جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية العلوم

تواجد وتشخيص الجين السمي *pks* في عينات البكتريا السالبة لصبغة غرام والمعزولة سريرياً

رسالة مقدمة إلى مجلس كلية العلوم – جامعة ديالى
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل

محمد طالب حسين السعدي

بكالوريوس علوم الحياة / كلية العلوم / كلية مدينة العلم الجامعة ٢٠١٤

بأشراف

أ.م.د صفاء الدين أحمد شنتر القيسي **أ.د. منذر حمزة راضي**

١٤٤١هـ ٢٠٢٠ م

الخلاصة

ذيفان الـ Colibactin هو عبارة عن جزيئات طبيعية صغيرة تنتج بواسطة عدة افراد من العائلة المعوية Enterobacteriaceae مثل *Escherichia coli, Klebsiella Pneumoniae, Enterobacter spp., Ciratobacter spp. Acintobacter spp.*, والتي تستوطن في القناة المعوية للأنسان والحيوانات. هذا الذيفان يعمل على استحثاث تكسير المادة الوراثية مزودجة الشريط (الدنا-DNA)، انحرافات في الكرموسوم وكذلك يعمل على احداث خلل في عملية انقاسم الخلايا حقيقة النواة وايقافها في طورM/G2 . في هذه الدراسة، 100 عزلة بكتيرية سريرية تعود للبكتربا السالبة لصبغة غرام تم الحصول عليها من نماذج وعينات سريرية مختلفة، اذ تم عزلها من مشتفيات ومراكز طبية في محافظة بغداد/العراق.

العزلات البكتيرية التي عزلت تم تعريفها استناداً الى مجموعة فحوصات واختبارات اشتملت على المظهر الخارجي، الفحوصات الكيموحيوية، الفحوصات الفسلجية، API 20E والتعريف بأستخدام جهاز VITEK2. اظهرت النتائج ان بكتريا *E. coli* تمثل نسبة 51% من المجموع الكلي للعزلات، 28% *K. pneumoniae*، 12% *P. aeruginsoa* و 9% *E. aurogenes*، أعلى نسبة من العزلات البكتيرية تم الحصول عليها من عينات الخروج والادرار وبنسبة 49 و 34% على التوالي، بينما 10% تم الحصول عليها من مسحات الجروح و 7% من عينات الدم.

عينات الدنا DNA للعزلات البكتيرية تم تضخيمها بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لغرض معرفة انتشار مجموعة من جينات الكولبكتين متمثلة بـ (*clbA, clbB, clbN* and *clbQ*).

اوضحت نتيجة الترحيل الكهربائي بأستخدام هلام الاكاروزو الى ان جين *clbA* كان ذو وزن جزيئي بحدود 1002 bp، *clbB* 550 bp، *clbN* 700 bp و *clbQ* 821 bp في تسلسل القواعد النتروجينية. اوضحت النتائج ان 11% من مجموع العزلات البكتيرية المعزولة هي موجبة للجينات الاربعة قيد الدراسة، انتشار جينات الكولبكتين بين العزلات البكتيرية تبين بان هناك سبعة عزلات من بكتريا *E. coli* حاوية عليها وعزلتين تعود لبكتريا *K. pneumoniae* موجبة لفحص هذه الجينات فيما كانت عزلتين من بكتريا *E. aerogenes* موجبة وحاملة لهذه الجينات، أعلى مستوى من الحساسية الدوائية للمضادات الحياتية بين العزلات الموجبة للكولبكتين تم تسجيلها للمضاد الحيوي Impenem وبنسبة 100%، وكذلك لوحظ مستوى عالي من الحساسية الدوائية تجاه

in colibactin synthesis is represented by *clbA*; a phosphopantetheinyl transeferase-encoded gene (PPTase) and clbP; a D-amino peptidase; which are required for the biosynthesis and maturation of colibactin, respectively (McCarthy *et al*., 2015).

The mechanisms of mode of action are poorly understood and the characterization of its structure remains partially elusive. However, a previous study of (Brotherton and Balskus, 2013), demonstrated that the synthesis pathway of colibactin as a prodrug is mediated by NRPS-PKS biosynthesis machinery with an extended side chain on N-acyl-D-asparagine. The precursor called (precolibactin) is then translocated into the periplasm by clb M transporter, and removed it by *clbP*. The production of colibactins was associated with pathogenicity and inducing carcinogensis. Colibactins are considered as virulence factors, immunomodulators, mutualistic factors and antimicrobial agents (antibiotics), as well as their effects as anti-inflammatory and analgesic (Cohen, 2002 and Johnson *et al*., 2008).

This natural genotoxin induces the breakdown of double-stranded DNA, chromosome aberrations and cell arrest in the G2/M phase in the eukaryotic host cells (Cuevas-Ramos *et al*., 2010 and Bossuet-Greif *et al*., 2018). Moreover, the genotoxicity of colibactin was observed in mammalian

cells transiently infected with *pks*+ bacteria. Interestingly, *E. coli* harbouring pks was isolated from several clinical cases such as newborn children with meningitis (Lu *et al*., 2017), commensal bacteria found in human and animal intestinal tracts (Putze *et al*., 2009), patients with urinary tract infections (Hancock et al., 2008), and haemo culture (septicemia) (Marcq *et al*., 2014 and McCarthy *et al*., 2015).

In addition, *E. coli* harboring pks are isolated from colorectal cancer (CRC) and it could promote human CRC development (Raisch *et al*., 2014). It was revealed that the ability of *K. pneumoniae* 1084 harbouring *pks* cluster to damage DNA in vitro and in vivo is significantly demolished when *clbA* was knocked out (Lu *et al*., 2017). However, it was reported that *clbP* can ease the harmful effect of this toxin in vitro and dramatically decreases the tumor number in vivo (Faïs *et al*., 2016).

1-2 The aim of the study:

1- To isolate and identify of some clinical isolates of Gram negative bacteria from hospitals in Baghdad city, Iraq.
2- To investigate of susceptibility pattern test of all obtained isolates against some selected antibiotics.
3- To make asurvey the occurrence of some genes (*pks*) responsible for the production of colibactin from the clinically isolated Gram negative

Introduction

Colibactins are natural genotoxic, small and unknown structure molecules, produced by human normal intestinal microbiota. These molecules are considered as secondary metabolites and their biosynthesis is encoded by specific gene cluster which was firstly identified and characterized by Oswald and co-workers during 2006 in an extra-intestinal pathogenic Escherichia coli strain (ExPEC) isolated from neonatal meningitis (Nougayrède *et al*., 2006 and Cuevas-Ramos et *al*., 2010).

Epidemiological studies and reports showed that colibactin can be also produced by extra-intestinal pathogenic strains of Enterobacteriaceae members including *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* and *Citrobacter koseri*. Inaddition it was also found in *Pseudovibiro* spp. associated with sponges isolated from marine water (Bondarev *et al*., 2013 and Cougnoux *et al*., 2016).

The biosynthesis of this colibactin is achieved by the enzymes Polyketide synthases (PKSs) and non-ribosomal peptide synthases (NRPSs). The major biosynthesis of these secondary metabolites is encoded by the *clb A-S* genes found in the 54-kb genomic *pks* island and any mutation in these genes except *clbS* results in decrease or loss of the genotoxic activity (Bian *et al*., 2015 and Brotherton *et al*., 2015). The importance of this gene cluster

المضادات Ceftriaxone, Cefotaxime, Piperacilline and Tobramycin. مقاومة ضعيفة من هذه البكتريا تم تسجيلها تجاه المضادات الحياتية Norfloxacin, Ceftaxidime and Nitrofurantion.، ولغرض دراسة الفعل الوظيفي لجينات الكولبكتين في كل من بكتريا *E. coli*, *E. aerogenes* استخدم خط الخلايا السرطانية نوع HeLa، اذ تم تعريض هذه الخلايا الى عزلت بكتيرية موجبة وسالبة لجينات الكولبكتين وفي فترتين زمنيتين مختلفة (6،24 ساعة) وبأستخدام ظروف نمو مثالية وبمعدل اصابة 50 MOI ، لوحظ فقط 10-15% من الخلايا تم قتلها بعد ان عوملت مع بكتريا *E. coli* سالبة لجينات الكولبكتين وبوقتين مختلفين، فيما ازدات نسبة قتل الخلايا الى 50% في حالة معاملتها بنفس البكتريا ولكنها موجبة للجينات قيد الدراسة، وارتفعت نسبة القتل الى 80% بعد مرور 24ساعة تعريض للبكتريا الموجبة للجينات.

اما في حالة معاملة الخلايا نوع HeLa ببكتريا *E. aerogenes* اوضحت النتائج بأن نسبة القتل تقريباً مماثلة لما هو علية في بكتريا *E. coli*، اذ تبين ان 90% من الخلايا تبقة حية في حالة معاملتها مع بكتريا *E. aerogenes* السالبة لجينات الكولبكتين ونسبة 75% قتل تم الحصول عليها في حالة تعريض الخلايا لنفس البكتريا ولكن في حالة انها موجبة للجينات قيد الدراسة، من خلال دراسة الخلايا المعرضة للبكتريا الموجبة لجينات الكولبكتين مجهرياً تبين ان خلايا HeLa اظهرت بعض الاستجابات لفعل لكولبكتين المنتج بواسطة قيد الدراسة وتبين ان هناك انخفاض واضح في عدد الخلايا المعاملة ببكتريا موجبة مقارنة بالكتريا السالبة لهذه الجينات، وكذلك لوحظ حدوث استطالة في انوية الخلايا، نتيجة المجهر الفلورسيني لخلايا HeLa المعاملة مع البكتريا الموجبة والسالبة للجينات وبتصبيغها بصبغة AO/EB اظهرت عدة صبغات للأنوية الخاصة بالخلايا، اذ بعد معاملة خلايا HeLa ببكتريا سالبة لعزلات *E. coli* و *E. aereogens* الحية تظهر الشبكة الكروماتينية بلون اصفر-برتقالي الى اصفر، بينما خلايا HeLaالميتة المعاملة مع البكتريا الموجبة ، تظهر الانوية بلون برتقالي الى احمر لماع، فيما تظهر الخلايا الحية HeLa الغير معاملة بأي نوع من البكتريا تظهر انويتها بلون اخضر وبدون اي لمعان او تفصص او تجزؤ بالانوية.