



ارزیابی رخداد احتمالی موتاسیون در ژن‌های سیستم ترمیم MMR در سویه‌های کلینیکی مقاوم و حساس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از روش توالی‌یابی

امیرپویان افضلی^۱، محمد ارجمندزادگان^۲، اعظم احمدی^{۳*}، سیدحسین حسینی^۱، منیژه کهبازی^۴، مجتبی توشه^۵

^۱ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی اراک

^۲ مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

^۳ گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس تهران و مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

^۴ مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، گروه اطفال، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

^۵ گروه سلولی مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اصفهان

(دریافت مقاله: ۹۳/۱۰/۵ - پذیرش مقاله: ۹۴/۴/۱)

چکیده

زمینه: طی سال‌های اخیر، بروز و گسترش مقاومت دارویی در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، باکتری مولد سل، این بیماری را در اولویت‌های سازمان بهداشت جهانی هم‌ردیف بیماری‌هایی مانند ایدز و هیپاتیت قرار داده است. بررسی دقیق ژنوتیپ سویه‌های کلینیکی مقاوم و حساس برای غلبه بر مقاومت دارویی ایجاد شده ضرورت دارد. از میان سیستم‌های متعدد ترمیم تنها تعداد محدودی ژن کد کننده آنزیم‌های ترمیم DNA در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس وجود دارد. این ژنها عموماً حفاظت شده‌اند و هر گونه تغییر در آنها احتمالاً باعث افزایش رخداد موتاسیون به دلیل عدم تصحیح موتاسیون‌های خود به خودی در سویه‌های حساس این باکتری می‌شوند. ژن‌های *mut* آنزیم‌های ترمیم کننده DNA را کد می‌کنند. در این مطالعه موتاسیون در این ژن‌ها و تأثیر این موتاسیون در ایجاد مقاومت دارویی توبرکلوزیس بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق از ۲۹ نمونه کلینیکی موجود، ۸ سویه حساس و ۲۱ سویه مقاوم انتخاب و پس از سفارش پرایمرهای مناسب و انجام واکنش تکثیر دو نوع آپلیکون شامل قطعاتی از ژن‌های *mut T2* و *mut T4* تولید و به منظور توالی‌یابی ارسال شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پرایمر نشان دهنده انتخاب مناسب پرایمرهای مورد بررسی بود. نتایج توالی‌یابی نشان داد در مجموع ۷۳ درصد سویه‌های مقاومی که برای بررسی ژن *mut T4* انتخاب شده بودند، فاقد جهش در کدون ۴۸ ژن *mut T4* و ۷۰ درصد از سویه‌های مقاوم نیز فاقد موتاسیون *GGA>>>CGA* در محل کدون ۵۸ از ژن *mut T2* بودند.

نتیجه‌گیری: یکی از راهکارهای غلبه بر مقاومت دارویی سل بررسی دقیق ژنوتیپ سویه‌های بالینی مقاوم و حساس است. نتایج این مطالعه با بررسی تغییر در توالی ژن‌های *mut T2* و *mut T4* انجام گرفت. موتاسیون در *mut T2* همیشه مرتبط با موتاسیون در *mut T4* است به این صورت که اولین موتاسیون ممکن است در *mut T4* و پس از آن موتاسیون دوم در *mut T2* رخ می‌دهد. اهمیت این امر با بررسی پروتئین‌های کد شده توسط این دو ژن و حالت قرارگیری *mut t4* نسبت به *mut T2* در ساختار فضایی کمپلکس پروتئینی MUTHLS مشخص می‌گردد. نتایج مقایسه بررسی مقاومت دارویی و وجود موتاسیون در *hot-spot* ژن‌های *mut T2* و *mut T4* حاکی از کاتزرو بودن ژن‌های مورد مطالعه در سویه‌های مقاوم است. هرچند در سویه‌های حساس این ارتباط بی‌معنا است.

واژگان کلیدی: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، PCR، *mut T2*، تعیین توالی

* اراک، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اراک

مقدمه

علیرغم اینکه سیستم ترمیمی عدم تطابق Mut HLS در میان پروکاریوت‌ها پراکندگی بسیار بالا و توالی کاملاً حفاظت شده‌ای دارد اما در این باکتری با مکانیسم رایج وجود ندارد و این باکتری دارای سیستم‌های دیگری نیز برای ترمیم ژنوم می‌باشد (۲).

مقاومت به داروها به‌طور گسترده‌ای به علت موتاسیون در ژن‌های خاص است (۳). در بسیاری از باکتری‌ها فنوتیپ‌های جهش یافته عمدتاً در اثر نقص در ترمیم DNA رخ می‌دهد (۴). در ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس وقوع چند SNP در ژن‌های ترمیم کننده DNA گزارش شده است که ممکن است به برخی از آنها توانایی سازگاریبه ویژه هنگام قرارگیری در معرض دارو بدهد (۵ و ۶).

به عنوان مثال وقوع برخی از موتاسیون‌های مشخص missense در سویه‌های Beijing که در ژن‌های mut T4، T2 و ogt وجود دارد موجب شده که این ژنوتیپ به دارو مقاوم شود و در برخی از کشورها این سویه جزء باکتری‌های MDR باشد (۷ و ۸). همچنین حضور SNP مشخصی در ژن‌های mut T3 و ogt با ژنوتیپ Haarlem ارتباط نزدیکی دارند (۶). مطالعات انجام شده حاکی از این است که موتاسیون در mut T2 همیشه مرتبط با موتاسیون در mut T4 است به این صورت که اولین موتاسیون ممکن است در mut T4 و پس از آن موتاسیون دوم در mut T2 یا ogt رخ دهد (۹ و ۱۰). در این تحقیق وقوع تغییرات در دو ژن mut T2 (NC_009525.1) و mut T4 (NC_000962.3) با استفاده از روش مولکولی PCR و تعیین توالی (Sequencing) در سویه‌های کلینیکی مقاوم و حساس مورد بررسی قرار گرفت.

طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی حدود یک سوم جمعیت جهان آلوده به پاتوژن مولد سل، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، و در خطر ابتلا به این بیماری هستند. بیشترین موارد ابتلا و حدود ۹۰ درصد موارد بیماری و مرگ در کشورهای در حال توسعه رخ می‌دهد. برخلاف پیشرفت قابل توجهی که در سطح بهداشت و زندگی مردم به وجود آمده و برخلاف توسعه قابل توجهی که در علوم پزشکی رخ داده این بیماری همچنان به عنوان یک معضل باقی مانده است. با توجه به اهمیت بیماری سل و مقاومت فزاینده و نوظهور آن اهمیت مبارزه و شناخت باکتری مولد آن به خوبی روشن می‌شود. نکته مهمی که در مبارزه با این پاتوژن وجود دارد مسئله مقاومت دارویی آن است و این امر مبارزه با این باکتری را بسیار مشکل کرده است، چرا که ظهور سویه‌های MDR و XDR باعث شده که داروها بر آنها بی‌اثر باشند و نیاز به داروهای جدید احساس شود (۱).

یکی از مهم‌ترین عواملی که به بروز سویه‌های مقاوم به دارو منجر شده، وقوع جهش در باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است. وجود جهش در باکتری‌ها در اثر عوامل مختلفی رخ می‌دهد این عوامل یا در اثر وجود موادی در محیط خارج باکتری سبب القای جهش می‌شوند و یا به صورت خود به خودی و هنگام همانندسازی ژنوم باکتری در اثر اشتباهات رایج هنگام همانندسازی به وقوع می‌پیوندد. در باکتری‌ها برای مقابله با جهش‌ها سیستم‌های متعددی وجود دارد. مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نیز از سایر باکتری‌ها مجزا نیست. اما باید این نکته را متذکر شد که

مواد و روش‌ها

انتخاب نمونه‌ها

در این تحقیق از بین ۶۰ DNA موجود در بانک مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان دانشگاه علوم پزشکی اراک تعداد ۲۹ سویه کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شامل ۲۱ سویه مقاوم و ۸ سویه حساس به دارو برای ارزیابی موتاسیون در ژنهای mut T2 و mut T4 انتخاب شد. سویه‌ها از نمونه‌های بیماران مسلول جداسازی شدند. استخراج DNAهای انتخاب شده به

روش CHELEX (Sigma) انجام شده بودند (۱۱). سویه استاندارد مورد استفاده در مطالعه H37Rv بود.

تهیه پرایمر و انجام PCR

ترادف پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است (۹). پس از سنتز پرایمرها (ژن فناوران) واکنش تکثیر با دمای اتصال ۵۵ و در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf) انجام شد. جزئیات این پروتکل دمایی در جدول ۲ بیان شده است.

جدول ۱) پرایمرهای طراحی شده در این مطالعه به منظور تولید قطعات ۸۱۵ و ۱۱۳۶ جفت‌بازی

از ژنهای mut T4 و mut T2

نام پرایمر	پرایمر (5'-3')	اندازه محصول (جفت باز)
Mut T2 F	(5'-TCCGGATGATGATTTACCTCC-3')	۸۱۵
Mut T2 R	(5'-TCCGCCGGGTCGGGGAC-3')	
Mut T4 F	(5'-TCGAAGGTGGGCAA- ATCGTG-3')	۱۱۳۶
Mut T4 R	(5'-TGGGGTTCGCTGGAAGTGG-3')	

جدول ۲) پروتکل واکنش PCR برای دو ژن mut T4 و mut T2

ردیف	مراحل	دما (°C)	زمان	تعداد سیکل‌ها
۱	دناتوراسیون اولیه	۹۵	۵ دقیقه	۱
۲	دناتوراسیون	۹۵	۵۰ ثانیه	
۳	اتصال پرایمرها	۵۵	۵۰ ثانیه	۳۰
۴	طولیل شدن	۷۲	۴۵ ثانیه	
۵	طولیل شدن نهایی	۷۲	۸ دقیقه	۱

انجام الکتروفورز

آمپلیکون‌های به دست آمده از واکنش PCR پس از انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز (Cinagen) ۱ درصد، لود و با استفاده از دستگاه ترانس لومیناتور رؤیت و ثبت شدند.

Source BioScience انگلستان فرستاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار MEGA4, Chromas, Blast و Bioedit انجام و تطابق توالی‌های مورد بررسی با فنوتیپ سویه‌ها بررسی گردید.

یافته‌ها

نتایج PCR

مطابق جدول ۱ اندازه باند ۸۱۵bp برای ژن mut T2 و اندازه ۱۱۳۶ bp برای باند حاصل از ژن mut T4 بیان

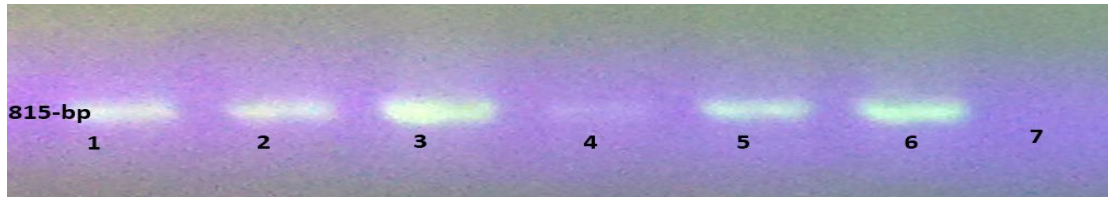
توالی‌یابی

قطعات تکثیر شده پس از تخلیص برای تعیین توالی با دستگاه Applied Biosystem به شرکت

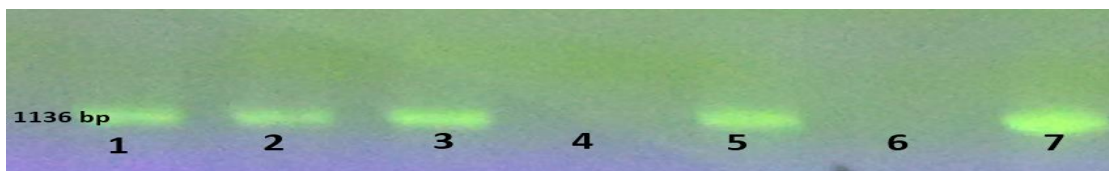
شد. در شکل ۱ و ۲ نتایج حاصل از واکنش تکثیر نشان داده شده است.

نتایج توالی‌یابی

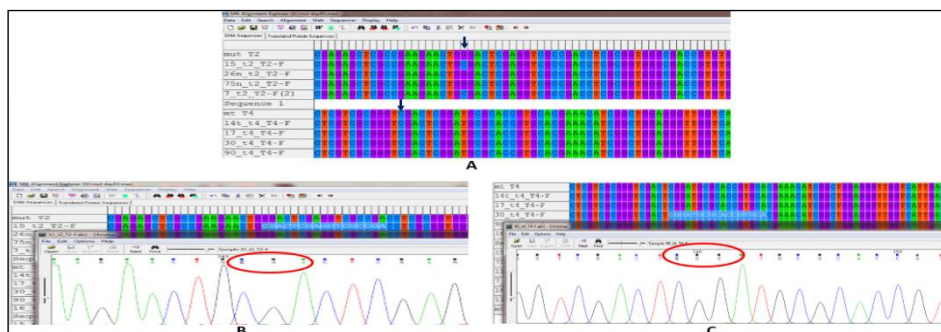
آنالیز برخی از نمونه‌های مورد بررسی در شکل ۳ و نتایج حاصل از توالی‌یابی در جدول ۳ بیان شده است.



شکل ۱: ژل الکتروفورز محتوی قطعه‌های 815-bp: نمونه‌های ۱ تا ۶ به عنوان نمونه آورده شده است و مربوط به *mut T2* می‌باشند که اندازه باند آن 815-bp است. ستون ۷ کنترل منفی است.



شکل ۲: ژل الکتروفورز محتوی قطعه‌های 1136-bp مربوط به *mut T4*. ستون‌های ۴ و ۶ کنترل منفی می‌باشند.



شکل ۳: آنالیز نتایج سکوئنسینگ با نرم‌افزار MEGA (شکل 4A) و Chromas (4B و 4C): دایره‌ها محل نوکلئوتیدهای جهش یافته را در نمونه‌های حاوی جهش در کدون‌های ۴۸ و ۵۸ ژن‌های *mut T2* و *mut T4* را نشان می‌دهند.

جدول ۳) نتایج توالی‌یابی نمونه‌های مورد مطالعه

نتایج توالی‌یابی <i>mut T4</i>						
ردیف	ویژگی‌های فنوتیپی (مقاوم: R و حساس: S)	نوکلئوتید تغییر یافته	شماره نوکلئوتید	کدون تغییر یافته	نام نمونه	تطابق بین مقاومت و عدم جهش
۱	S	CGG	۱۴۲	-	4n	-
۲	R	CGG	۱۴۲	-	111x	+
۳	R	CGG>>>GGG	۱۴۲	۴۸	27n	-
۴	R	CGG>>>GGG	۱۴۲	۴۸	370x	-
۵	R	CGG	۱۴۲	-	690x	+
۶	R	CGG>>>GGG	۱۴۲	۴۸	7211	-
۷	S	CGG	۱۴۲	-	2e	-
۸	S	CGG	۱۴۲	-	10e	-
۹	R	CGG	۱۴۲	-	5n	+
۱۰	R	CGG	۱۴۲	-	14T	+
۱۱	R	CGG	۱۴۲	-	17	+
۱۲	R	CGG	۱۴۲	-	30	+
۱۳	R	CGG	۱۴۲	-	90	+
۱۴	R	CGG	۱۴۲	-	16	+
۱۵	R	GGA	۱۷۲	-	690X	+
۱۶	R	GGA	۱۷۲	-	3369	+
۱۷	R	GGA>>>CGA	۱۷۲	۵۸	27n	-
۱۸	S	GGA	۱۷۲	-	22e	-
۱۹	S	GGA	۱۷۲	-	10e	-
۲۰	R	GGA	۱۷۲	-	370x	+
۲۱	S	GGA	۱۷۲	-	4n	-
۲۲	R	GGA	۱۷۲	-	7211x	+
۲۳	R	GGA	۱۷۲	-	5n	+
۲۴	S	GGA>>>CGA	۱۷۲	۵۸	8p	+
۲۵	R	GGA>>>CGA	۱۷۲	۵۸	15	-
۲۶	S	GGA	۱۷۲	-	26n	-
۲۷	R	GGA	۱۷۲	-	75n	+
۲۸	R	GGA>>>CGA	۱۷۲	۵۸	7	-
۲۹	R	GGA	۱۷۲	-	112	+

بحث

سالانه در جهان افراد زیادی به بیماری سل مبتلا می‌شوند. این بیماری در بین کشورهای در حال توسعه بیشترین قربانی را به خود اختصاص می‌دهد. با توجه به آنکه بروز مقاومت دارویی در این باکتری رو به گسترش است لزوم تحقیقات بیشتر در زمینه این

باکتری احساس می‌شود. بروز جهش‌های مختلف در این باکتری منجر به ایجاد سطوح مختلف مقاومت به داروهای خط اول و دوم درمان سل می‌گردد. این باکتری برای ترمیم DNA فاقد سیستم کامل ترمیم عدم تطابق (MMR) است و ژن‌های *mut* از جمله *mut T4* و *mut T2* که آنزیم‌های ترمیم کننده DNA

را کد می‌کنند وظیفه ترمیم جهش‌ها را برعهده دارند. ژن *mut* آنزیمی را کد می‌کند که می‌تواند موتاسیون‌های ایجاد شده در ژنوم را ترمیم کند (۱۲) و واریانت‌های مختلفی دارد. هرگونه تغییر در این ژن‌ها باعث افزایش رخداد موتاسیون می‌شود و علت آن عدم تصحیح جهش است. بنابراین این‌طور استنباط می‌شود که سویه‌های مقاوم به دارو فاقد موتاسیون در این ژن‌ها هستند. در این تحقیق ژن‌های *mut* در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس که آنزیم‌های ترمیم‌کننده DNA را کد می‌کنند در سویه‌های کلینیکی مقاوم و حساس مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به اهمیت مطالعه سویه‌های مقاوم، در این مطالعه تعداد سویه‌های مقاوم بیشتر از سویه‌های حساس بود. بین منبع جداسازی سویه و تغییرات ژنومی و مقاومت نیز ارتباطی وجود ندارد.

مطالعات در زمینه ژن *mut* عمدتاً مربوط به ۱۰ سال اخیر بوده است و تحقیق در این زمینه سابقه زیادی ندارد. ابراهیمی در انستیتو پاستور فرانسه در سال ۲۰۰۳ استخلاف‌هایی در ژن عامل ترمیم DNA پیدا کرد. این موتاسیون‌ها در ژن‌های گروه *mut* یافت شدند و اکثراً منحصر به سویه فیلوژنی *Beijing* بوده‌اند. ابراهیمی ۵۵ سویه را بررسی و انواع موتاسیون در این ژن را تعیین نمود و نتیجه گرفت که احتمالاً رخداد موتاسیون در این ژن باعث سازش‌پذیری سریع *Beijing* به محیط اطرافش می‌گردد (۹).

لاری (Lari) در ۲۰۰۶ موتاسیون‌های *Missense* در ژن‌های *mut T2* و *mut T4* را بررسی و موتاسیون‌های مختلفی در کدون‌های ژن *mut* پیدا کرد (۱۰). اولانو (Olano) در سال ۲۰۰۷ انواع موتاسیون

در ژن‌های ترمیمی DNA در ۱۱۷ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در آرژانتین و کلمبیا را بررسی و اثبات کرد که این موتاسیون‌ها عمدتاً وابسته به رده Haarlem از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس هستند. در مطالعه حاضر تمامی سویه‌های مورد مطالعه باند ۸۱۵bp را برای ژن *mut T2* و باند ۱۱۳۶ bp را برای ژن *mut T4* تشکیل دادند. پرایمرها به گونه‌ای طراحی شده بودند که قبل و بعد از ناحیه کدکننده (cds) این دو ژن را در بر گیرند. توالی‌یابی نیز توسط این پرایمرها با غلظت ۱۰ pmol انجام پذیرفت و کل ترادف ۴۲۶ جفت بازی ژن *mut T2* و ۷۴۷ جفت بازی ژن *mut T4* به‌طور کامل بررسی گردید. نتایج حاکی از تغییر در کدون‌های ۵۸ (نوکلئوتید ۱۷۲) و ۴۸ (نوکلئوتید ۱۴۲) به ترتیب ژن‌های *mut T2* و *mut T4* بود. از ۲۹ نمونه مورد بررسی ۲۱ نمونه مقاوم به داروهای ایزونیاژید، ریفامپین، اتیونامید، اتامبوتول و سایر داروهای خط دوم ضد مایکوباکتریوم بوده‌اند. همچنین ۸ سویه حساس به تمام داروهای ضد مایکوباکتریوم بودند (جدول ۴). بعد از انجام PCR برای همه سویه‌های مورد مطالعه، تولید قطعه ۸۱۵ جفت بازی برای *mut T2* و قطعه ۱۱۳۶ جفت بازی برای *mut T4* در الکتروفورز نمایانگر صحت انجام واکنش PCR بود. تعیین توالی برای این سویه‌ها انجام گرفت، نتایج تعیین توالی مشخص نمود که از مجموع کل، سویه‌هایی به منظور تعیین توالی ارسال گردیدند. سه نمونه دارای موتاسیون GGA:CGA در کدون ۵۸ ژن *mut T2* و تعداد ۳ نمونه دارای موتاسیون CGG:GGG در کدون ۴۸ ژن *mut T4* بودند. یک موتاسیون نیز در کدون ۱۳۰ ژن *mut T4* به‌صورت پلی‌مورفیسم CTT:CTC مشاهده شد که تغییری در اسید آمینه (لیزین) ایجاد نمی‌کند.

مطالعات در زمینه ژن *mut* عمدتاً مربوط به ۱۰ سال اخیر بوده است و تحقیق در این زمینه سابقه زیادی ندارد. ابراهیمی در انستیتو پاستور فرانسه در سال ۲۰۰۳ استخلاف‌هایی در ژن عامل ترمیم DNA پیدا کرد. این موتاسیون‌ها در ژن‌های گروه *mut* یافت شدند و اکثراً منحصر به سویه فیلوژنی *Beijing* بوده‌اند. ابراهیمی ۵۵ سویه را بررسی و انواع موتاسیون در این ژن را تعیین نمود و نتیجه گرفت که احتمالاً رخداد موتاسیون در این ژن باعث سازش‌پذیری سریع *Beijing* به محیط اطرافش می‌گردد (۹).

لاری (Lari) در ۲۰۰۶ موتاسیون‌های *Missense* در ژن‌های *mut T2* و *mut T4* را بررسی و موتاسیون‌های مختلفی در کدون‌های ژن *mut* پیدا کرد (۱۰). اولانو (Olano) در سال ۲۰۰۷ انواع موتاسیون

مطالعات در زمینه ژن *mut* عمدتاً مربوط به ۱۰ سال اخیر بوده است و تحقیق در این زمینه سابقه زیادی ندارد. ابراهیمی در انستیتو پاستور فرانسه در سال ۲۰۰۳ استخلاف‌هایی در ژن عامل ترمیم DNA پیدا کرد. این موتاسیون‌ها در ژن‌های گروه *mut* یافت شدند و اکثراً منحصر به سویه فیلوژنی *Beijing* بوده‌اند. ابراهیمی ۵۵ سویه را بررسی و انواع موتاسیون در این ژن را تعیین نمود و نتیجه گرفت که احتمالاً رخداد موتاسیون در این ژن باعث سازش‌پذیری سریع *Beijing* به محیط اطرافش می‌گردد (۹).

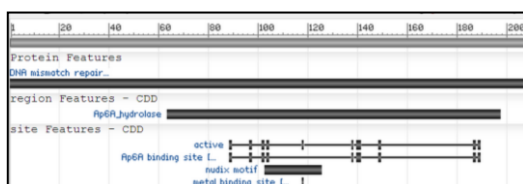
لاری (Lari) در ۲۰۰۶ موتاسیون‌های *Missense* در ژن‌های *mut T2* و *mut T4* را بررسی و موتاسیون‌های مختلفی در کدون‌های ژن *mut* پیدا کرد (۱۰). اولانو (Olano) در سال ۲۰۰۷ انواع موتاسیون

جدول ۴) چکیده‌ای از بررسی نتایج این مطالعه

ژن مورد مطالعه	کل سویه‌ها: ۲۹	سویه‌های کلینیکی	نتایج توالی‌یابی	درصد	انطباق
Mut T4	۱۴	۱۱ سویه مقاوم	۸ سویه فاقد جهش	٪۷۳	+
			۳ سویه دارای جهش	٪۲۷	-
	۳ سویه حساس	۳ سویه فاقد جهش	٪۱۰۰	-	
		۰ سویه دارای جهش	-	+	
Mut T2	۱۵	۱۰ سویه مقاوم	۷ سویه فاقد جهش	٪۷۰	+
			۳ سویه دارای جهش	٪۳۰	-
	۵ سویه حساس	۴ سویه فاقد جهش	٪۸۰	-	
		۱ سویه دارای جهش	٪۲۰	+	

استفاده در این مطالعه SPSS (USA, IL, Chicago, SPSS Inc) ویرایش ۱۶ بود. در این مطالعه به منظور بررسی بیشتر اثر جهش در ژن‌های مورد نظر به بررسی پروتئین‌های کد کننده توسط این ژن‌ها نیز پرداخته شد.

ژن‌های mut T2 و mut T4 به ترتیب کد کننده پروتئین‌هایی با ۱۴۲ و ۲۴۸ اسید آمینه هستند. بررسی‌های هم ردیفی حاکی از این است که ناحیه ۶۴-۲۰۰ این دو پروتئین، حاوی Active site با عملکرد مشابه و identity متفاوت در بین سایر سویه‌های باکتریایی است و از ناحیه اسید آمینه ۶۰ به پایین (یعنی کدون‌ها ۴۸ و ۵۸ این دو ژن) ناحیه عملکردی گزارش نشده است (شکل ۴). از طرفی با توجه به عدم گزارش ساختار کریستالوگرافی پروتئین‌های کد کننده این دو ژن امکان predict و مقایسه حالت پروتئینی موتانت و wild-type با نرم‌افزارهای پیشگویی کننده مانند Molegro virtual docker وجود نداشت.



شکل ۴) بررسی ساختار پروتئینی ژن mut در NCBI (WP_003400124.1)

در این پژوهش هیچ ارتباط آماری معنی‌داری میان موتاسیون در دو ژن مورد مطالعه و حساسیت به دارو در سویه‌های مورد مطالعه مشاهده نشد. اما در تقریباً ۷۰ درصد سویه‌های مقاوم عدم وجود موتاسیون در این ژن‌ها اثبات گردید. این نتیجه را می‌توان این‌طور تفسیر کرد ژن‌های سیستم ترمیم MMR در سویه‌های مقاوم، حفاظت شده (کانزرو) هستند و قادرند هرگونه تغییر در ترمیم DNA را شناسایی کرده و شانس بیشتری برای بقا در برابر آنتی‌بیوتیک نسبت به سویه‌های حساس داشته باشند. هر چند نتایج حاصل از مطالعه ابراهیمی عدم وجود ارتباط بین مقاومت دارویی MTB و رخداد موتاسیون در توالی ژن mut T4 و mut T2 را نشان می‌دهد و نیاز به بررسی بر روی تعداد بیشتری سویه وجود دارد.

با توجه به نتایج مطالعات لاری، ابراهیمی و اولانو بین مقاومت از نوع PGG1 و PGG2 و سویه‌های بیجینگ ارتباط مستقیمی وجود دارد و پیشنهاد می‌شود پس از تعیین سویه‌های بیجینگ به بررسی ترادف نوکلئوتیدی دو ژن مذکور (مربوط به سیستم ترمیم عدم تطابق MMR) پرداخته شود (۱۳) و سپس ارتباط این سویه‌ها و رخداد موتاسیون در این دو ژن را در سطوح متفاوت مقاومت و در سویه‌های کلینیکی مختلف بررسی گردد. لازم به ذکر است نرم‌افزار مورد

سپاس و قدردانی

این پژوهش بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی اراک در سال ۱۳۹۳ است. کلیه داده‌های جمع‌آوری شده در این مطالعه به صورت محرمانه بوده و این مطالعه تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک را اخذ نموده است. بنابراین بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی و مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی دانشگاه علوم پزشکی اراک به‌علت پشتیبانی تجهیزات و امکانات و از کلیه همکارانی که ما را در این پژوهش یاری نموده‌اند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

تضاد منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

با وجود مطالعات انجام شده مرتبط با سایر ژن‌های دخیل در مقاومت دارویی مایکوباکتریوم تویرکلوزیس (۱۶-۱۴) هنوز هم بررسی‌ها کامل نشده است و توالی ژنوم این موجود، سیستم ترمیم عدم تطابق، ژن‌های مرتبط و پروتئین‌های کد کننده توسط آنها مستلزم بررسی‌های بیشتر می‌باشد.

نتیجه‌گیری

مقاومت دارویی روزافزون در بیماری سل آن را به یک مسئله جهانی تبدیل کرده است. با وجود مطالعات گسترده بر روی ژن‌های عامل ایجاد مقاومت همچنان ابهاماتی از مکانیسم آنها و ارتباط بین این ژن‌ها، از جمله ژن‌های سیستم ترمیم عدم انطباق، وجود دارد که نیازمند بررسی‌های بیشتر در سطوح مختلف ژنوم، بیان ژن‌ها و پروتئین تولیدی از آنها می‌باشد.

References:

- Ahmady A, Poolad T, Rafee P, et al. Study of Pyrazinamidase structural changes in Pyrazinamide resistant and susceptible isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberk Toraks* 2013; 61: 110-4.
- Mizrahi V, Andersen SJ. DNA repair in Mycobacterium tuberculosis. What have we learnt from the genome sequence. *Mol Microbiol* 1998; 29: 1331-9.
- Ramaswamy S, Musser, JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis: 1998 update. *Tuber Lung Dis* 1998; 79: 3-29.
- Horst JP, Wu TH, Marinus MG. Escherichia coli mutator genes. *Trends Microbiol* 1999; 7: 29-36.
- Ebrahimi-Rad M, Bifani P, Martin C, et al. Mutations in putative mutator genes of Mycobacterium tuberculosis strains of the W-Beijing family. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 838-45.
- Mardassi H, Namouchi A, Haltiti R, et al. Tuberculosis due to resistant Haarlem strain, Tunisia. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 957-61.
- Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, et al. Global dissemination of the Mycobacterium tuberculosis W-Beijing family strains. *Trends Microbiol* 2002; 10: 45-52.
- Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, et al. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of Mycobacterium tuberculosis: a systematic review. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 843-9.
- Ebrahimi-Rad M, Bifani P, Martin C, et al. Mutations in putative mutator genes of Mycobacterium tuberculosis strains of the W-Beijing family. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 838-45.
- Lari N, Rindi L, Bonanni D, et al. Mutations in mut T genes of Mycobacterium tuberculosis isolates of Beijing genotype. *J Med Microbiol* 2006; 55: 599-603.
- Arjomandzadegan M, Titov LP, Surkova LK, et al. Determination of principal genotypic groups among susceptible, MDR and XDR clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis in Belarus and Iran. *Tuberk Toraks* 2012; 60: 153-9.
- Goodtzova K, Kanugula S, Edara S, et al. Repair of O6-benzylguanine by the Escherichia coli Ada and Ogt and the human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferases. *J Biol Chem* 1997; 272: 8332-9.

13. Trautinger BW, Jaktaji RP, Rusakova E, et al. RNA polymerase modulators and DNA repair activities resolve conflicts between DNA replication and transcription. *Mol Cell* 2005; 19: 247-58.
14. Pirayandeh M, Nazari R, Zolfaghari MR, et al. Evaluation of conservation in *carD* sequence's gene and its application in rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Iran South Med J* 2014; 17:263-71. (Persian)
15. Vahidi V, Zolfaghari MR, Ahmadi A, et al. Allele Specific-PCR method for rapid detection of *gyrA* gene mutations in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biological Journal of Microorganism* 2014;3: 23-34.
16. Taherahmadi M, Ahmadi A, Shojapour M, et al. Rapid Detection Of Susceptibility To Ethambutol In Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolated From Tuberculosis Patients By PCR- RFLP. *Urmia Med J* 2013; 24: 566-76. (Persian)

Original Article

Evaluation of possible occurrence of mutation in MMR repair system genes in resistant and sensitive clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* by using sequencing method

AP. Afzali¹, M. Arjomndzadegan², A. Ahmadi^{3*}, SH. Hosseini¹,
M. Khabazi⁴, M. Tousheh⁵

¹ Department of Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University of Tehran Research

² Infectious Diseases Research center (IDRC) and Department of Microbiology and Immunology, School of medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

³ Department of molecular genetics, Tarbiat Modarres University, Tehran and Infectious Diseases Research center (IDRC), Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

⁴ Infectious Diseases Research center (IDRC), Department of Pediatric Infectious, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

⁵ Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Science, University of Isfahan

(Received 26 Dec, 2014

Accepted 22 Jun, 2015)

Abstract

Background: during recent years, the incidence and spread of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, the bacterium causing tuberculosis, has set this disease in World Health Organization priorities alignment of diseases like AIDS and hepatitis. Study of close examination of resistant and susceptible clinical strains genotypes is necessary to overcome drug resistance. Among the numerous repair systems, only there are limited number of encoding genes of DNA repair enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*. Commonly these genes have been conserved and any changes among them likely increase the mutation occurrence due to the impossibility of correction of spontaneous mutations in sensitive strains of this bacteria. *mut* genes encode DNA repairable enzymes. This study investigated the mutations in these genes and the effect of these mutations on tuberculosis drug resistance.

Materials & Methods: In this study, of 29 available specimens, we were selected 8 susceptible strains and 21 resistant strains and after ordering appropriate primers and performing the proliferation reaction two types of amplicons produced which including fragments of genes *mut* T2 and *mut* T4 and they were sent in order to sequencing.

Results: The results of chain reaction primer represents an appropriate choice of primers which were investigated. Sequencing results showed that overall 73% of resistant strains that had been selected for study of *muf*T4 gene, have no mutations in codons 48 of *mut*T4 gene, and 70% of resistant strains have no GGA >>> CGA mutation at codon 58 of *muf*T2 gene.

Conclusion: One of the strategies to overcome tuberculosis drug resistance is a close examination of genotypes of resistant and susceptible clinical strains. Results of this study was performed by examining changes in *mut* T2 and *mut* T4 gene sequence. The mutation in *mut* T2 always associated with mutation in *mut* T4, in this way, the first mutation may occur in *mut* T4 and after that, the second mutation may occur in *mut* T2. Importance of this is determined by study of encoded proteins by these two genes and position of *mut* T4 than *mut* T2 in the MUT HLS spatial structure of protein complex. Results of comparison of drug resistance and occurrence of mutations in hot-spots of *mut* T2 and *mut* T4 genes illustrated that these genes are conserved in resistant strains. However, there is no significant relation in susceptible strains.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, *mut* T2, PCR, sequencing

©Iran South Med J. All rights reserved.

Cite this article as: Afzali AP, Arjomndzadegan M, Ahmadi A, Hosseini H, Khabazi M, Tousheh M. Evaluation of possible occurrence of mutation in MMR repair system genes in resistant and sensitive clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* by using sequencing method. *Iran South Med J* 2016; 18(3): 351-360

Copyright © 2016 Afzali, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

* Address for correspondence: Azam Ahmadi, Infectious Diseases Research center (IDRC), Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran, Email: azam.ahmadi@modares.ac.ir

Website: <http://bpums.ac.ir>

Journal Address: <http://ismj.bpums.ac.ir>