۸). مطالعات اخیر نشان داده است که ادغام پالمیتات در لیپید A باکتری *S. typhimurium* به ژن *pagP* فعال شده با *phoP/phoQ* بستگی دارد (۲۹). تغییرات لیپید A با L-Ara4N، pEtN و یا پالمیتات در *E. coli* تنها زمانی دیده می‌شود که سلول‌ها با متاوانادات آمونیوم تیمار می‌شوند و یا در جهش یافته‌های مقاوم به کولیستین مشاهده می‌شود. همبستگی بالای بیان *pagP* و *eptA* دلیلش می‌تواند فعال شدن هر دو ژن تغییر دهنده لیپید A با سیستم *phoP/phoQ* باشد (۳۰).

لیپید A در باکتری‌های گرم‌منفی از تنوع ساختاری زیادی برخوردار است. تاکنون نزدیک ۳۰ نوع آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتزی لیپید A در باکتری‌های مختلف نشان داده شده است (۳۱). *pagP* در یک زیر گروه از ارگانسیم‌های گرم‌منفی عمدتاً بیماری‌زا توزیع

می‌شود. مهارکننده‌های مؤثر *pagP* ممکن است در درمان بیماری‌های عفونی با حساس کردن باکتری‌های گرم‌منفی بیماری‌زا به پاسخ ایمنی ذاتی ارزش داشته باشند. اگرچه چنین مهارکننده‌هایی احتمالاً در درمان عفونت‌های حاد مفید نیستند، اما ممکن است در کنترل شدت آن مفید باشند (۳۲).

ژن *eptB* افزودن یک بخش فسفاتانول آمین (pEtN) را به اسید ۳-دئوکسی-D-ماننو-اکتولوزونیک خارجی (Kdo) در لیپید A کاتالیز می‌کند. این تغییرات LPS بار منفی LPS را کاهش می‌دهد و در نتیجه میل LPS را به کولیستین با بار مثبت کاهش داده و منجر به مقاومت باکتری به کولیستین می‌گردد (۳۳). چهار ژن دیگر در شبکه درگیر در فرایند بیوسنتز Kdo هستند که عبارتند از *lpxP*، *lpxM*، *lpxL* و *waaA*. نتایج توپولوژی شبکه به روشنی نشان می‌دهد ژن *eptB* نقش کلیدی در القای مقاومت به کولیستین دارد. جدول (۲) دسته‌بندی ژن‌های موجود در شبکه را نشان می‌دهد. از دوازده گروه متمایز شده ژن *eptB* در ۸ دسته حضور دارد. در حالی که ژن *pagP* تنها در دو دسته مشاهده می‌شود. همین نکته می‌تواند بیانگر این مطلب باشد که ژن *eptB* نقش کلیدی‌تری نسبت به ژن *pagP* در القای مقاومت کولیستین دارد. همچنین *eptB* با ۳ فرآیند بیولوژیکی اصلی که شامل فرآیند متابولیک لیپوپلی‌ساکارید، انتقال سیگنال درون سلولی و فرآیند بیوسنتزی الیگوساکارید می‌شود، مرتبط است.

اولین بار در سال ۲۰۱۵ در چین ژن مقاومت به کولیستین *mcr-1* شناسایی شد که با واسطه پلاسمید یک پروتئین pEtN ترانسفراز را کدگذاری می‌کند و می‌تواند به‌صورت افقی انتقال یابد. از آن زمان، انواع مختلفی از ژن‌های *mcr* یعنی *mcr-1* تا *mcr-10* از نقاط مختلف جهان شناسایی و گزارش شده‌اند (۳۴). مطالعات نشان داده حضور *mcr-1* بیان ژن *eptB* را در حضور کولیستین افزایش می‌دهد و در نتیجه مقاومت ایجاد می‌کند (۳۳).

جدول ۲- دسته‌بندی ژن‌های شبکه هم‌بیانی *eptA* بر اساس مولفه‌های اشتراکی در پایگاه اطلاعات پروتئینی Uniprot

Term ID	term description	observed gene count	false discovery rate	matching proteins in network (labels)
KW-0472	Membrane	24	0.0021	<i>lpxH, pagP, opgE, ybjG, lpxL, phoQ, pgpB, mgrB, lpxM, wcaJ, lpxT, arnC, arnT, arnF, lpxP, qseC, bacA, eptB, waaA, pldA, basS, eptA, arnE, pmrR</i>
KW-0997	Cell inner membrane	22	0.00067	<i>lpxH, opgE, ybjG, lpxL, phoQ, pgpB, mgrB, lpxM, wcaJ, lpxT, arnC, arnT, arnF, lpxP, qseC, bacA, eptB, waaA, basS, eptA, arnE, pmrR</i>
KW-0812	Transmembrane	22	0.00073	<i>opgE, ybjG, lpxL, phoQ, pgpB, mgrB, lpxM, wcaJ, lpxT, arnC, arnT, arnF, lpxP, qseC, bacA, eptB, waaA, pldA, basS, eptA, arnE, pmrR</i>
KW-0808	Transferase	21	9.98E-07	<i>lpxD, lpxA, lpxB, pagP, opgE, lpxK, lpxL, phoQ, lpxM, wcaJ, lpxT, arnB, arnC, arnA, arnT, lpxP, qseC, eptB, waaA, basS, eptA</i>
KW-1133	Transmembrane helix	21	0.0012	<i>opgE, ybjG, lpxL, phoQ, pgpB, mgrB, lpxM, wcaJ, lpxT, arnC, arnT, arnF, lpxP, qseC, bacA, eptB, waaA, basS, eptA, arnE, pmrR</i>
KW-0443	Lipid metabolism	17	8.41E-17	<i>lpxC, lpxD, lpxA, lpxB, lpxH, lpxK, pgpB, arnB, arnC, arnA, arnD, arnT, arnF, eptB, pldA, eptA, arnE</i>
KW-0441	Lipid A biosynthesis	15	3.65E-21	<i>lpxC, lpxD, lpxA, lpxB, lpxH, lpxK, arnB, arnC, arnA, arnD, arnT, arnF, eptB, eptA, arnE</i>
KW-0448	Lipopolysaccharide biosynthesis	15	1.51E-14	<i>lpxL, lpxM, wcaJ, lpxT, arnB, arnC, arnA, arnD, arnT, arnF, lpxP, eptB, waaA, eptA, arnE</i>
KW-0046	Antibiotic resistance	10	1.14E-07	<i>lpxD, ybjG, arnB, arnC, arnA, arnD, pmrD, bacA, basR, eptA</i>
KW-0597	Phosphoprotein	8	0.0022	<i>phoQ, phoP, ugd, qseB, qseC, cpxR, basS, basR</i>
KW-0902	Two-component regulatory system	7	0.00029	<i>phoQ, phoP, qseB, qseC, cpxR, basS, basR</i>
KW-0012	Acyltransferase	6	0.0018	<i>lpxD, lpxA, pagP, lpxL, lpxM, lpxP</i>

نشان داده در فقدان فعالیت *eptA*، حساسیت باکتری به کولیستین بیش از ۱۰۰ برابر افزایش یافته است (۳۳). با برهمکنش اولیه با لیپید A در باکتری‌های گرم‌منفی، فعالیت ضد باکتریایی خود را نشان می‌دهند. مقاومت به پلی‌میکسین از طریق اصلاح لیپید A که تعامل الکترواستاتیک اولیه با پلی‌میکسین‌ها را از بین می‌برد، ایجاد می‌شود. لیپید A در باکتری‌های گرم‌منفی از تنوع ساختاری زیادی برخوردار است. ژن *eptA* آنزیمی است که مسئول اصلاح لیپید A با pEtN در باکتری *E. coli* است. در این مطالعه به‌منظور بررسی فرایند مقاومت باکتری *E. coli* به آنتی‌بیوتیک کولیستین، شبکه هم‌بیانی ژن‌های درگیر در این فرایند با محوریت ژن *eptA* بازسازی شد.

هر دو گروه فسفواتانول آمین ترانسفرازهای رمزگذاری شده با کروموزوم (مانند *eptA*، *eptB* و *eptC*) و رمزگذاری شده با پلاسمید (مانند *mcr-1* و *mcr-2*) در باکتری‌های گرم‌منفی گزارش شده‌اند. مقایسه توالی ژن‌های ترانسفراز فسفواتانول آمین در ۱۰ گونه باکتری گرم‌منفی نشان داده که میزان شباهت در میان کروموزوم‌های *eptA*، *eptB* و *eptC* در *E. coli* کم است در حالی که *eptA* بیشترین شباهت را با *mcr-1* و *mcr-2* نشان می‌دهد. هرچند ژن‌های کروموزومی *eptA* و پلاسمیدی *mcr-1* عامل اصلی القای مقاومت هستند، شبکه هم‌بیانی *eptA* به روشنی بیانگر اهمیت بالای ژن *eptB* در فرایند القای مقاومت به کولیستین در باکتری *E. coli* را دارد. هر چند مطالعات

شده، ژن *eptB* در ۸ دسته و ژن *pagP* تنها در دو دسته مشاهده می‌شود. این نشان می‌دهد که ژن *eptB* نقش کلیدی‌تری نسبت به ژن *pagP* در القای مقاومت کولیستین دارد.

آنالیزهای توپولوژی شبکه نشان داد ژن *pagP* نقش کلیدی در تغییر ساختار لیپوپلی‌ساکارید در غشای خارجی باکتری‌های گرم‌منفی ایفا می‌کند. دسته‌بندی ژن‌های موجود در شبکه نشان داد از دوازده گروه متمایز

References

- 1- Bialvaei AZ, Samadi Kafil H. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Curr Med Res Opin.* 2015; 31(4):707-21.
- 2- Binsker U, Käsbohrer A, Hammerl JA. Global colistin use: a review of the emergence of resistant Enterobacterales and the impact on their genetic basis. *FEMS Microbiol Rev.* 2022; 46(1).
- 3- Maldonado RF, Sá-Correia I, Valvano MA. Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS Microbiol Rev.* 2016; 40(4): 480-93.
- 4- Loho T, Dharmayanti A. Colistin: an antibiotic and its role in multiresistant Gram-negative infections. *Acta Med Indones.* 2015; 47(2): 157-68.
- 5- Baijal K, Abramchuk I, Herrera CM, Stephen Trent M, Lavallée-Adam M, Downey M. Proteomics analysis reveals a role for E. coli polyphosphate kinase in membrane structure and polymyxin resistance during starvation. *bioRxiv.* 2023.
- 6- Rogga V, Kosalec I. Untying the anchor for the lipopolysaccharide: lipid A structural modification systems offer diagnostic and therapeutic options to tackle polymyxin resistance. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2023; 74(3): 145-66.
- 7- Tula MY, Filgona J, Kyauta SE, Elisha R. Screening for some virulent factors among bacterial isolates from surfaces of hospital fomites and hands of healthcare workers. *CMBR.* 2023; 3(1): 9-16.
- 8- Tula MY, Filgona J, Pukuma MS. A Systematic review on the status of diarrheagenic Escherichia coli (DEC) pathotypes in Nigeria; the year 2000 – 2022. *CMBR.* 2022; 2(4): 213-29.
- 9- Shiri Y, Solouki M, Ebrahimi E, Emamjomeh A, Zahiri J. Gibberellin causes wide transcriptional modifications in the early stage of grape cluster development. *Genomics.* 2020; 112(1): 820-30. [In Persian]
- 10- Narimisa N, Goodarzi F, Bavari S. Prevalence of colistin resistance of Klebsiella pneumoniae isolates in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Ann clin microbiol antimicrob.* 2022; 21(1): 29. [In Persian]
- 11- Chang K, Wang H, Zhao J, Yang X, Wu B, Sun W, et al. Risk factors for polymyxin B-associated acute kidney injury. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases.* 2022; 117: 37-44.
- 12- Gogry FA, Siddiqui MT, Sultan I, Haq QMR. Current Update on Intrinsic and Acquired Colistin Resistance Mechanisms in Bacteria. *Frontiers in medicine.* 2021; 8: 677720.
- 13- Legese MH, Asrat D, Mihret A, Hasan B, Mekasha A, Aseffa A, et al. Genomic Epidemiology of Carbapenemase-Producing and Colistin-Resistant Enterobacteriaceae among Sepsis Patients in Ethiopia: a Whole-Genome Analysis. *AAC.* 2022; 66(8): e0053422-e.
- 14- Apweiler R, Bairoch A, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S, et al. UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32(Database issue): D115-D9.
- 15- 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 Res.* 2017; 45(Database issue): D362-D8.
- 16- 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 res.* 2003; 13(11): 2498-504.
- 17- Assenov Y, Ramirez F, Schelhorn SE, Lengauer T, Albrecht M. Computing topological parameters of biological networks. *Bioinformatics.* 2008; 24(2): 282-4.
- 18- Shiri Y, Solouki M, Ebrahimi E, Emamjomeh A, Zahiri J. Gibberellin causes wide transcriptional modifications in the early stage of grape cluster development. *Genomics.* 2019. [In Persian]

19- Shiri Y, Solouki M, Ebrahimi E, Emamjomeh A, Zahiri J. Unraveling the Transcriptional Complexity of Compactness in Sistan Grape Cluster. *Plant Science*. 2018. [In Persian]

20- Shiri Y, Karimiyan Ma. Reconstitution of Gene Network on Penicillin Resistance in E.coli Using Databases Information. *NFVM*. 2020; 2(2): 1-9. [In Persian]

21- Shiri Y, Mohkami Z, Bidarnamani F. Reconstruction of co-expression network of ampC gene as the main factor of Pseudomonas aeruginosa resistance to the new antibiotic Ceftolozane/Tazobactam. *NFVM*. 2022; 5(1): 96-107. [In Persian]

22- Shiri Y, fazeli nasab B. Evaluation of gene network on tetracycline antibiotic resistance controlled by tetA and tetB genes using databases information. *NFVM*. 2019; 2(1): 88-96. [In Persian]

23- Shiri Y, Khodavirdipour A, Kalkali N. Re-construction of Co-expression Network of Genes Involved in Bacterial Cell Wall Synthesis and Their Role in Penicillin Resistance. *AJCMJ*. 2020; 7(3): 65-71. [In Persian]

24- 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.

25- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Sta. Soc Ser B Methodol*. 1995; 57(1): 289-300.

26- Takahashi H, Carlson RW, Muszynski A, Choudhury B, Kim KS, Stephens DS, et al. Modification of lipooligosaccharide with phosphoethanolamine by LptA in Neisseria meningitidis enhances meningococcal adhesion to human endothelial and epithelial cells. *Infect*

Immun. 2008; 76(12): 5777-89.

27- Ly NS, Yang J, Bulitta JB, Tsuji BT. Impact of two-component regulatory systems PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB on colistin pharmacodynamics in Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(6): 3453-6.

28- Guo H, Zhao T, Huang C, Chen J. The Role of the Two-Component System PhoP/PhoQ in Intrinsic Resistance of Yersinia enterocolitica to Polymyxin. *Front Microbiol*. 2022; 13: 758571.

29- Bishop RE, Gibbons HS, Guina T, Trent MS, Miller SI, Raetz CR. Transfer of palmitate from phospholipids to lipid A in outer membranes of gram-negative bacteria. *EMBO*. 2000; 19(19): 5071-80.

30- Rubin EJ, Herrera CM, Crofts AA, Trent MS. PmrD is required for modifications to escherichia coli endotoxin that promote antimicrobial resistance. *AAC*. 2015; 59(4): 2051-61.

31- Kawahara K. Variation, Modification and Engineering of Lipid A in Endotoxin of Gram-Negative Bacteria. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(5).

32- Bishop RE. The lipid A palmitoyltransferase PagP: molecular mechanisms and role in bacterial pathogenesis. *Molecular microbiology*. 2005; 57(4): 900-12.

33- Elizabeth R, Baishya S, Kalita B, Wangkheimayum J, Choudhury MD, Chanda DD, et al. Colistin exposure enhances expression of eptB in colistin-resistant Escherichia coli co-harboring mcr-1. *Scientific reports*. 2022; 12(1): 1348.

34- Protonotariou E, Meletis G, Malousi A, Kotzamanidis C, Tychala A, Mantzana P, et al. First detection of mcr-1-producing Escherichia coli in Greece. *J Glob Antimicrob Resist*. 2022; 31: 252-5.



Investigation of co-expression network of *eptA* colistin resistance gene in *Escherichia coli*

Yasoub Shiri^{*1}, Samira Saadatjou², Zaynab Mohkami³

1- Horticulture Department, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran.

2- Doctor of General Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Veterinary Clinician in Zabol, Zabol, Iran.

3- Agronomy and Plant Breeding Department, Agriculture Research Center, Zabol Research Institute, Zabol, Iran.

Receive: November 6, 2023; Revise: December 5, 2023; Accept: December 6, 2023

 10.22034/nfvm.2024.424139.1210

Summary

Colistin (polymyxin E) is a polymyxin antibiotic. Polymyxin is increasingly used as a last resort antibiotic for the treatment of drug-resistant Gram-negative bacteria. Colistin makes the outer membrane of the bacteria permeable and disturbs the integrity of the inner membrane and finally causes cell death. Lipid A lipopolysaccharide is a main component of the outer membrane of most Gram-negative bacteria, and some bacteria induce resistance to colistin by making changes in its structure. Lipid A phosphoethanolamine transferase (*eptA*) is an enzyme responsible for modifying lipid A in *E. Coli*. In order to investigate the process of genes involved in resistance to colistin, a co-expression network consisting of 29 genes was reconstructed. Gene ontology analysis showed that lipid synthesis pathways involved in bacterial membrane structure such as liposaccharide biosynthesis, glycolipid biosynthesis and phospholipid biosynthesis have the highest number of representatives in the network. Network topology analysis showed that *pagP* had the highest number of connections with 27 direct connections. Next, *eptB*, *arnT*, *basS* and *phoP* genes were in the next row with 26 connections each. Also, *pagP* showed the highest betweenness centrality and closeness centrality with (0.03527178) and (1) respectively. Also, *eptB* is the second key gene in this network from the perspective of Closeness Centrality and Betweenness Centrality with (0.96428571) and (0.03332764). The classification of the genes in the network showed that out of the twelve differentiated groups, *eptB* was found in 8 groups and *pagP* was observed in only two groups. This shows that *eptB*, along with *eptA*, plays a key role in the induction of colistin resistance.

Keywords: *lipo-polysaccharide, antibiotic, polymyxin, gene network*