



شناسایی ژن‌های موثر جدید در پیشبرد مقاومت به اریترومایسین در کمپیلوباکتر ژژرونی با بهره‌گیری از ابزار بیوانفورماتیکی

مه‌لقا چراغی^۱، نسترن اصغری مقدم*^۱، بی‌تا بخشی^۲

^۱گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز، تهران، ایران

^۲گروه باکتری‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۱

چکیده

آنتی‌بیوتیک‌های ماکرولید برای درمان عفونت‌های ناشی از کمپیلوباکتر ژژرونی مهم هستند. ایجاد مقاومت در برابر این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها در کمپیلوباکتر فرایندی پیچیده توأم با تغییرات مولکولی پویا است که به خوبی تعریف نشده‌اند. در پژوهش حاضر برای پرکردن جای خالی موجود در ارتباط با ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی به درمان با اریترومایسین، پاسخ ترنسکریپتومیک کمپیلوباکتر ژژرونی سویه‌ی NCTC۱۱۱۶۸ به درمان با اریترومایسین (ERY) با روش میکروآرای تعین شد. داده‌های به‌دست‌آمده شناسایی، استخراج و با ابزارهای آنالیز GEO2R و نرم‌افزار R آنالیز شدند. ژن‌های با بیشترین بیان افتراقی با استفاده پارامترهای $p < 0.05$ و $|\text{LogFC}| > 1$ شناسایی شدند. سپس، بیان ژن‌های مرتبط جدا و برای ژن‌های با افزایش بیانی، توسط پایگاه داده STRING شبکه پروتئینی در نظر گرفته شد و با نرم‌افزار Cytoscape رسم شد. با شناسایی ژن‌های مختلف با کاهش و یا افزایش بیان معنادار، مشخص شد مجموعه‌ای از ژن‌های *flaA*, *flaB*, *flgB*, *CmeC*, *sdhA*, می‌توانند در مقاومت آنتی‌بیوتیکی کمپیلوباکتر ژژرونی نسبت به درمان با آنتی‌بیوتیک اریترومایسین نقش داشته باشند. در این مطالعه با بررسی اهداف، اثرگذاری و آنالیز عملکردی این ژن‌ها، راهکارهای مناسبی برای مهار مقاومت ارائه گردید.

کلمات کلیدی: مقاومت آنتی‌بیوتیکی، کمپیلوباکتر ژژرونی، اریترومایسین، میکروآرای

مقدمه

* nas.asgharimoghaddam@iauctb.ac.ir

کمپیلوباکتر ژرونی^۱ یک باکتری گرم منفی، ماریچی شکل، متحرک و عامل اصلی اسهال و آنتریت باکتریایی ناشی از غذا در انسان در سراسر جهان است [۱،۲]. بیشتر عفونت‌های انسانی کمپیلوباکتر ژرونی از مصرف مرغ آلوده، شیر یا آب آلوده و یا دست زدن به آنها ناشی می‌شوند. علائم بالینی کمپیلوباکتریوزیس^۲ می‌تواند از اسهال خفیف تا تب، سردرد، گرفتگی شکم، استفراغ و اسهال خونی متغیر باشد. همچنین، مطالعات نشان داد که عفونت کمپیلوباکتر با سندرم گیلن باره (GBS)^۳ به عنوان یک عارضه پس از عفونت مرتبط است [۳]. اگرچه در اکثر موارد کمپیلوباکتریوزیس خود محدود شونده است، اما ممکن است درمان آنتی‌بیوتیکی برای موارد شدید یا بیماری مزمن، ضروری باشد [۴]. اگرچه، به دلیل کاهش اثربخشی درمانی فلوروکینولون‌ها^۴، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های ماکرولید^۵ (به عنوان مثال، اریترومایسین [ERY]^۶) برای درمان عفونت‌های کمپیلوباکتر در انسان اهمیت بیشتری پیدا کرده‌اند، اما فراوانی مقاومت به این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها در حال افزایش است [۵،۶]. علاوه بر این، برخی از آنتی‌بیوتیک‌های ماکرولید از جمله تایلوزین (TYL)^۷، اریترومایسین (ERY) و تیلیمیکوزین^۸، در تولید مواد غذایی حیوانی و برای درمان و اهداف فرعی درمانی نیز استفاده می‌شوند [۷]. کمپیلوباکتر به عنوان یک پاتوژن مشترک بین انسان و دام، از مسیر غذایی تحت فشار انتخابی ناشی از استفاده ماکرولیدها در دامپزشکی و پزشکی منتقل می‌شود. بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی کمپیلوباکتر ژرونی در مقیاس جهانی به دلایل متعددی حیاتی است. کمک به درک میزان مشکل و شناسایی الگوهای مقاومت در مناطق مختلف یکی از دلایل این بررسی است. این اطلاعات به سازمان‌ها و محققان سلامت اجازه می‌دهد تا استراتژی‌های هدفمندی را برای پیشگیری و کنترل توسعه دهند. علاوه بر این، تحقیقات جهانی عوامل موثر در ایجاد و گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در کمپیلوباکتر ژرونی را روشن می‌کند. با مطالعه مکانیسم

های ژنتیکی زمینه ساز مقاومت، دانشمندان می‌توانند اهداف بالقوه‌ای را برای درمان‌های آینده یا اقدامات پیشگیرانه کشف کنند. همکاری بین کشورها و به اشتراک گذاری داده‌ها برای پیگیری گسترش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و پیش‌بینی چالش‌های آینده ضروری است. تلاش‌های تحقیقاتی چندملیتی همچنین می‌تواند توسعه آنتی‌بیوتیک‌های جدید یا درمان‌های جایگزین موثر علیه کمپیلوباکتر ژرونی را تسهیل کند. برای جلوگیری از ظهور مقاومت به ماکرولیدها، لازم است چگونگی ایجاد مقاومت کمپیلوباکتر نسبت به این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها بررسی شود. به عنوان یک مهارکننده ترجمه پروتئین در سلول‌های باکتریایی، اریترومایسین و سایر آنتی‌بیوتیک‌های ماکرولید با جابجایی آمینواسیل تداخل دارند و از انتقال آن جلوگیری می‌کنند [۸،۹].

مکانیسم مولکولی مقاومت به اریترومایسین در کمپیلوباکتر ژرونی به طور گسترده مطالعه شده است و تا حد زیادی به جهش در ژن 23S rRNA، پروتئین‌های ریبوزومی L۴ و L۲۲ و پمپ فعال افلاکس مربوط می‌باشد. به نظر می‌رسد جهش در پروتئین‌های L۴ و L۲۲ به واسطه‌ی سطوح پایین مقاومت به ERY ($\mu g/ml$ ۱۶ تا ۸، MIC) تا متوسط (۱۲۸ تا $\mu g/ml$ ۱۶، MIC) اتفاق می‌افتد، در حالی که جهش در ژن 23S rRNA با سطح بالای مقاومت در برابر ERY ($\mu g/ml$ ۲۵۶، MIC، $\geq$) همراه است [۱۰،۱۱].

چنین استنباط می‌شود که قرار گرفتن طولانی مدت در معرض آنتی‌بیوتیک‌های ماکرولید برای انتخاب جهش در ژن 23S rRNA مورد نیاز باشد. این امر نشان دهنده وقوع جهش یا تغییرات دیگری در کمپیلوباکتر پیش از وقوع جهش‌های 23S rRNA است [۱۲]. پمپ فعال افلاکس^۹ CmeABC از طریق خروجی چند دارو، مکانیزم دیگری است که باعث مقاومت در برابر ماکرولیدها در کمپیلوباکتر می‌شود [۱۳،۱۴]. مطالعات قبلی نشان داد که با غیر فعال سازی پمپ

^۶ Erythromycin (ERY)

^۷ Tylosin (TYL)

^۸ Tilmicosin (TIL)

^۹ Efflux pump

^۱ *Campylobacter jejuni*

^۲ Campylobacteriosis

^۳ Guillain-Barré syndrome (GBS)

^۴ Fluoroquinolones

^۵ Macrolide

تغییرات قابل توجهی را در بیان سویه ۶۸E۱ مقاوم در برابر ماکرولید سطح پایین نشان دادند. در حالی که، تعداد زیادی از ژن‌ها تغییرات قابل توجهی را در رشته ۶۸E۶۴ مقاوم در سطح میانی و بالا نشان دادند. ژن‌های تنظیم شده در سویه‌های مقاوم در پروتئین‌های پری‌پلاسمیک متفرقه، پمپ افلاکس پروتئین و آمینوترانسفراز احتمالی را ترشح می‌کند، در حالی که، اکثر ژن‌های تنظیم شده پایین در انتقال الکترون، لیوپروتئین، پروتئین شوک حرارتی و پروتئین‌های عملکرد ناشناخته نقش دارند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که تغییر زیادی در سویه کمیپلوباکتر ژرژونی مقاوم به ماکرولید در سطح پایین وجود ندارد. بیان بیش از حد پمپ افلاکس و پروتئین پری پلاسمیک در ایجاد مقاومت به ماکرولید در کمیپلوباکتر ژرژونی نقش داشت.

جمع‌آوری و تجزیه داده‌های میکرواری

در این مرحله با جست‌وجو در پایگاه GEO (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo)، میکرواری مناسب با کلید واژه مقاومت آنتی‌بیوتیکی کمیپلوباکتر ژرژونی به اریترومايسين برای پیدا کردن مطالعات مرتبط در نظر گرفته شد. برای این کلید واژه از میان مطالعات میکرواری، مطالعات غیرحیوانی انتخاب شد و سپس مطالعات غیر مرتبط حذف شدند. کد دسترسی GSE17881 انتخاب و استخراج نتایج آنالیزها و تحلیل آنها انجام شد. پس از تهیه داده‌های خام مربوط به میکرواری مورد بررسی، پیش پردازش اولیه (شامل استاندارد سازی، نرمال‌سازی و حذف داده‌های غیر قابل بررسی) و ارزیابی با استفاده از ابزارهای آنالیز GEO2R و نرم‌افزار R و با کمک پکیج‌هایی مانند ggplot2، Limma انجام شد. با تجزیه کد دسترسی مربوط به داده میکرواری، تعداد ژن‌های مورد نظر شناسایی شدند. تجزیه و بررسی داده‌ها انجام شد و ژن‌ها با در نظر گرفتن سطح معنی‌داری در بیان ($p < 0.05$) و به صورت فهرست ژنی استخراج شدند. در ادامه پارامتر $\text{LogFC} > 1$ برای انتخاب ژن‌های Up-Regulated و $\text{LogFC} < -1$ برای انتخاب ژن‌های Down-Regulated استفاده شد.

افلاکس CmeABC در سویه‌های مقاوم کمیپلوباکتر ژرژونی، CmeABC به‌طور هم‌افزایی با جهش در پروتئین‌های ریبوزومی (GV۴D) L۴ و (درج در موقعیت ۸۶ یا ۹۸) L۲۲ یا در ژن (A۲۰۷۵ G) rRNA ۲۳S برای ایجاد مقاومت ماکرولیدی عمل می‌کند. در کمیپلوباکتر ژرژونی، بیان CmeABC توسط CmeR کنترل می‌شود که به پروموتور CmeABC متصل می‌شود و بیان اپرون پمپ افلاکس را تنظیم می‌کند. علاوه بر CmeABC، مطالعات قبلی پیوسته پیشنهاد می‌کنند که مکانیسم‌های دیگر پمپ افلاکس ممکن است با مقاومت اریترومايسين مرتبط باشند، اما هویت مشکوک افلاکس پمپ‌ها ناشناخته هستند [۱۵، ۱۶، ۱۷]. با وجود درک بهتر از مکانیسم‌های مقاومت ماکرولید در کمیپلوباکتر ژرژونی در مقیاس جهانی، فرایندهای مولکولی تا حد زیادی منجر به تولید مقاومت ناشناخته پایدار در سطح بالا می‌شوند. درک این رویدادهای مولکولی به‌طور بالقوه استفاده بالینی از آنتی‌بیوتیک‌ها و کنترل هدفمند کمیپلوباکتر ژرژونی مقاوم به ماکرولید را تسهیل می‌کند و می‌توان در جهت تلاش برای حفاظت از سلامت عمومی و بهبود توانایی مبارزه با این تهدید باکتریایی از آن استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

با بهره‌بردن از مجموعه روش‌های آنالیز بیوانفورماتیک بر روی داده‌های میکرواری، برای یافتن ژن‌های با بیان متفاوت و تاثیرگذار در پاتوژنز باکتری و مقاومت آنتی‌بیوتیکی، سری‌های متعدد جهش کمیپلوباکتر ژرژونی مقاوم به ماکرولید در شرایط آزمایشگاهی با قرار گرفتن گام به گام کمیپلوباکتر ژرژونی سویه NCTC۱۱۱۶۸ در معرض اریترومايسين و تایلوزین با افزایش غلظت، انتخاب شدند. مجموعه‌ای از سویه‌های مقاوم برای بررسی با تکنیک میکرواری انتخاب شدند. مشخصات رونویسی گلوبال آنالیز شد. در این سری، میکرواری^۱ DNA برای مقایسه پروفایل‌های بیان ژن سویه‌های مقاوم به ماکرولید (۶۸E۶۴، ۶۸E۱، ۶۴E۸) با نوع وحشی سویه NCTC۱۱۱۶۸ استفاده شد. این آزمایش تعداد کمی از ژن‌ها را شناسایی کرد که

^۱ Microarray

بررسی ارتباطات ژنی

برای شناسایی ارتباطات ژنی از جمله تعاملات پروتئین-پروتئین (PPI)^۱ از پایگاه‌های داده‌ای String استفاده شد و در نهایت ماژول‌های عملکردی مورد نظر با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape به‌دست آمدند. از پلاگین Cytohubba برای رسیدن به ژن‌های Hub در شبکه استفاده شد و برای آنالیز و پیدا کردن ماژول‌ها و مهم‌ترین بخش‌های شبکه بیولوژیکی که بیشترین آثار متقابل را داشتند، از پلاگین MCODE استفاده شد. ژن‌های Hub با دو پارامتر درجه^۲ و بینابینی^۳ برای هر شبکه پیدا شدند.

نتایج

پس از جداسازی ژن‌های دارای افزایش و کاهش بیان بین دسته‌های ژنی مختلف مورد بررسی، از آنها برای ترسیم شبکه و بررسی شبکه برهمکنش با سایر ژن‌ها از دیتابیس‌های مختلف استفاده شد و شبکه‌ای از این برهمکنش‌ها ترسیم شد. در این شبکه هر یک از ژن‌های مورد مطالعه علاوه بر برهمکنش با یکدیگر با یک سری از سایر ژن‌ها ارتباط برقرار کردند.

برای انتخاب ماژول‌های برتر با کمک MCODE پارامترهای زیر کمک گرفته شد:

Degree Cutoff = 2

Node Score Cutoff = 0.2

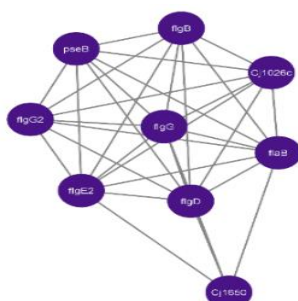
K-Core = 2

Max. Depth = 100

هر دو ماژول عملکردی به واسطه‌ی ژن‌های کلیدی با افزایش بیان شناسایی شده، در مقاومت آنتی‌بیوتیکی اثرگذار می‌باشند و در این زمینه نقش‌های متفاوتی دارند (تصویر ۱ و ۲؛ جدول ۱).



تصویر ۱. ماژول برتر اول



تصویر ۲. ماژول برتر دوم

جدول ۱. ماژول‌ها و ژن‌های عملکردی

اعداد	ماژول ۱	ماژول ۲
۱	<i>flgB</i>	<i>Cj0604</i>
۲	<i>flaB</i>	<i>nr1A</i>
۳	<i>Cj1026c</i>	<i>Cj0358</i>
۴	<i>flgG</i>	<i>sdhB</i>
۵	<i>pseB</i>	<i>sdhA</i>
۶	<i>Cj1650</i>	
۷	<i>flgD</i>	
۸	<i>flgE2</i>	
۹	<i>flgG2</i>	

³ Betweenness

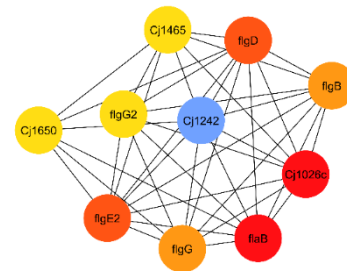
¹ Protein-Protein interaction(PPI)

² Degree

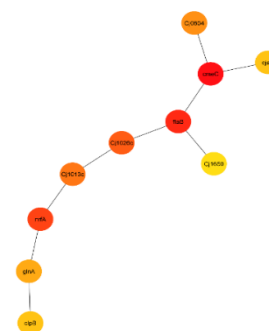
بحث

از زمان تأسیس شبکه‌ی نظارت بر بیماری‌های فعال منتقله از مواد غذایی در ایالات متحده در سال ۱۹۹۶، گونه‌های کمیپلوباکتر به دنبال گونه‌های *سالمونلا*^۲ و *شیگلا*^۳، شایع‌ترین پاتوژن غذایی در انسان تشخیص داده شدند [۱۸]. به دنبال تلاش‌های جهانی و علیرغم کاهش بروز عفونت‌های ناشی از تعدادی از عوامل بیماری‌زای اصلی منتقله از مواد غذایی، عفونت‌های کمیپلوباکتر همچنان در مناطق توسعه یافته و در حال توسعه سراسر جهان از جمله ایالات متحده، اروپا، استرالیا، آفریقا، آسیا و خاورمیانه در حال افزایش هستند. علاوه بر این، کمیپلوباکتر زیستگاه ژن‌های مقاومت ضد میکروبی با قابلیت انتقال افقی بین میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و همسو است، که احتمالاً می‌تواند به ظهور میکروارگانیسم‌های مقاوم به چند دارو منجر شود. بنابراین، محققان گمان می‌کنند در سال‌های آینده کمیپلوباکتر همچنان به‌عنوان تهدیدی برای سلامت عمومی جهانی باقی خواهد ماند. موضوع فعلی نیازمند یک رویکرد چند جانبه برای مداخله و کنترل عفونت‌های کمیپلوباکتر، از جمله شناسایی ژن‌های ضروری دخیل در عملکرد های سلولی یا مسیرهای فرایند متابولیک است [۱۹، ۲۰]. در این مطالعه برای بررسی و شناسایی ژن‌های جدید دخیل در مقاومت آنتی‌بیوتیکی، از رویکرد بیوانفورماتیک بهره برده شده است و به به نظر می‌رسد این دسته از مطالعات بتواند در این حوزه مفید واقع شوند.

کمیپلوباکترها برای مستقر شدن در بدن، ابتدا باید توانایی حرکت به داخل لایه موکوسی پوشاننده سطح سلول‌های روده را داشته باشند. این حرکت توسط تازک قطبی انجام می‌شود و آنها با حرکت مارپیچی به سد روده نفوذ می‌کنند. تازک‌های کمیپلوباکتر ژرئونی به‌صورت پلیمری است که از غلاف خارج شده و از زیر واحد فلاژلین^۴ است. این تازک ها توسط ژن‌های *flaA* و *flaB* که در مجاور هم هستند رمز می‌شوند. ترکیبات موسین روده‌ای، به‌ویژه L-fucose برای کمیپلوباکتر ژرئونی کموتاکتیک هستند و ممکن است



تصویر ۳. ارتباط ژن‌های Hub براساس پارامتر Degree



تصویر ۴. ارتباط ژن‌های Hub براساس پارامتر Betweenness

این نمودارها میزان ارتباط ژن‌های یک GSE را نشان می‌دهند. پارامتر درجه (Degree) یک گره، تعداد گره‌هایی است که با آن گره در همسایگی مستقیم قرار دارند. هرچه درجه یک گره بیشتر باشد، اهمیت آن گره بیشتر می‌شود (تصویر ۳).

پارامتر بینایی^۱ به تعداد دفعاتی اشاره دارد که یک گره یا یک یال بر روی کوتاه‌ترین مسیر نودهای مختلف یک گراف قرار دارد. در حقیقت، این معیار محاسبه می‌کند که چه تعداد از نودهای شبکه ژنی برای ارتباط سریعتر باهم و با واسطه‌ی کمتر، به این نود نیاز دارند. هر چه بینایی نود زیادتر باشد، به این معنا است که این نود در مکان استراتژیک‌تری قرار گرفته است (تصویر ۴).

با توجه به آنالیزهای انجام شده و نتایج حاصل، از بین ژن‌های موجود تعداد شش ژن با نام‌های *flaA*, *flaB*, *flgB*, *CmeC*, *sdhA*, *sdhB* جدا شدند و به‌صورت اختصاصی مطالعه و بررسی شدند.

^۳ *Shigella*

^۴ Flagellin

^۱ Betweenness

^۲ *Salmonella*

حرکت به طرف این اجزاء در بیماری‌زایی آن مهم باشد [۲۱، ۲۲]. ژن *flaB* یک ژن کدکننده فلاژلین است [۲۳، ۲۴]. در حالی که، پروتئین‌های فلاژلین کمپیلوباکتر ژرژونی FlaA و FlaB به‌طور همزمان رونویسی می‌شوند، ژن *flaA* توسط σ^{28} و ژن *flaB* توسط σ^{54} تنظیم می‌شود [۲۵، ۲۶]. لی^۱ و همکاران (۲۰۲۱) اشاره کردند که یک ایزوله کمپیلوباکتر ژرژونی فاقد σ^{28} که توسط ژن *fliA* کدگذاری می‌شود، قادر به تشکیل یک رشته کوتاه متشکل از پروتئین فلاژلین FlaB است [۲۷]. نتیجه‌ی مطالعه‌ی لی نشان داد که نحوه‌ی تنظیم بیان ژن‌های تاژک در کمپیلوباکتر ژرژونی با تنظیم آن در سیستم‌هایی که بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، مانند *سالمونلا انتریکا*^۲ متفاوت است. بر خلاف بیان ژن تاژک در کمپیلوباکتر ژرژونی، بیان ژن تاژک در *سالمونلا انتریکا* توسط یک تنظیم‌کننده اصلی آغاز می‌شود. در حالی که σ^{28} ، برای بیان مستمر ژن‌های تاژک مورد نیاز است [۲۷، ۲۸]. بنابراین، ژن *flaB*، یک ژن مهم در باکتری‌های حرکتی است که نقش بسیاری در حرکت و موتیلیتی‌های باکتری دارد. به نظر می‌رسد از اولین تمهیدات باکتری برای مواجهه با محیط دارای آنتی‌بیوتیک، فرار باکتری است که با بیان بیشتر ژن‌های مربوط به ساخت فلاژل انجام می‌شود.

ژن *flgB* جزء ساختاری تاژک، دستگاه حرکت باکتری و بخشی از ساختار میله‌ای جسم پایه‌ای تاژک‌دار است. جسم پایه‌ای بخش عمده اندامک تاژک را تشکیل می‌دهد و از تعدادی حلقه تشکیل شده است که بر روی یک میله مرکزی نصب شده‌اند. جسم پایه‌ای هر دو غشای داخلی و خارجی را پوشش می‌دهد [۲۹]. نقش کلیدی این ژن در تشکیل و مونتاژ تاژک در سایر باکتری‌ها از جمله *باسیلوس سرئوس*^۳ اثبات شده است [۳۰]. همچنین، این ژن در تنظیم تحرک و حدت نقش دارد، زیرا به‌طور هماهنگ با سایر ژن‌های تاژک تنظیم می‌شود و مسئول ترشح پروتئین‌های حدت از کمپیلوباکتر ژرژونی است که برای پاتوژن‌ز آن مهم هستند [۳۱]. در باکتری‌های *سودوموناس آنروژینوزا*^۴ و *کلستریدیوم*

دیفیسل^۵ نیز تغییر بیان این ژن در مواجهه با استرس اکسیداتیو مشاهده می‌شود و با توجه به مقاوم بودن این سویه‌ها، با سویه‌ی مورد بررسی در مطالعه حاضر همراستا هستند [۳۲، ۳۳]. به‌طور کلی، ژن‌های *flaA*، *flaB*، *flgB* و سایر ژن‌های دخیل در دستگاه حرکتی به‌ویژه تاژک می‌توانند با تنظیم تحرک، ترویج پراکندگی باکتری‌ها، فرار از پاسخ‌های ایمنی میزبان و کلون‌سازی، به زنده ماندن و مقاومت آنتی‌بیوتیکی کمپیلوباکتر ژرژونی کمک کنند.

CmeABC جزء ABC ترانسپورترها است که در خروج دارو در باکتری‌ها و کمک قابل توجه به مقاومت ذاتی و اکتسابی باکتری کمپیلوباکتر ژرژونی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های متنوع از جمله فلوروکینولون‌ها و ماکرولیدها، با کاهش تجمع داروها در آن نقش دارد. کمپلکس سه جانبه CmeABC شامل غشای خارجی کانال یا CmeC، CmeB یا غشای داخلی انتقال‌دهنده دارویی و بخش ادغام شده با غشای پریپلاسمیک پروتئین یا CmeA می‌باشد. علاوه بر ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی، CmeABC نقش مهمی در مقاومت صفرا و کلونیزاسیون دارد. به‌عنوان یک پاتوژن روده‌ای، و با توجه به وجود اسیدهای صفراوی در روده، کمپیلوباکتر ژرژونی باید توانایی سازگاری در دستگاه روده حیوانات را داشته باشد [۳۴، ۳۵].

نشان داده شده است که دریچه‌ی کانال CmeC در سطح غشای خارجی و نیز در انتهای فضای پری‌پلاسمیک بسته است. از این موضوع می‌توان نتیجه گرفت که این کانال دو دریچه را برای عبور و مرور مواد تشکیل می‌دهد که در خارج کردن مواد مختلف نظیر آنتی‌بیوتیک‌ها از فضای سیتوپلاسمی به کار می‌روند [۳۶]. به‌طور کلی، ژن *cmeC* با تنظیم پمپ‌های خروجی علاوه بر فرار از واکنش دفاعی، نقش مهمی در مقاومت ضد میکروبی و خارج کردن مواد آنتی‌بیوتیکی وارد شده به سلول بازی می‌کند. وجود و تنوع این ژن در بسیاری از گونه‌های باکتری ثابت شده است و به توانایی کمپیلوباکتر

⁴ *Pseudomonas aeruginosa*

⁵ *Clostridium difficile*

¹ Hee Jung Lee

² *Salmonella enterica*

³ *Bacillus cereus*

(*sdhABC*)، در بیوفیلیم‌های استافیلوکوکوس اورئوس^۵ تنظیم مثبت می‌شوند. برای مطالعه بهتر نقش این کمپلکس آنزیمی، سویه‌ای جهش یافته (*sdh*) از حذف ژن‌های (*sdhABC*)، ساخته شد. نوع جهش یافته در مقایسه با نوع وحشی، در رشد تحت شرایط هوازی دچار اختلال شد. کاهش رشد در زیرشرایط هوازی به دلیل قطع چرخه TCA است که با تجمع سوکسینات و اسید استیک همراه بود. نتایج نشان داد چرخه TCA برای کاتابولیسم استات و اسید آمینه مورد نیاز است و تجزیه و تحلیل سلول‌های رشد یافته در محیط شیمیایی تعریف شده، کاهش متابولیسم را نشان داد [۴۲].

آدولف^۸ و همکاران (۲۰۲۲)، طی مطالعه‌ای روی مایکوباکتریوم توبریکلوزیس^۹ که با از بین بردن ژن‌های *sdhA1* و *sdhA2* با هدف جلوگیری از اکسیداسیون سوکسینات و غلبه برافزونی عملکردی در این ژن‌ها و رشد بهینه انجام شد، دریافتند فعالیت زنجیره تنفسی به طور قابل توجهی با حذف ترکیب ضروری *sdhA1* و *sdhA2* مختل شد و از رشد در طیف وسیعی از منابع کربن جلوگیری کرد. علاوه بر این، مشاهده شد مختل شدن اکسیداسیون سوکسینات بر فعالیت آنتی‌بیوتیک‌های هدف گیرنده دیواره سلولی و مهارکننده‌های انرژی زیستی تأثیر می‌گذارد. این داده‌ها با هم، بینش‌های اساسی در مورد متابولیسم انرژی و حساسیت ضد میکروبی در مایکوباکتریوم توبریکلوزیس ارائه کرد [۴۳].

کمیپلوباکتر ژرئونی تمام آنزیم‌های لازم برای یک چرخه اسید تری‌کربوکسیلیک (TCA) اکسیداتیو کامل را کد می‌کند. به دلیل ناتوانی در استفاده از گلوکز، کمیپلوباکتر ژرئونی منحصراً به اسیدهای آمینه به عنوان منبع کربن کاهش یافته متکی است و آنها در متابولیسم کربن مرکزی گنجانده می‌شوند. اکسیداسیون سوکسینات به فوهارات یک مرحله کلیدی در چرخه TCA اکسیداتیو است. درک بهتر چرخه TCA در کمیپلوباکتر ژرئونی ممکن است به شناسایی

در ایجاد مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر عوامل ضد میکروبی کمک می‌کند.

پروتئین SdhA با نام زیر واحد فلاووپروتئین سوکسینات دهیدروژناز^۱ توسط اگزالواستات^۲ مهار می‌شود. SdhB با نام سوکسینات دهیدروژناز پروتئینی دارای زیر واحد آهن-گوگرد^۳ است. این دو در تبدیل فوهارات به سوکسینات فعالیت دارند و در مسیرهای زیستی نظیر چرخه اسید تری کربوکسیلیک (TCA) نقش بازی می‌کنند. محصولات دو ژن *sdhA* و *sdhB* در غشاء پلاسمایی، فعالیت‌های سلولی و مولکولی مانند فعالیت اکسیدو ردوکتاز و تولید متابولیت‌های پیش‌ساز و انرژی را پیش می‌برند. این ژن‌ها تکمیل‌کننده آنزیم سوکسینات دهیدروژناز هستند. ژن‌های *sdhA* و *sdhB* بخشی از یک کمپلکس آنزیمی با چهار زیر واحد است. این زیر واحدها، یک فلاووپروتئین، یک آهن-گوگرد، سیتوکروم b-۵۵۶ و یک پروتئین لنگر آب‌گریز است که کمپلکس تترامری تشکیل می‌دهد. این زیر واحدها می‌توانند با *sdhE* تشکیل پیوند دهند [۳۷، ۳۸، ۳۹]. در مطالعه‌ای که توسط استینزی^۴ و همکاران (۲۰۰۸) انجام شد کمیپلوباکتر ژرئونی سویه NCTC ۱۱۱۶۸ تحت شرایط اسیدی خفیف شبیه به شرایط روده، رشد داده شد. رشد در pH برابر ۵/۵ و قرار گرفتن در معرض شوک اسیدی منجر به تنظیم پایین زیر واحدهای سوکسینات دهیدروژناز (*sdhAB*) شد [۴۰].

اسید تری‌کربوکسیلیک^۵ یا چرخه (TCA) نقش مرکزی در متابولیسم دارد. بسیاری از مواد مغذی مانند قندها، اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب می‌توانند به واسطه TCA متابولیزه شوند و در چندین دوره وارد این چرخه شوند. فعالیت چرخه TCA با اثرات متفاوتی مانند بقا، حدت و تولید ماده لجن بیوفیلیم اصلی و چسب بین سلولی پلی‌ساکارید (PIA) همراه بوده است [۴۱]. گوتز^۶ و همکاران (۲۰۱۰)، در مطالعه‌ای اثبات کردند در چرخه‌ی اسید تری‌کربوکسیلیک (TCA)، ژن‌های مختلفی به‌ویژه ژن‌های سوکسینات دهیدروژناز

^۵ Tricarboxylic acid

^۶ Friedrich Gotz

^۷ *Staphylococcus aureus*

^۸ Cara Adolph

^۹ *Mycobacterium tuberculosis*

^۱ Succinate Dehydrogenase Complex Flavoprotein Subunit A (*sdhA*)

^۲ Oxaloacetate

^۳ Succinate Dehydrogenase Complex Iron Sulfur Subunit B (*sdhB*)

^۴ Alain Stintzi

و البته تعیین میزان اثرگذاری هر یک از این ژن‌ها نیازمند مطالعات آزمایشگاهی و تخصصی‌تری می‌باشد. به‌طور کلی، این مطالعه قدرت بیوانفورماتیک را در تجزیه و تحلیل داده‌های بیولوژیکی پیچیده و کشف بازیگران مولکولی کلیدی جدید در پاسخ‌های باکتریایی به عوامل استرس‌زای محیطی نشان می‌دهد. تحقیقات بیشتر در این زمینه درک ما از پاتوژن کمپیلوباکتر ژرونی را افزایش می‌دهد و به توسعه اقدامات کنترلی مؤثرتر برای کاهش تأثیر این باکتری بر سلامت انسان کمک می‌کند.

منابع

1. Jorgensen F, Ellis-Iversen J, Rushton S, Bull SA, Harris SA, Bryan SJ, Gonzalez A, Humphrey TJ: Influence of season and geography on *Campylobacter jejuni* and *C. coli* subtypes in housed broiler flocks reared in Great Britain. *Appl Environ Microbiol* 2011, 77(11):3741–3748.
2. Chen J, Sun XT, Zeng Z, Yu YY: *Campylobacter enteritis* in adult patients with acute diarrhea from, 2005 to 2009 in Beijing, China. *Chin Med J (Engl)* 2011, 124(10):1508–1512
3. Koga M, Gilbert M, Takahashi M, Li J, Koike S, Hirata K, Yuki N: Comprehensive analysis of bacterial risk factors for the development of Guillain-Barre syndrome after *Campylobacter jejuni* enteritis. *J Infect Dis* 2006, 193(4):547–555
4. Skirrow MBM: Clinical aspects of *Campylobacter* infection. 2nd edition. Washington, DC: ASM Press; 2000.
5. Engberg J, Aarestrup FM, Taylor DE, Gerner-Smidt P, Nachamkin I: Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerg Infect Dis* 2001, 7(1):24–34.
6. Gibreel A, Taylor DE: Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Antimicrob Chemother* 2006, 58(2):243–255.
7. McEwen SA, Fedorka-Cray PJ. 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin. Infect. Dis.* 34(Suppl 3):S93–S106.
8. Gibreel A, Taylor DE. 2006. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 58:243–255.
9. Lévesque S, Frost E, Michaud S. 2007. Comparison of antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from humans, chickens, raw milk, and environmental water in Quebec. *J. Food Prot.* 70:729–735.
10. Luangtongkum T, Jeon B, Han J, Plummer P, Logue CM, Zhang Q. 2009. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission
11. Lin J, Yan M, Sahin O, Pereira S, Chang YJ, Zhang Q. 2007. Effect of macrolide usage on

مسیرهای متابولیک حیاتی برای توانایی رشد کمپیلوباکتر ژرونی کمک کند. در مطالعات انجام شده نشان داده شد که در این باکتری آنزیم‌های SdhA و SdhB به فعالیت فومارات ردوکتاز در چرخه TCA و تنفس کمک می‌کنند [۴۴،۴۵]. بر اساس اطلاعات موجود، مشخص نیست که آیا ژن‌های *sdhB* و *sdhA* مستقیماً به مقاومت آنتی‌بیوتیکی در کمپیلوباکتر ژرونی کمک می‌کنند یا خیر. اما نقش آنها در مقاومت آنتی‌بیوتیکی سایر باکتری‌ها از گذشته اثبات شده است. با این حال، این ژن‌ها در متابولیسم انرژی نقش دارند که عامل مهمی در بقا و کلونیزاسیون و پاتوژن کمپیلوباکتر ژرونی هستند و به نظر می‌رسد توجه به این زیرواحدهای فراموش شده می‌تواند در توسعه و طراحی داروهای جدید مهم باشد.

بررسی الگوی بیان ژن‌های مختلف که نقش فعالی در مقاومت آنتی‌بیوتیکی دارند، از گذشته تا امروز قابل توجه بسیاری از محققین است، زیرا شناسایی ژن‌های مرتبط با پتانسیل تبدیل شدن به اهداف جدید برای تولید آنتی‌بیوتیک‌ها یا واکسن‌های جدید، می‌تواند به کشف نقاط ضعف در مسیرهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بهبود روش‌های درمانی برای کنترل عفونت‌های کمپیلوباکتر ژرونی کمک کند. به‌طور کلی استفاده از اطلاعات پایگاه‌های داده‌های مختلف و به‌کار بردن روش‌های نوین آنالیز، مانند میکروآرای و RNA-Seq، راهکاری سریع و مطمئن برای ارزیابی بیان ژن‌های مختلف در شرایط خاص است.

نتیجه‌گیری

مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌عنوان یک مشکل جهانی شناخته شده است. به‌طور کلی، در پژوهش حاضر مجموعه‌ای از ژن‌های جدید شناسایی شدند که با استفاده از تجزیه و تحلیل داده‌های بیان ژنی میکروآرای، نقش مهم آن‌ها چه به‌صورت مستقیم و چه غیر مستقیم در مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داده شد. ماژول‌های شناسایی شده‌ی ۱ و ۲ به‌ترتیب ۹ و ۵ ژن داشتند که مهم‌ترین ژن‌ها، *flaA*، *flaB*، *flgB*، *CmeC*، *sdhA*، *sdhB* را شامل می‌شد. ارتباط این ژن‌ها با یکدیگر برای زنده ماندن باکتری و ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها مشخص شد

24. Nuijten, P.J. et al. (1990) Structural and functional analysis of two *Campylobacter jejuni* flagellin genes. *J. Biol. Chem.* 265, 17798–17804.
25. Guerry, P. (2007). *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends in Microbiology*, 15(10), 456–461.
26. Hendrixson, D.R. and DiRita, V.J. (2003) Transcription of σ_{54} dependent but not σ_{28} dependent flagellar genes in *Campylobacter jejuni* is associated with formation of the flagellar secretory apparatus. *Mol. Microbiol.* 50, 687–702.
27. Hendriksen, J. J., Lee, H. J., Bradshaw, A. J., Namba, K., Chevance, F. F. V., Minamino, T., & Hughes, K. T. (2021). Genetic Analysis of the Salmonella FlhE Protein That Forms the Base of the Flagellar Axial Structure. *MBio*, 12(5), 1–15. <https://doi.org/10.1128/mBio.02392-21>
28. Aldridge, P., and K. T. Hughes. 2002. Regulation of flagellar assembly. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:160–165
29. Macnab, R.M., 2003. How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 77–100.
30. Zhu, G. Y., Sha, P. F., Zhu, X. X., Shi, X. C., Shahriar, M., Zhou, Y. D., Wang, S. Y., & Laborda, P. (2021). Application of melatonin for the control of food-borne *Bacillus* species in cherry tomatoes. *Postharvest Biology and Technology*, 181(July), 111656.
31. Chen, H., Ji, P. C., Qi, Y. H., Chen, S. J., Wang, C. Y., Yang, Y. J., Zhao, X. Y., & Zhou, J. W. (2023). Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by thymoquinone in combination with nisin. *Frontiers in Microbiology*, 13(January), 1–17.
32. McKee, R. W., Harvest, C. K., & Tamayo, R. (2018). Cyclic Diguanylate Regulates Virulence Factor Genes via Multiple Riboswitches in *Clostridium difficile*. *MSphere*, 3(5). <https://doi.org/10.1128/msphere.00423-18>
33. Kovács, J. K., Cox, A., Schweitzer, B., Maróti, G., Kovács, T., Fenyvesi, H., Emody, L., & Schneider, G. (2020). Virulence traits of inpatient *campylobacter jejuni* isolates, and a transcriptomic approach to identify potential genes maintaining intracellular survival. *Microorganisms*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040531>
34. Lin J, Michel LO, Zhang Q (2002) CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother* 46:2124–2131.
35. Lin J, Sahino O, Michel LO, Zhang Q (2003) Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and in vivo colonization of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 71:4250–4259.
36. Su, C. C., Radhakrishnan, A., Kumar, N., Long, F., Bolla, J. R., Lei, H. T., Delmar, J. A., Do, S. V., Chou, T. H., Rajashankar, K. R., Zhang, Q., & Yu, E. W. (2014). Crystal structure of the *Campylobacter jejuni* CmeC outer membrane channel. *Protein Science*, 23(7), 954–961.
- emergence of ERYthromycin-resistant *Campylobacter* isolates in chickens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:1678–1686.
12. Guo B, Wang Y, Shi F, Barton YW, Plummer P, Reynolds DL, Nettleton D, Grinnage-Pulley T, Lin J, Zhang Q: CmeR functions as a pleiotropic regulator and is required for optimal colonization of *Campylobacter jejuni* in vivo. *J Bacteriol* 2008, 190(6):1879–1890.
13. Mamelli L, Prouzet-Mauleon V, Pages JM, Megraud F, Bolla JM. 2005. Molecular basis of macrolide resistance in *Campylobacter*: role of efflux pumps and target mutations. *J. Antimicrob. Chemother.* 56:491–497.
14. Cagliero C, Mouline C, Payot S, Cloeckeaert A. 2005. Involvement of the CmeABC efflux pump in the macrolide resistance of *Campylobacter coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 56:948–950.
15. Cagliero C, Mouline C, Cloeckeaert A, Payot S. 2006. Synergy between efflux pump CmeABC and modifications in ribosomal proteins L4 and L22 in conferring macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:3893–3896.
16. Gibreel A, Wetsch NM, Taylor DE. 2007. Contribution of the CmeABC efflux pump to macrolide and tetracycline resistance in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:3212–3216.
17. Lin J, Akiba M, Sahin O, Zhang Q. 2005. CmeR functions as a transcriptional repressor for the multidrug efflux pump CmeABC in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:1067–1075.
18. Skirrow, M. B., and M. J. Blaser. 2000. Clinical aspects of *Campylobacter* infection, p. 66–88. In M. J. Nachamkin and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
19. Kaakoush NO, Castano-Rodriguez N, Mitchell HM, Man SM. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):687–720.
20. Epps SV, Harvey RB, Hume ME, Phillips TD, Anderson RC, Nisbet DJ. Foodborne *Campylobacter*: infections, metabolism, pathogenesis and reservoirs. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10(12):6292–304
21. Szymanski CM, King M, Haardt M, Armstrong GD, *Campylobacter jejuni* motility and invasion of Caco-2 cells, *Infection and Immunity* 1995; 63:4295–4300.
22. Hugdahl MB, BeERY JT, Doyle MP. Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity* 1988; 56:1560–66.
23. Guerry, P. et al. (1991) Role of two flagellin genes in *Campylobacter* motility. *J. Bacteriol.* 173, 4757–4764

- increases during tricarboxylic acid cycle stress. *Journal of Bacteriology*, 187(9), 2967–2973. <https://doi.org/10.1128/JB.187.9.2967-2973.2005>
42. Gaupp, R., Schlag, S., Liebeke, M., Lalk, M., & Götz, F. (2010). Advantage of upregulation of succinate dehydrogenase in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal of Bacteriology*, 192(9), 2385–2394.
43. Adolph, C., McNeil, M. B., & Cook, G. M. (2022). Impaired Succinate Oxidation Prevents Growth and Influences Drug Susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *MBio*, 13(4), 1–18. <https://doi.org/10.1128/mbio.01672-22>
44. Weingarten, R. A., Taveirne, M. E., & Olson, J. W. (2009). *The Dual-Functioning Fumarate Reductase Is the Sole Succinate: Quinone Reductase in Campylobacter jejuni and Is Required for Full Host Colonization*. 191(16), 5293–5300.
45. Juhnke, H. D., H. Hiltcher, H. R. Nasiri, H. Schwalbe, and C. R. Lancaster. 2009. Production, characterization, and determination of the real catalytic properties of the putative ‘succinate dehydrogenase’ from *Wolinella succinogenes*. *Mol. Microbiol.* 71:1088–110
37. Yankovskaya V, Horsefield R, Törnroth S, Luna-Chavez C, Miyoshi H, Léger C, et al. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science*. 2003;299(5607):700-4.
38. Ruprecht J, Yankovskaya V, Maklashina E, Iwata S, Cecchini G. Structure of *Escherichia coli* succinate:quinone oxidoreductase with an occupied and empty quinone-binding site. *J Biol Chem*. 2009;284(43):29836-46.
39. Maklashina E, Rajagukguk S, Starbird CA, McDonald WH, Koganitsky A, Eisenbach M, et al. Binding of the Covalent Flavin Assembly Factor to the Flavoprotein Subunit of Complex II. *J Biol Chem*. 2016;291(6):2904-16.
40. Mutagenesis, G., Reid, A. N., Pandey, R., Palyada, K., Whitworth, L., Doukhanine, E., & Stintzi, A. (2008). *Identification of Campylobacter jejuni Genes Contributing to Acid Adaptation by Transcriptional Profiling and*. 74(5), 1598–1612.
41. Vuong, C., Kidder, J. B., Jacobson, E. R., Otto, M., Proctor, R. A., & Somerville, G. A. (2005). *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin production significantly

Identification of new effective genes in promoting Erythromycin resistance in *Campylobacter jejuni* by using bioinformatics tools

Mahlagha Cheraghi¹, Nastaran Asghari Moghaddam^{1*}, Bitā Bakhshi²

¹ Master student, Department of Biology Faculty of convergent sciences & technologies, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

¹ Assistant professor, Department of Biology, Faculty of convergent sciences & technologies, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Professor, Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Abstract

Macrolide antibiotics are important for the treatment of *Campylobacter jejuni* infections. Resistance to this class of antibiotics in *Campylobacter* is a complex process with dynamic molecular changes that are not well defined. In the present study, to fill the gap related to antibiotic resistance to Erythromycin treatment, the transcriptomic response of *Campylobacter jejuni* strain NCTC11168 to Erythromycin (ERY) treatment was determined by microarray method. The obtained data were identified, extracted and analyzed with GEO2R online tools and R software. Genes with the highest differential expression were identified by using parameters $P < 0.05$ and $LogFC > 1$. Then, the expression of the related genes was separated and for the genes that had an increase in expression, the protein network was predicted through the STRING database and visualized with the Cytoscape software. By identifying different genes that had a significant decrease or increase in expression, it was found that a set of *flaA*, *flaB*, *flgB*, *CmeC*, *sdhA*, *sdhB* genes can play a role in the antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* to the treatment with Erythromycin antibiotic. In this study by examining the goals, effectiveness and functional analysis of these genes, suitable solutions to curb the resistance were presented.

Key words: Antibiotic resistance, *Campylobacter jejuni*, Erythromycin, Microarray

* nas.asgharimoghaddam@iauctb.ac.ir