

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

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله: پژوهشی)

سال نهم، شماره ۳۳، بهار ۱۳۹۹، صفحه ۱۵-۲۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۲۵

Doi: [10.22108/BJM.2020.119666.1230](https://doi.org/10.22108/BJM.2020.119666.1230)

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

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

محمدرضا محزونیه: استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، ایران، mahzoon2@yahoo.com

چکیده

مقدمه: سیروفلوکسازین، آنتی‌بیوتیکی با طیف اثر وسیع از خانواده فلوروکینولون‌هاست که هدف اصلی آن در اشریشیا کلی، DNA ژیراز است. سیروفلوکسازین 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 سیروفلوکسازین 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 سویه‌های 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 سیروفلوکسازین در جهش یافته دارای مقاومت زیاد به سیروفلوکسازین تقریباً مشابه تیپ وحشی بود.

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

واژه‌های کلیدی: سیروفلوکسازین، اشریشیا کلی، *recF*، *rpoS* 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 مرگ و میر 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 فلورو 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: سپیروفلوکسازین، 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* (القاگر) و *LexA* (سرکوبگر) تنظیم

می‌شود که این پروتئین‌ها رونویسی از گروه‌های پایین دست شامل ژن‌های SOS (*din³*) 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 مهارتی روی فعالیت *RecA* دارد و با این عمل *RecF*، اثر مهارتی آن خنثی می‌شود (۷). ژن *rpoS* (RNA پلیمراز، سیگما S) پروتئین سیگما ۳۸ (σ^{38}) یا *RpoS* پروتئین ۳۷/۸ کیلودالتونی را در اشریشیا کلی

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

مواد و روش‌ها

در جدول ۱، ویژگی‌های ژنتیکی و فنوتیپی سویه‌های بررسی شده دیده می‌شود. منابع این سویه‌ها پیش از این شرح داده شد (۹) و برای اطمینان از درستی آنها، مقاومت آنها به سیروفلوکسازین اندازه‌گیری شد. به منظور طراحی آغازگرها، ابتدا توالی ژن *rpoS* از سایت NCBI به دست آمد و سپس آغازگرها با نرم‌افزار Gene Runner طراحی شدند؛ همچنین توالی آغازگرهای *gapA* (ژن خانه‌زاد) و شاهد مثبت از مطالعه‌های پیشین به دست آمد (۱۰). ویژگی‌های آغازگرهای استفاده‌شده در مطالعه حاضر در جدول ۲ آمده است.

کدگذاری می‌کند. سیگمافاکتورها، پروتئین‌هایی‌اند که رونویسی را در باکتری تنظیم می‌کنند و در پاسخ به شرایط محیطی مختلف فعال می‌شوند. *rpoS* در اواخر فاز نمایی^۴ رونویسی می‌شود و RpoS تنظیم‌کننده اصلی ژن‌های فاز سکون^۵ است (۸). در شرایط خاص، جایگزینی سیگما ۳۸ در ساختار آنزیم RNA پلیمراز سبب روشن شدن ژن‌هایی مانند ژن *recF* می‌شود.

در مطالعه‌ای که پوراحمد جکتاجی^۶ و پسند^۷ در سال ۲۰۱۶ انجام دادند، بیان ژن‌های *LexA* و *recA* در سویه‌های مقاوم به سیروفلوکسازین باکتری/شریشیا کلی اندازه‌گیری شد و هر دو ژن افزایش بیان نشان دادند (۹). در سویه‌های 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 می‌یابد (۱۱)؛ همچنین با اندازه‌گیری بیان ژن *gyrB* مشخص شده است این ژن افزایش بیانی به اندازه *recF* دارد و برآورد می‌شود *recF* در رشد نمایی از طریق پروموتر اصلی اپرون بیان می‌شود و از پروموتر اختصاصی خود استفاده نمی‌کند (۱۲).

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

نام سویه	ویژگی‌های 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 استفاده‌شده

نوع آغازگر	ترتیب توالی	طول توالی (جفت باز)	اندازه محصول (جفت باز)
<i>rpoS</i> F	5'-ACTGTTAACGCCGAAGAAG-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 به‌کاربردن 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. به‌منظور 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، بیش بیان 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

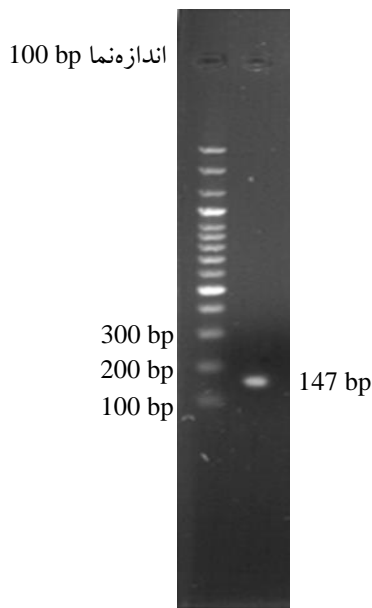
جدول ۴- شرایط دمایی بهینه Real time PCR

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	-

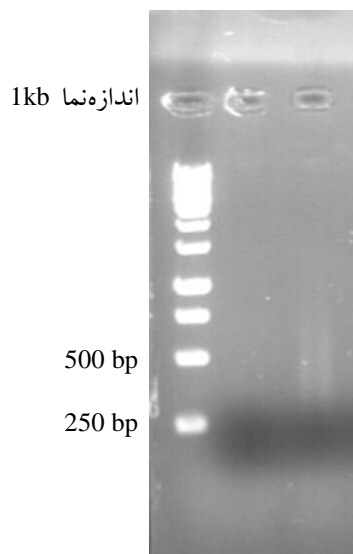
به‌منظور استخراج RNA، ابتدا کشت تازه از استوک سویه جهش‌یافته و تیپ وحشی روی محیط کشت LB آگار تهیه شد. کلنی‌های تک سویه‌های تازه کشت‌شده برای تلقیح در محیط‌های کشت مایع LB استفاده شدند و سپس آنتی‌بیوتیک سیروفلوکسازین به محیط‌های مربوط به سویه جهش‌یافته با مقاومت زیاد اضافه شد و نمونه‌ها در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۸۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پس از سپری شدن مدت زمان لازم، جذب نوری (OD)^۶ 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^۹ همان محیط کشت LB مایع بدون باکتری بود. استخراج RNA نمونه‌های یادشده مطابق دستورعمل کیت RNeasy Plus Mini Kit انجام شد. در راستای اطمینان یافتن از آلوده‌نبودن نمونه‌های RNA به DNA، واکنش PCR به‌منظور 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. به‌منظور سنتز cDNA از کیت یکتاتجهیز (Reverse Transcriptase) RevertAidTM استفاده و تمام مراحل کار طبق دستورعمل 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 بانده 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 بانندی 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 روبه‌روی 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.

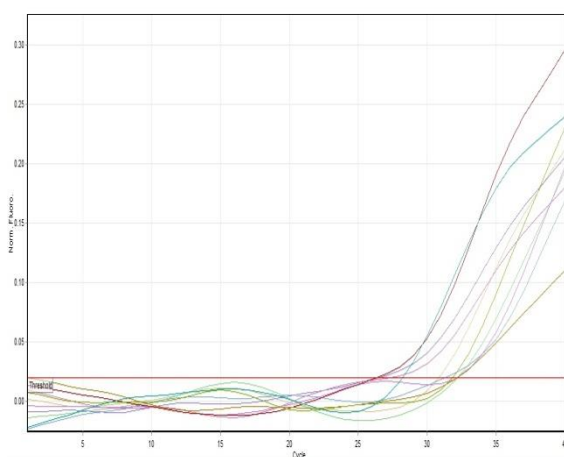
ژن‌هایی که بیان آنها به‌طور چشمگیری با افزایش بیان *rpoS* افزایش می‌یابد، ولی این افزایش بیان خطی نیست (حساس)؛ مانند *astA* با فعالیت کاتالیزوری.

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

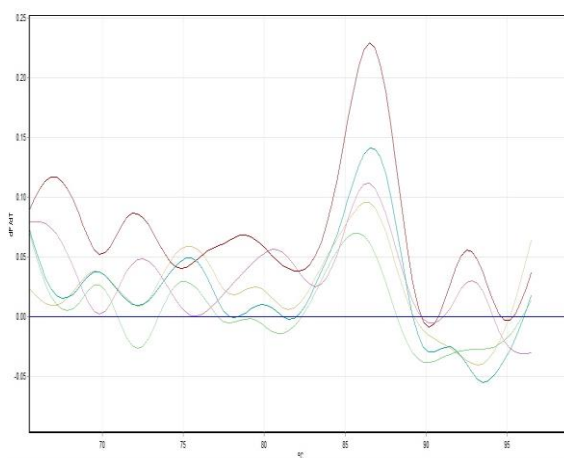
در شرایط خاص، جایگزینی سیگما ۳۸ در ساختار آنزیم رونویسی می‌تواند به روشن شدن ژن‌هایی منجر شود که ژن *recF* از جمله آنها به شمار می‌آید (۱۳).

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 GacA/GacS نیز سبب افزایش بیان *rpoS* 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، بیش‌بیان 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 به‌طور 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 فسفاتار خارج سلولی^{۱۱} انجام می‌دهد. cAMP-CRP تنظیم منفی *rpoS* را بر عهده دارد و در مقابل، BarA سبب تنظیم آن به‌طور مثبت می‌شود. UvrY به‌واسطه 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 *شریشیا کلی* در معرض پرتودهی اشعه UV قرار می‌گیرد، آسیب به DNA سبب ایجاد تک‌رشته‌هایی در ساختار آن می‌شود که متعاقب آن، سیستم SOS و *rpoS* به‌طور جداگانه فعال می‌شوند (۱۵). در پاسخ به شرایط اسیدی، *rpoS* و *DsrA*، *RprA*، *ArcZ* شرکت دارند که نقش این سه sRNA (*ArcZ*، *RprA*، *DsrA*) 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 (۲۰۰۸) 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