"التوصيف الوظيفي لإنزيم AmpC بيتا لاكتاميز، و دور البروتينات متفاعلة- البنسلين ذات الوزن الجزيئي المخفض (LMM-PBPs) في تكوين الببتيدوجليكان، مقاومة مضادات البيتا لاكتام و تنظيم إنتاج AmpC في بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*"

بواسطة:

علاء روبي محمود سيد

المشرف:

أ.د. خوان ألفونسو أيالا سيرانو

مركز البيواوجيا الجزيئية سڤيرو أوشوا (CBMSO/CSIC) بجامعة أوتونوما دي مدريد، أسبانيا

الجامعة:

جامعة أوتونوما دي مدريد (UAM)

كلية العلوم

أسبانيا

ملخص دراسة الدكتوراه

تعتبر البكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* واحدة من الأنواع سلبية الجرام ، والتي تسبب للأنسان بعض العدوى الإنتهازية صعبة العلاج. ذلك لامتلاك هذه البكتيريا للكثير من الآليات التي تمكنها من مقاومة مفعول المضادات الحيوية مثل قدرتها على إنتاج نوع من الإنزيمات تسمى AmpC بيتا لاكتاميزس (β-lactamases) والتي لها القدرة على التحلل المائي لكثير من المضادات الحيوية من نوع بيتا لاكتام (β-lactam) و سيفالو- سبورين(Cephalosporin). هناك العديد من الإنزيمات مثل AmpG، AmpD، AmpR، NagZ، والتي تتحكم في عملية إنتاج وتخليق انزيمات AmpC في بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*. أيضا، هنالك نوعان من مروببتيدس (Muropeptides) تتحكمان في هذه العملية، أحدهما مثبط وهو بنتا ببتيدس (Pentapeptides)، والآخر محفز وهو أنهيدرومرو ببتيدس

(anhydromuropeptides). يوجد في البربلازم نوع من البروتينات يسمى البروتينات متفاعلة-البنسلين ذات الوزن الجزيئي المخفض (LMM-PBPs) مثل PBP4 أو DacB، PBP5 أو DacC، وPBP7 أو PbpG. هذه البروتينات لها نشاط كاربوكسي ببتيديز و إندو ببتيديز، والذي يدخل في عملية الإنقسام الخلوي وبناء وتشكيل الجدار الخلوي في البكتيريا. تثبيط هذه البروتينات بواسطة مضادات البيتا لاكتام يؤدي إلى زيادة جزيئات أنهيدرومرو ببتيد في السيتوبلازم، وبالتالي يؤدي إلى زيادة تخليق و إنتاج انزيمات AmpC مما يساعد على التحلل المائي لهذه المضادات الحيوية.

تهدف هذه الدراسة إلى متابعة دور انزيمات AmpC والبروتينات PBP4، PBP5 وPBP7 في تكوين الببتيدوجليكان (Peptidoglycan) ومقاومة المضادات الحيوية في بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* سلالة PAO1. أيضا، تهدف هذه الدراسة إلى دراسة دور البروتينات LMM-PBPs في عملية إنتاج Pae-AmpC، و لإيضاح ما إذا كانت ضرورية لعملية إعادة الشكل العصوي (Bacillus) من الشكل الكروي (spheroplast) في البكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*. لذلك تم توصيف بعض الأشكال (الطبيعي والمتحور) لإنزيم Pae-AmpC و اختبارها في بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* و بكتيريا *E. coli*. أيضا، تم انتاج بعض السلالات المتحورة التي تحتوي على جينات مثبطة لكل من انزيم AmpC والبروتينات PBP4، PBP5 وPBP7 بشكل فردي أو متعدد التثبيط وذلك من سلالة PAO1. هذه السلالات تم إخضاعها لدراسة تركيب الببتيدوجليكان، اختبار انتاجها لانزيم AmpC، حساسيتها لمضادات البيتا لاكتام، و اختبار وجود البروتينات LMM-PBPs. هذا بالإضافة إلى دراسة تركيب الببتيدوجليكان، و اختبار وجود البروتينات LMM-PBPs في الشكل العصوي والشكل الكروي في بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*.

تبين من خلال هذه الدراسة أن بعض الأشكال المتحورة (AmpC-F4:C3, AmpC-F4:C6) لإنزيم AmpC قد أبدت نشاط بيتا لاكتاميز منخفض جدا، بينما الشكل النشط البالغ (Mature form) قد أظهر نشاط بيتا لاكتاميز عالي جدا إلى جانب نشاط ثانوي مثل كاربوكسي ببتيديز و إندو ببتيديز. تم ملاحظة إنتاج كثيف لإنزيم AmpC و مقاومة عالية لمضادات البيتا لاكتام في السلالات المتحورة التي تحتوي علي DacB مثبط بشكل أحادي أو متعدد التثبط مع DacC و PbpG. أيضا، تم ملاحظة إحتواء تكوين الببتيدوجليكان على كميات عالية من بنتا ببتيدس في السلالات المتحورة التي تحتوي علي DacC مثبط بشكل أحادي أو متعدد التثبط مع DacB و PbpG. السلالة المتحورة التي تحتوي على جينات مثبطة لكل من DacC مع PbpG و DacB، قد أبدت أعلى المعدلات لكل من إنتاج إنزيم AmpC، مقاومة مضادات البيتا لاكتام، و زيادة نسبة بنتا ببتيد في تكوين الببتيدوجليكان. بعد فحصها تحت الميكروسكوب، تبين أن السلالات المتحورة التي تحتوي علي جين مثبط بشكل أحادي أو متعدد التثبط لكل من DacB، DacC، PbpG و AmpC، لم تنتج إختلافات ملحوظة في الشكل العصوي الظاهري بالمقارنة مع السلالة الأم PAO1. أخيرا، أوضحت هذه الدراسة أن نشاط كل من DacB، DacC، PbpG و AmpC غير ضروري لعملية إعادة الشكل العصوي من الشكل الكروي في البكتيريا