

The Expression of *rpoS* Gene in an *Escherichia coli* Mutant with a High Resistance to Ciprofloxacin

Melika Ahangar

Department of Genetics, Faculty of Science, Shahrekord University, Iran, melikaahangar.73@gmail.com

Razieh Pourahmad*

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

Mohammadreza Mahzonieh

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

Abstract

Introduction: Ciprofloxacin is a broad-spectrum antibiotic and a member of fluoroquinolones. Its main target in *Escheichia coli* is DNA gyrase. Ciprofloxacin induces the SOS response via RecA. The presence of RecF protein is essential for RecA activity. The *recF* is increased in the logarithmic phase by its operon promoter and the stagnation phase by its specific promoter. The activity of the specific promoter is dependent on *rpoS*. This study aimed to evaluate the expression of *rpoS* in a ciprofloxacin-resistant mutant.

Materials and methods: To evaluate the expression of *rpoS*, cellular RNAs in the early and middle logarithmic phases of growth were extracted. Then, after synthesizing cDNA, the relative gene expression in the wild type and mutant strains was measured by real-time PCR.

Results: Results showed that the extracted RNAs were free of contamination and have a suitable quality for the production of cDNA. Moreover, the expression of *rpoS* in the early and middle logarithmic phases after ciprofloxacin treatment in the high ciprofloxacin resistant mutant was approximately similar to the wild type strain.

Discussion and conclusion: In conclusion, it seems that the increased expression of *recF* was related to the operon promoter, and treatment with ciprofloxacin did not cause the stationary phase-like conditions.

Key words: Ciprofloxacin, *Escherichia Coli*, *recF*, *rpoS*, Real Time PCR.

* Corresponding author

Received: October 14, 2019/ **Accepted:** January 25, 2020

بیان ژن *rpoS* در سوبه جهش یافته/اشریشیا کلی با مقاومت زیاد به سیپروفلوکسازین

ملیکا آهنگر: کارشناس ارشد گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، ایران، melikaahangar.73@gmail.com
راضیه پوراحمد*: دانشیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، ایران، razieh_jaktaji@yahoo.com
محمد رضا محزونیه: استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، ایران، mahzoon2@yahoo.com

چکیده

مقدمه: سیپروفلوکسازین، آنتی‌بیوتیکی با طیف اثر وسیع از خانواده فلوروکینولون‌هاست که هدف اصلی آن در اشریشیا کلی، DNA ژیراز است. سیپروفلوکسازین سبب القای پاسخ SOS از طریق RecA می‌شود. حضور پروتئین RecF برای فعالیت RecA ضروری است. *recF* در فاز نمایی به واسطه پروموتور اپرون خود و در فاز سکون به وسیله پروموتور اختصاصی اش افزایش بیان می‌یابد؛ فعالیت پروموتور اختصاصی به *rpoS* وابسته است. هدف مطالعه حاضر، بررسی میزان بیان *rpoS* در جهش یافته مقاوم به سیپروفلوکسازین است.

مواد و روش‌ها: به منظور بررسی بیان *rpoS*، RNA سلول در اوایل و میانه فاز نمایی رشد استخراج شد. پس از سنتز cDNA، میزان بیان نسبی ژن در سوبه‌های تیپ وحشی و جهش یافته به روش Real time PCR سنجیده شد.

نتایج: نتایج، آلوده نبودن RNAهای استخراج شده و کیفیت مناسب آنها برای تولید cDNA را نشان دادند؛ همچنین بیان *rpoS* در اوایل و میانه فاز نمایی پس از تیمار با سیپروفلوکسازین در جهش یافته دارای مقاومت زیاد به سیپروفلوکسازین تقریباً مشابه تیپ وحشی بود.

بحث و نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد افزایش بیان *recF* به وسیله پروموتور اپرون است و تیمار با سیپروفلوکسازین سبب ایجاد شرایط مشابه با فاز سکون نمی‌شود.

واژه‌های کلیدی: سیپروفلوکسازین، اشریشیا کلی، *rpoS*، *recF*، Real time PCR

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

مقاومت آنتی‌بیوتیکی ریزموجوداتی که ابتدا به آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بودند، در طول درمان طولانی‌مدت با آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش یافته است؛ به طوری که این مقاومت می‌تواند آثار داروهای ضد میکروبی را کاهش دهد و به افزایش عوارض و هزینه‌های درمان و مرگ‌ومیر منجر شود (۱). مقاومت آنتی‌بیوتیکی از تغییرات ژنتیکی در باکتری‌ها ناشی می‌شود و کاهش توانایی آنتی‌بیوتیک‌ها برای نابودی عوامل میکروبی را در پی دارد (۲). کینولون‌ها و فلوروکینولون‌ها از کلاس‌های نسبتاً جدید آنتی‌بیوتیک‌های مصنوعی با فعالیت ضدباکتریایی قوی به شمار می‌آیند. تفاوت فلوروکینولون‌ها با کینولون‌ها در جایگزینی کربن ۸ با اتم نیتروژن و داشتن اتم فلورور^۱ در موقعیت ششم است که سبب عملکرد بهتر آنتی‌بیوتیک شده است. در حال حاضر، چهار نسل از آنتی‌بیوتیک‌های کینولونی و فلوروکینولونی وجود دارند و متداول‌ترین فلوروکینولون‌ها در پزشکی عبارتند از: سپروفلوکسازین، لوروفلوکسازین و موکسی‌فلوکسازین (۳).

پاسخ SOS، مسیر کلاسیک پاسخ به تنش باکتریایی است که آسیب DNA در اثر طیفی از عوامل تنش‌زا از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها آن را القا می‌کند (۴)؛ این پاسخ از عملکرد رگولونی^۲ ناشی می‌شود که از ۲۰ ژن غیرمشابه تشکیل شده است و بسیاری از این ژن‌ها در تحمل آسیب DNA و ترمیم DNA درگیرند؛ برای نمونه، *lexA* و *recA* که پس از رویارویی سلول با آسیب DNA القا می‌شوند. پاسخ SOS از طریق پروتئین‌های تنظیمی *RecA* (القاهر) و *LexA* (سرکوبگر) تنظیم

می‌شود که این پروتئین‌ها رونویسی از گروه‌های پایین دست شامل ژن‌های SOS (*din*^۳) را تنظیم می‌کنند (۵). پروتئین *RecF* بارگیری مستقیم *RecA* بر بخش‌هایی از شکاف تک‌رشته در DNA دورشته را تسهیل می‌کند (۶)؛ ژن *recF* در اپرونی قرار دارد که شامل چهار ژن *dnaA* (کدکننده پروتئین متصل‌شونده به DNA و لازم برای شروع همانندسازی DNA مبدأ کروموزومی)، *dnaN* (کدکننده زیرواحد β و عامل پردازشی DNA پلیمراز III)، *recF* و *gyrB* (کدکننده زیرواحد B در DNA ژیراز) است که در یک جهت رونویسی می‌شوند. علاوه بر پروموتور عمومی که در فاز نمایی استفاده می‌شود، *recF* دارای پروموتور اختصاصی است که در فاز سکون فعال می‌شود. بیان ژن *recF* به تولید پروتئین *RecF* منجر و بیان ژن *gyrB* سبب تولید زیرواحد B پروتئین DNA ژیراز می‌شود؛ علاوه بر این، *recF* دارای یک منطقه پروموتوری مربوط به خودش است که در وسط ژن *dnaN* قرار دارد. *recF* و *gyrB* در فاز نمایی از پروموتور *dnaA* رونویسی می‌شوند. پروتئین *RecF* برای پیشبرد فرایند ترمیمی که در آن نقش دارد، در منطقه DNA تک‌رشته آسیب‌دیده به تشکیل کمپلکس *RecFOR* متشکل از محصولات دو ژن دیگر (*recR* و *recO*) و همچنین دایمری شدن تمام این محصولات به همراه هیدرولیز ATP در جایگاه اتصال ATP به خودش نیازمند است؛ از دیگر وظایف پروتئین *RecF*، واکنش با پروتئینی به نام *RecX* است که این پروتئین اثر مهارری روی فعالیت *RecA* دارد و با این عمل *RecF*، اثر مهارری آن خنثی می‌شود (۷). ژن *rpoS* (RNA پلیمراز، سیگما S) پروتئین سیگما ۳۸ (σ³⁸) یا *RpoS* پروتئین ۳۷/۸ کیلودالتونی را در اشریشیا کلی

مشخص نشده است افزایش بیان *recF* از طریق پروموتورهای اپرون یا پروموتور اختصاصی *recF* انجام می شود؛ پروموتور *recF* تحت کنترل سیگما فاکتور S است که در فاز سکون بیان می شود. هدف پژوهش حاضر، بررسی بیان ژن *rpoS* در جهش یافته/شریشیا کلی دارای مقاومت زیاد به سیروفلوکسازین در طول فاز نمایی است.

مواد و روش ها

در جدول ۱، ویژگی های ژنتیکی و فنوتیپی سویه های بررسی شده دیده می شود. منابع این سویه ها پیش از این شرح داده شد (۹) و برای اطمینان از درستی آنها، مقاومت آنها به سیروفلوکسازین اندازه گیری شد. به منظور طراحی آغازگرها، ابتدا توالی ژن *rpoS* از سایت NCBI به دست آمد و سپس آغازگرها با نرم افزار Gene Runner طراحی شدند؛ همچنین توالی آغازگرهای *gapA* (ژن خانه زاد) و شاهد مثبت از مطالعه های پیشین به دست آمد (۱۰). ویژگی های آغازگرهای استفاده شده در مطالعه حاضر در جدول ۲ آمده است.

کدگذاری می کند. سیگما فاکتورها، پروتئین هایی اند که رونویسی را در باکتری تنظیم می کنند و در پاسخ به شرایط محیطی مختلف فعال می شوند. *rpoS* در اواخر فاز نمایی^۴ رونویسی می شود و RpoS تنظیم کننده اصلی ژن های فاز سکون^۵ است (۸). در شرایط خاص، جایگزینی سیگما ۳۸ در ساختار آنزیم RNA پلیمراز سبب روشن شدن ژن هایی مانند ژن *recF* می شود. در مطالعه ای که پورا احمد جکتاجی^۶ و پسند^۷ در سال ۲۰۱۶ انجام دادند، بیان ژن های *recA* و *LexA* در سویه های مقاوم به سیروفلوکسازین باکتری/شریشیا کلی اندازه گیری شد و هر دو ژن افزایش بیان نشان دادند (۹). در سویه های جهش یافته *dinI* نیز افزایش بیان *recA* مشاهده شده است (۱۰). پروتئین RecF در افزایش فعالیت *recA* نقش دارد و پس از تیمار با سیروفلوکسازین، افزایش بیان می یابد (۱۱)؛ همچنین با اندازه گیری بیان ژن *gyrB* مشخص شده است این ژن افزایش بیانی به اندازه *recF* دارد و برآورد می شود *recF* در رشد نمایی از طریق پروموتور اصلی اپرون بیان می شود و از پروموتور اختصاصی خود استفاده نمی کند (۱۲).

جدول ۱- ویژگی سویه های تیپ وحشی و جهش یافته/شریشیا کلی

نام سویه	ویژگی های ژنتیکی/فنوتیپی
MG1655	تیپ وحشی/حساس به سیروفلوکسازین
PM1	تیپ جهش یافته <i>acrAB</i> overexpression (<i>marOR</i> (20 bp duplication) <i>gyrA</i> (Ser83→Leu)/مقاوم به سیروفلوکسازین

جدول ۲- آغازگرهای استفاده شده

نوع آغازگر	ترتیب توالی	طول توالی (جفت باز)	اندازه محصول (جفت باز)
<i>rpoS</i> F	5'-ACTGTTAACGGCCGAAGAAG-3'	۱۹	۱۴۷
<i>rpoS</i> R	5'-TCCAGCAACGCCAGACCAC-3'	۲۰	۱۴۷
<i>gapA</i> F	5'-ACTTACGAGCAG ATCAAAGC-3'	۲۰	۱۷۰
<i>gapA</i> R	5'-AGTTTCACGAAGTTGTCGTT-3'	۲۰	۱۷۰

درستی سنتز و شرایط دمایی برای به کار بردن در واکنش Real time PCR احراز شود؛ شرایط دمایی بهینه PCR در جدول ۳ آمده است. در مرحله بعد، واکنش Real time PCR برای نمونه‌ها انجام شد؛ شرایط دمایی بهینه برای این واکنش در جدول ۴ نشان داده شده است. به منظور انجام این واکنش از کیت سایبرگرین (یکتاتجهیز) استفاده شد. سایبرگرین، ترکیب فلورسنسی است که به DNA دورشته‌ای متصل می‌شود و چنانچه اندازه محصول ژنی کوتاه باشد و احتمال تشکیل دایمر بین آغازگرها وجود داشته باشد، از کاوشگر برای درستی انجام واکنش استفاده می‌شود. نتایج بیان ژن با آزمون تی^۱ جفت و نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶) و Excel بررسی شدند. حدود اطمینان برای تمام آزمایش‌ها ۹۵ درصد و $P < 0/05$ در نظر گرفته شد. بیان بیش از ۲، بیش‌بیان بود ($P < 0/05$).

جدول ۳- شرایط دمایی بهینه PCR

مرحله	درجه حرارت	مدت زمان (دقیقه/ثانیه)	تعداد چرخه
واسرشتگی اولیه	۹۵	۳ دقیقه	۱
واسرشتگی	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۵
اتصال آغازگر	۵۵	۳۰ ثانیه	۳۵
بسط	۷۲	۳۰ ثانیه	۳۵
بسط نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

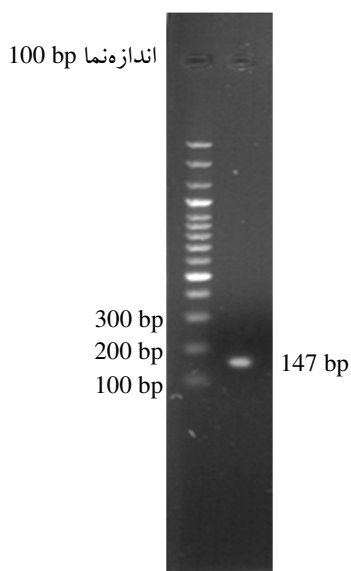
جدول ۴- شرایط دمایی بهینه Real time PCR

مرحله	درجه حرارت	مدت زمان (دقیقه/ثانیه)	تعداد چرخه
واسرشتگی اولیه	۹۵	۵ دقیقه	۱
واسرشتگی	۹۵	۱۰ ثانیه	۴۰
اتصال آغازگر	۵۵	۱۵ ثانیه	۴۰
بسط	۷۲	۲۰ ثانیه	۴۰
ذوب	۶۵-۹۷	برای هر چرخه ۵ ثانیه	-

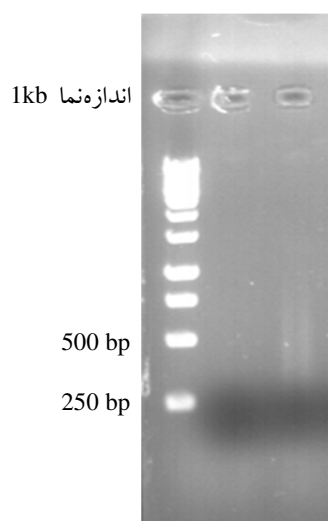
به منظور استخراج RNA، ابتدا کشت تازه از استوک سویه جهش یافته و تیپ وحشی روی محیط کشت LB آگار تهیه شد. کلنی‌های تک سویه‌های تازه کشت شده برای تلقیح در محیط‌های کشت مایع LB استفاده شدند و سپس آنتی بیوتیک سیروفلوکسازین به محیط‌های مربوط به سویه جهش یافته با مقاومت زیاد اضافه شد و نمونه‌ها در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۸۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پس از سپری شدن مدت زمان لازم، جذب نوری (OD)^۱ نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد که ۰/۳ و ۰/۶ بودند و هر کدام در زمان خاص خود برداشت شدند. محلول شاهد^۲ همان محیط کشت LB مایع بدون باکتری بود. استخراج RNA نمونه‌های یادشده مطابق دستور عمل کیت RNeasy Plus Mini Kit انجام شد. در راستای اطمینان یافتن از آلوده نبودن نمونه‌های RNA به DNA، واکنش PCR به منظور تکثیر ژن *rpoS* برای هر کدام از نمونه‌ها انجام شد و دمای اتصال آغازگرهای ژن *rpoS* برابر ۵۵ بود. جذب نوری و غلظت RNA و میزان خلوص آن در هریک از نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Visible (بیوکروم انگلستان) اندازه‌گیری شد. به منظور سنتز cDNA از کیت یکتاتجهیز RevertAidTM (Reverse Transcriptase) استفاده و تمام مراحل کار طبق دستور عمل کیت انجام شد. جذب نوری و غلظت cDNA و میزان خلوص آن در هریک از نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Visible (بیوکروم انگلستان) اندازه‌گیری شد و سپس PCR برای نمونه cDNA در شرایط دمایی بهینه برای ژن *rpoS* انجام شد تا پس از مشاهده باندها اختصاصی حاصل از تکثیر cDNA روی ژل آگارز،

نتایج

روش PCR و ژل الکتروفورز به منظور بررسی و تعیین کمیت و کیفیت RNA و آلوده نبودن RNA استخراج شده به DNA استفاده شد. نتایج، هیچ باندهی را نشان ندادند که گویای آلوده نبودن نمونه‌ها به DNA ژنومی است. آغازگر استفاده شده در واکنش PCR به ژن *rpoS* مربوط بود (شکل ۱).



شکل ۲- تجزیه و تحلیل ژل الکتروفورز cDNA سنتز شده با اندازه نما ۱۰۰ جفت بازی (چاهک اول). چاهک دوم به نمونه cDNA مربوط است.



شکل ۱- نتیجه PCR آلوده نبودن RNA استخراج شده به DNA. چاهک دوم و سوم به نمونه‌های RNA مربوط است.

ارزیابی کمی تغییرات بیان ژن *rpoS* به روش Real time PCR در سویه‌های جهش یافته و تیپ وحشی انجام شد. پس از تنظیم و بهینه کردن شرایط، منحنی تکثیر نمونه‌ها بررسی شد که افزایش سیگنال‌های فلورسنس ساطع شده از رنگ سایبرگرین را هنگام پیشروی چرخه‌های واکنش مشخص کرد و با رسم خط آستانه، چرخه آستانه (Ct) برای هر یک از نمونه‌ها محاسبه شد؛ منحنی تکثیر ژن *rpoS* در شکل ۳ نشان داده شده است. نقطه ذوب ژن نیز اندازه گیری شد که برای *rpoS* برابر ۸۶ درجه سانتی گراد بود (شکل ۴). با توجه به نتایج نمودارها و تجزیه و تحلیل‌های منحنی استاندارد و Ct واکنش Real time PCR نمونه جهش یافته، سنجش نسبی بیان ژن به روش فافل (۹) انجام شد؛ میزان بیان ژن در جدول ۵ دیده می‌شود که میانگین سه بار تکرار آزمایش است و میزان خطا کمتر ۱۰ درصد است. کارایی هر واکنش بین ۰/۹ تا ۱/۱ بود.

بررسی غلظت RNAهای استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر انجام شد. کل RNAهای استخراج شده غلظت مناسبی داشتند و نسبت (Absorption) A260/A280 برای تمام نمونه‌ها مناسب و بیش از ۱/۸ بود. جذب و غلظت cDNA در هر یک از نمونه‌ها مناسب و نسبت A260/A280 برابر با ۱/۸ بود. شکل ۲، نتیجه PCR یک نمونه cDNA برای ژن مطالعه شده را روی ژل آگارز ۲/۵ درصد مشخص می‌کند که با توجه به شدت باند می‌توان به طور کیفی از سنتز cDNA اطمینان یافت.

اعداد ۰/۳ و ۰/۶ که رویه‌روی هر سویه در جدول نوشته شده‌اند، نمونه‌هایی‌اند که OD آنها به ترتیب برابر با ۰/۳ و ۰/۶ است.

بحث و نتیجه‌گیری

سیگما ۳۸ یا RpoS، فاکتوری است که در حالت گرسنگی، کاهش سرعت رشد مانند فاز سکون، دمای کم و اسیدیته کم در حالت اسیدی سبب افزایش بیان تعدادی از ژن‌های ضروری می‌شود و تنظیم‌کننده مرکزی در پاسخ به تنش است. سه نوع پاسخ ژن‌ها به افزایش بیان *rpoS* گزارش شده است:

ژن‌هایی که بیان آنها به‌طور خطی با افزایش بیان *rpoS* افزایش می‌یابد؛ برای نمونه، *osmY* که کدکننده پروتئینی است که با پاسخ اسمزی و فعالیت تاخوردگی پروتئین مرتبط است.

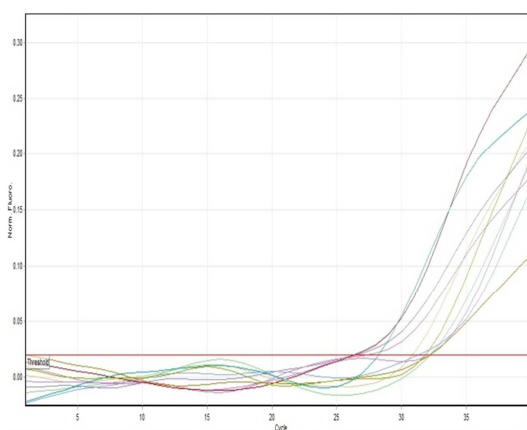
ژن‌هایی که بیان آنها به‌طور چشمگیری با افزایش بیان *rpoS* افزایش می‌یابد، ولی این افزایش بیان خطی نیست (حساس)؛ مانند *astA* با فعالیت کاتالیزوری.

ژن‌هایی که بیان آنها به میزان ناچیزی تغییر می‌یابد؛ مانند *gadC* که در مقاومت اسیدی فعالیت دارد (۱۱).

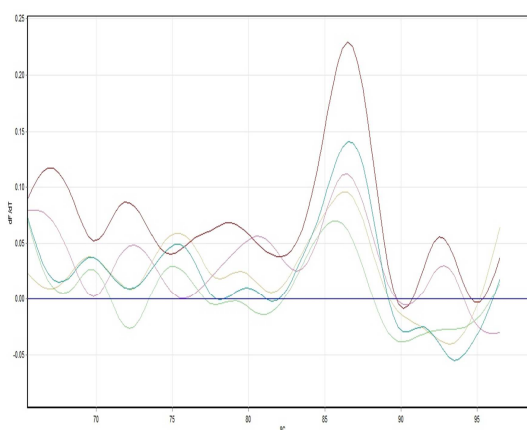
در شرایط خاص، جایگزینی سیگما ۳۸ در ساختار آنزیم رونویسی می‌تواند به روشن شدن ژن‌هایی منجر شود که ژن *recF* از جمله آنها به شمار می‌آید (۱۳).

پروموتور اصلی *rpoS* درون ژن *nlpD* قرار دارد که در *اشریشیا کلی* با نام *rpoSp1* شناخته می‌شود. عوامل مؤثر بر بیان *rpoS* شامل خانواده TetR است که مستقیماً سبب تنظیم *rpoS* و افزایش آن در فاز سکون می‌شوند. اما هنوز مشخص نیست این کار را به‌طور مستقیم انجام

مقایسه بیان ژن در هر یک از نمونه‌های جهش‌یافته نسبت به تیپ وحشی با نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶) و Excel انجام شد. بیان بیش از ۲، بیش بیان در نظر گرفته شد ($P < 0.05$).



شکل ۳- منحنی تکثیر واکنش Real time PCR ژن *rpoS*



شکل ۴- منحنی ذوب Real time PCR ژن *rpoS*

جدول ۵- بیان نسبی ژن *rpoS* در سویه تیپ وحشی و جهش‌یافته با مقاومت زیاد به سیپروفلوکسازین

سویه	بیان نسبی	مقدار P (معناداری آماری)
MG1655(0.3)	۱	-
MG1655(0.6)	۱/۰۱	۰/۳
PM1(0.3)	۱/۲۶	۰/۰۶
PM1(0.6)	۱/۴۹	۰/۱۵

نکته پی برده شده است که *rpoS* کنترل بیان پروتئین‌های تنشی OsmY و Dps را از طریق تغییرات بیانی *CspC* و *CspE* بر عهده دارد (۱۷).

یافته‌های پژوهش حاضر نشان دادند بیان ژن *rpoS* در فاز نمایی (اوایل و میانه فاز) در جهش یافته افزایش معناداری نسبت به سویه تیپ وحشی ندارد ($P > 0.05$) که این مطلب در سویه جهش یافته نشان می‌دهد افزایش بیان ژن *recF* در جهش یافته‌های مقاوم به سیروفلوکسازین در این مراحل فاز نمایی نمی‌تواند به *rpoS* وابسته باشد و بیان آن به سیگما فاکتور فاز نمایی (سیگما ۷۰) وابسته است. در مطالعه‌ای که کوچیک^{۱۷} و ونتوری^{۱۸} در سال ۲۰۰۱ روی باکتری *Pseudomonas aeruginosa* انجام دادند، رشد آهسته و رونویسی پیش از موعد *rpoS* در اوایل فاز نمایی نشان داده شد (۱۸)؛ البته این باکتری به طور ذاتی به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است.

نتایج پژوهش حاضر، افزایش بیان *rpoS* را در اوایل و میانه فاز نمایی نشان ندادند؛ در نتیجه، به نظر می‌رسد افزایش بیان *recF* در این مراحل از طریق پروموتور اپرون باشد و تیمار با سیروفلوکسازین سبب ایجاد شرایطی مشابه با فاز سکون نمی‌شود.

سپاسگزاری

از دانشگاه شهرکرد برای حمایت از پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

References

- (1) Smith RD., Coast J. Antimicrobial resistance: A global response. *Bulletin of the World Health Organization* 2002; 80: 126-133.

می‌دهند یا غیرمستقیم. ppGpp نیز بیان *rpoS* را القا می‌کند و احتمالاً این کار را با کنترل سطوح فسفات و مسدود کردن فسفات‌آز خارج سلولی^{۱۱} انجام می‌دهد. cAMP-CRP تنظیم منفی *rpoS* را بر عهده دارد و در مقابل، BarA سبب تنظیم آن به طور مثبت می‌شود. UvrY به واسطه BarA فسفریله و سبب تنظیم منفی یا به عبارتی، کاهش بیان *rpoS* می‌شود و تحریک BarA را نیز بر عهده دارد (۱۴).

چنانچه ژن *rpoS* در جهش یافته مقاوم به سیروفلوکسازین افزایش بیان یابد، این احتمال وجود دارد که افزایش بیان ژن *recF* ناشی از افزایش بیان این ژن نیز باشد. در برخی پژوهش‌ها ثابت شده است هنگامی که سلول باکتری در معرض آنتی‌بیوتیک‌های اکسیداتیو قرار می‌گیرد، سیستم SOS نیز فعال می‌شود. بیان بیشتر *rpoS* در شرایطی همچون فقر مواد غذایی و تنش اکسیداتیو برای باکتری گرم منفی *Vibrio cholerae* پیش‌بینی شده است (۱۴)؛ همچنین زمانی که باکتری اشریشیا کلی در معرض پرتوهای اشعه UV قرار می‌گیرد، آسیب به DNA سبب ایجاد تک‌رشته‌هایی در ساختار آن می‌شود که متعاقب آن، سیستم SOS و *rpoS* به طور جداگانه فعال می‌شوند (۱۵). در پاسخ به شرایط اسیدی، *rpoS* و DsrA، ArcZ، RprA شرکت دارند که نقش این سه sRNA در این مسیر هنوز مشخص نیست، اما آنچه واضح است، نقش کلیدی *rpoS* است؛ همچنین افزایش بیان *rpoS* در *Salmonella typhimurium* در شرایط اسیدی مشاهده شده است که بیرسون^{۱۲} و همکاران (۱۹۹۶)، هولینگ^{۱۳} و همکاران (۲۰۰۱) و باتستی^{۱۴} و همکاران (۲۰۰۸) آن را اثبات کرده‌اند (۱۶). در مطالعه فادتار^{۱۵} و اینوی^{۱۶} نیز به این

- (2) zur Wiesch PA., Kouyos R., Engelstädter J., Regoes RR., Bonhoeffer S. Population biological principles of drug-resistance evolution in infectious diseases. *The Lancet Infectious Diseases* 2011; 11(3): 236-247.
- (3) Redgrave LS., Sutton SB., Webber MA., Piddock LJ. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology* 2014; 22(8): 438-445.
- (4) Torres-Barceló C., Kojadinovic M., Moxon R., MacLean RC. The SOS response increases bacterial fitness, but not evolvability, under a sublethal dose of antibiotic. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 2015; 282(1816): 20150885.
- (5) Lewin C., Howard B., Ratcliff N., Smith J. 4-Quinolones and the SOS response. *Journal of Medical Microbiology* 1989; 29(2): 139-144.
- (6) Morimatsu K., Kowalczykowski SC. RecFOR proteins load RecA protein onto gapped DNA to accelerate DNA strand exchange: a universal step of recombinational repair. *Molecular Cell* 2003; 11(5): 1337-1347.
- (7) Perez-Roger I., Garcia-Sogo M., Navarro-Avino J., Lopez-Acedo C., Macian F., Armengod M. Positive and negative regulatory elements in the *dnaA-dnaN-recF* operon of *Escherichia coli*. *Biochimie* 1991; 73(2-3): 329-334.
- (8) Lange R., Hengge-Aronis R. Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 1991; 5(1): 49-59.
- (9) Pourahmad Jaktaji, R., Pasand S. Overexpression of SOS genes in ciprofloxacin resistant *Escherichia coli* mutants. *Gene* 2016; 576(1): 115-118.
- (10) Viveiros M., Dupont M., Rodrigues L., Couto I., Davin-Regli A., Martins M., et al. Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E. coli*. *PLoS one* 2007; 2(4): e365.
- (11) Wong GT., Bonocora RP., Schep AN., Beeler SM., Fong AJL., Shull LM., et al. Genome-wide transcriptional response to varying RpoS levels in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 2017; 199(7): e00755-16.
- (12) Moosavi MS., Pourahmad R., Mahzoonieh MR. Expression of *RecF* and *GyrB* genes in a low ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* mutant. *BJM* 2018; 27: 53-60.
- (13) Baharoglu Z., Krin E., Mazel D. RpoS plays a central role in the SOS induction by sub-lethal aminoglycoside concentrations in *Vibrio cholerae*. *PLoS Genetics* 2013; 9(4): e1003421.
- (14) Venturi V. Control of rpoS transcription in *Escherichia coli* and *Pseudomonas*: why so different? *Molecular Microbiology* 2003; 49(1): 1-9.
- (15) Yamanaka T., Toyoshiba H., Sone H., Parham FM., Portier CJ. The TAO-Gen algorithm for identifying gene interaction networks with application to SOS repair in *E. coli*. *Environmental Health Perspectives* 2004; 112(16): 1614-1621.
- (16) Bak G., Han K., Kim D., Lee Y. Roles of *rpoS*-activating small RNA s in pathways leading to acid resistance of *Escherichia coli*. *Microbiologyopen* 2014; 3(1): 15-28.
- (17) Phadtare S., Inouye M. Role of CspC and CspE in regulation of expression of RpoS and UspA, the stress response proteins in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 2001; 183(4): 1205-1214.
- (18) Kojic M., Venturi V. Regulation of *rpoS* gene expression in *Pseudomonas*: Involvement of a TetR family regulator. *Journal of Bacteriology* 2001; 183(12): 3712-3720.

- 1- Fluorine
- 2- Regulon
- 3- Damage inducible
- 4- Late exponential phase
- 5- Stationary phase
- 6 Pourahmad Jaktaji
- 7 Pasand
- 8- Optical Density
- 9- Blank
- 10- T-test
- 11- Exopolyphosphatase
- 12- Bearson
- 13- Heuveling
- 14- Battesti
- 15- Phadtare
- 16- Inouye
- 17- Kojic
- 18- Venturi