



新型甲氧苄啶耐药二氢叶酸还原酶 DfrB7 的生化分析与宿主菌耐药机制研究

李玲, 王明钰*, 徐海*

山东大学微生物技术研究院, 微生物技术国家重点实验室, 山东 青岛 266237

摘要:【目的】分析新型甲氧苄啶获得性耐药蛋白 DfrB7 的生化性质, 探究其与 B 家族代表性的二氢叶酸还原酶(DHFR)对甲氧苄啶获得性耐药的生化基础。【方法】构建系统进化树分析 B 家族 DHFRs 与新型 DfrB7 的进化关系。将 *dfr* 基因分别构建到 pACYC184 和 pET15b(+)载体并转化到相应大肠杆菌中。使用微量肉汤稀释法确定克隆菌株对甲氧苄啶的耐药性。测定 DHFRs 使用 NADPH 作为质子供体催化二氢叶酸还原的酶活反应参数。通过等温滴定量热法测定甲氧苄啶的解离常数。【结果】克隆到大肠杆菌中的新型 *dfrB7* 基因表现出对甲氧苄啶的高耐药表型。系统进化树确定了 *dfrB7* 编码 B 家族的 DHFRs。检测并比较 DfrB7 和代表性 DHFRs 的酶活性、抑制剂的亲和力, 与染色体上 DHFR 相比, DfrB7 与 DfrB1 均表现出显著降低的催化活性, 通过生化实验证实 B 家族二氢叶酸还原酶对甲氧苄啶结合力极差。【结论】新型 *dfrB7* 基因编码的 DfrB7 具有 B 家族二氢叶酸还原酶的普遍特征。B 家族二氢叶酸还原酶赋予宿主菌对甲氧苄啶的获得性耐药与该酶对甲氧苄啶的低亲和力有关。

关键词: 二氢叶酸还原酶, 甲氧苄啶耐药性, 生化分析

二氢叶酸还原酶(DHFR, EC 1.5.1.3) 是一种广泛存在于真核和原核生物的氧化还原酶, 能够在辅因子 NADPH 的递氢下, 将底物二氢叶酸(DHF)还原为四氢叶酸(THF), 同时释放 NADP⁺。四氢叶酸作为细胞中重要的前体物质, 参与 DNA、RNA 以及某些氨基酸的合成^[1]。因此二氢叶酸还原酶也是临床治疗和新药开发中经典的

靶向酶, 在抗癌、抗病原菌感染和抗疟疾方面都有研究。

甲氧苄啶(trimethoprim, TMP)是细菌二氢叶酸还原酶的竞争性抑制剂, 于 20 世纪 60 年代早期合成并用于临床治疗^[2]。因其结构简单、药效好, 尤其与磺胺类药物联合使用效能的开发, TMP 被广泛应用于临床和养殖业, 迄今已有几十

基金项目: 国家自然科学基金(31770042, 31770043), 山东省重点研发计划(2020CXGC011305)

*通信作者。Tel/Fax: +86-532-58630856; E-mail: 徐海, haixu@sdu.edu.cn, 王明钰, wangmingyu@sdu.edu.cn

收稿日期: 2021-03-22; 修回日期: 2021-06-22; 网络出版日期: 2021-10-11

年的使用历史^[3-4]。直到今天, TMP 仍是治疗由大肠杆菌以及某些奇异变形杆菌、克雷伯菌属、小部分肠杆菌科细菌和腐生葡萄球菌^[5-7]引起的非复杂性尿路感染的一线药物。同时 TMP 也是治疗由金黄色葡萄球菌引起的皮肤和软组织感染的有效药物^[5]。TMP 与磺胺类药物联用的复方新诺明(co-trimoxazole, SXT), 已被证明对引起呼吸道、肠道和尿路感染的广泛病原菌具有协同杀灭作用, 也是治疗卡氏肺孢子虫感染的低廉、有效药物^[8]。然而, TMP 的过度 and 广泛使用, 例如当做常规预防性的药物, 加剧了世界范围内 TMP 耐药菌的流行。随着对 TMP 耐药基因研究的深入, 对 TMP 耐药基因的分类和耐药机制的研究也逐渐得以阐明。

一般认为细菌表现 TMP 耐药性的一个重要原因是通过质粒、转化子、转座子等可移动遗传元件获得了外源的二氢叶酸还原酶基因, 即 *dfr* 基因。自从 1972 年报道了第一个质粒介导的 *dfr* 基因^[9]以来, 迄今已有 40 余种导致 TMP 高耐药性的 *dfr* 基因在革兰氏阴性菌中被发现^[10]。这些 *dfr* 基因编码的二氢叶酸还原酶主要分为 DfrA 和 DfrB 两个家族。与细菌染色体上 DHFR 或 DfrA 家族的其他 DHFR 完全不同, *dfrB* 基因编码的 B 家族 DHFR 仅有 8 个成员, 编码非常相似且极短的低分子量蛋白(78-82 个氨基酸), 氨基酸序列相似性高达 75% 以上, 使宿主菌表现出对 TMP 极强的耐药性^[11]。DfrB1 (又名 R67 DHFR, PDB ID: 2RK1) 的晶体结构已被解析^[12], DfrA、B 家族蛋白结构的比较如图 1 所示^[13]。研究发现除了基因上的不同外, B 家族 DHFR 还具有不同寻常的结构, 由 4 个相同亚基组成的同源四聚体形成一个对称的活性位点隧道, 在任何给定时间只允许一个底物结合/催化事件发生^[14]。由于活性位点缺乏

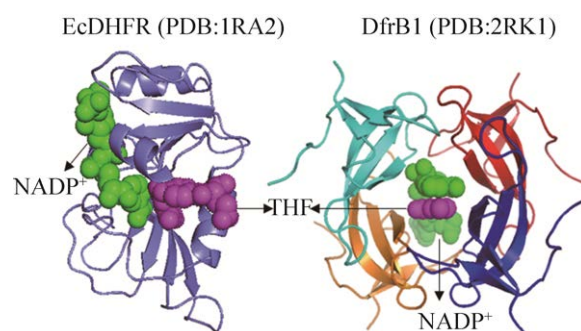


图 1. A、B 家族 DHFR 的蛋白结构比较^[13]

Figure 1. Structural comparison of Family A and Family B DHFR. Green represents NADPH; magenta represents folate to EcDHFR or DHF to DfrB1.

结合特异性的催化策略, 推测 B 家族 DHFR 是一种进化不完全的原始酶^[15]。

在此前的工作中, 已确定 *dfrB7* 存在于 *Aeromonads hydrophila* Sam7-TMC1 的 1 型整合子的 *dfrB7-aadA2* 基因阵列中^[16]。本文主要从蛋白的结构和功能角度, 设计了一系列实验探究新型 *dfrB7* 编码蛋白的理化性质以及 B 家族二氢叶酸还原酶赋予菌体的 TMP 耐药策略。

1 材料和方法

1.1 菌株和药物敏感性实验

使用抗生素筛选, 在自然水体中分离到耐 TMP 的菌株 *A. hydrophila* Sam7-TMC1, 通过对该菌株的 1 型整合子基因盒阵列的检测发现这一新型 *dfrB7* 基因^[16]。用于对照的 *dfrB1* 基因合成于金唯智公司。根据美国药敏标准(CLSI)指示的肉汤稀释法检测 TMP 的最小抑菌浓度(MIC)。接种物终浓度为 5×10^5 CFU/mL, 接种到新鲜配制的药物梯度的细胞培养皿中, 37 °C 培养 12 h 以上。为了证明菌体对 TMP 的高耐药性确实由 *dfrB7* 基因造成, 将 *dfrB7* 基因以及用作对照的

dfrB1、大肠杆菌染色体上的 *folA* 基因 (编码大肠杆菌染色体上敏感型二氢叶酸还原酶 EcDHFR) 分别克隆到低拷贝数的 pACYC184 质粒和高拷贝数的 pET15b(+)质粒, 并转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中进行 MIC 的检测。含有 pACYC184、pET15b(+)空载体的 DH5 α 为实验的阴性对照。

1.2 序列比对和进化树分析

从 GenBank 数据库搜集所有已知的 B 家族 DHFR 的序列和 A 家族代表性的 DHFR 序列, 使用 MEGA (version 7.0.18) 进行序列比对, 然后通过最大似然法 (JTT model, 1500 bootstraps)对多序列比对后的数据进行进化树分析。

1.3 DHFR 的克隆、异源表达和纯化

设计带有同源臂的引物通过 PCR 扩增将新型 *dfrB7* 基因、B 家族代表性的 *dfrB1* 基因和作为对照的 *folA* 基因分别从 *A. hydrophila* Sam7-TMC1 基因组、合成的 *dfrB1*-pUC57 质粒、*E. coli* DH5 α 基因组中克隆出来。同时通过 PCR 扩增将 pET15b(+)质粒线性化, 使之带有相应的 50 bp 同源臂。使用 GB/dir 方法将 PCR 产物与线性化质粒连接, 完成重组质粒构建。将重组质粒分别转化入表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞。重组菌株于 37 °C 培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8 时加入 IPTG 使终浓度为 0.5 mmol/L, 16 °C 过夜诱导。离心收集菌体, 超声破碎细胞, 高速离心收集上清。细胞破碎上清液使用镍离子亲和层析柱 (GE Healthcare) 进行亲和层析。纯化后的蛋白洗脱液使用 PD-10 脱盐柱去除咪唑, A_{280} 法测定浓度后保存于 -80 °C 冰箱。蛋白纯化和贮存缓冲液体系为: 20 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, pH 8.0。

1.4 二氢叶酸还原酶的酶活实验

根据米氏方程 $v=(v_{\max} \times S)/(K_m+S)$, 酶活常数

K_m 和 v_{\max} 可以通过测量一系列底物浓度下酶催化反应的初速度, 通过图像的非线性拟合进行计算^[17]。酶活反应缓冲液成分为: 20 mmol/L TES (pH 7.5), 50 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L EDTA, 10 mmol/L β -巯基乙醇, 1 mg/mL BSA。每次反应 (总反应体积为 500 μ L), 稀释的 5 μ L 酶液与 5 μ L NADPH 溶液 (反应终浓度 100 μ mol/L) 加入酶活缓冲液后在室温下孵育 5 min。在加入 2.5–30.0 μ L DHF 溶液 (反应终浓度 5–60 μ mol/L, 溶于 50 mmol/L TES, pH 7.0) 后立即测量 1 min 内 A_{340} 吸光度的变化。每个底物浓度的反应测量 3 次, 使用 Origin 9.0 作图, 拟合一系列底物浓度下单位时间内吸光度的变化, 以获得带有标准偏差的 K_m 值^[18]。340 nm 波长下 DHFR 还原 DHF 反应的摩尔消光系数为 12300 (mol/L)⁻¹·cm⁻¹。

1.5 等温滴定量热法实验

使用 MicroCal PEAQ-ITC 量热仪测定 298K 条件下抑制剂 TMP 与 DHFR 结合产生的微量热。由于 TMP 溶解于 DMSO, 需要通过透析蛋白溶液统一样品池和滴定针中的缓冲液成分, 95% (V/V) Tris-Cl buffer (20 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, pH 8.0) 和 5% (V/V) DMSO。样品池中是与 10 倍摩尔量 NADPH 孵育的 DHFR 溶液。设置滴定实验中蛋白与 TMP 的摩尔浓度比为 1:10。第一滴设置为 0.4 μ L, 其余 18 滴体积均为 2 μ L。滴定间隔为 300 s, 搅拌速度为 750 r/min。ITC 的滴定数据根据非交互单点结合模型使用最小二乘法进行非线性回归拟合。

2 结果和讨论

2.1 新型甲氧苄啶耐药基因 *dfrB7* 的鉴定

此前已报道 *dfrB7* 基因以 *dfrB7-aadA2* 基因

盒阵列的形式存在于嗜水气单胞菌 *A. hydrophila* Sam7-TMC1 的 1 型整合子上^[16]。本文对 1 型整合子结构及进化关系的分析如图 2 所示, 通过对 *dfrB7* 基因编码的蛋白序列以及已知的其他 7 个 B 家族 DHFR 进行进化树分析, *DfrB7* 与其他 B 家

族 DHFR 有聚类关系, 证实了此前的注释。

多序列比对显示(图 3), *DfrB7* 与其余 7 个 B 家族 DHFR 具有较高的序列相似性。相比 B 家族其他 DHFR, *DfrB7* 在 C 端多出 GVQG 四个氨基酸残基, 整体看来 B 家族 DHFR 的 C 端序列较

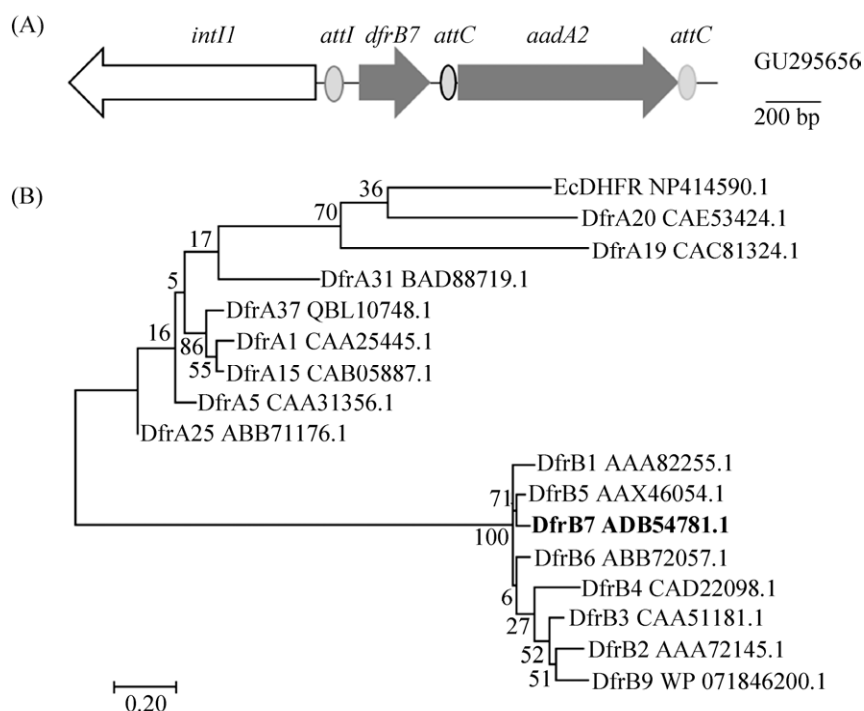


图 2. *dfrB7* 的基因结构与 B 家族二氢叶酸还原酶的进化树分析

Figure 2. Genetic structure of *dfrB7* and phylogenetic analysis of Family B DHFRs. A: Genetic structure of gene cassette in class 1 integron. Antibiotic resistance genes are indicated by gray arrows. The integrase gene is shown in white arrow. Integron-associated recombination sites are shown in different ellipses. GenBank number is GU295656. B: Phylogenetic analysis of Family B DHFRs and partial Family A DHFRs. GenBank numbers are listed alongside protein names. Numbers at each node are bootstrap values. Bar: evolutionary distance.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80												
DfrB1	MERS	SNEV	SNFV	AGNF	VFP	SNAT	FGMG	DRVR	KKSG	AAWQ	GGQI	VGWY	CTNL	TPEG	YAVE	SEAH	PGSV	QIYP	VAALE	RIN----	
DfrB2	.GQ.	.D.A	.NA.	.Q.AL	.LS.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.
DfrB3	.DQH	.N.G.	.TL.	.Q.AL	.H.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.
DfrB4	.NEG	.K.	.TSA	.R.A.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.
DfrB5	.DQGR	.S.	.Q.A.	.A.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.
DfrB6	.DQG	.S.	.I.	.Q.A	.S.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.
DfrB7	.DQG	.S.	.G.	.Q.S.	.A.S.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.
DfrB9	.NQ.	.CI	.T.	.V.Q	.AL	.FQP	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.	.L.

图 3. B 家族二氢叶酸还原酶多序列比对

Figure 3. Multiple sequence alignment of Family B DHFRs. DfrB1 is the reference protein; only mutated residues are shown for the other sequences with conserved residues represented by dots. It is clear that *DfrB7* has a longer C-terminal end.

为保守,可能参与蛋白结构和功能的稳定,而N端氨基酸序列变化较大,有研究表明N端并非功能区而是作为四聚体域间连接的连接区^[14]。新型DfrB7从一级结构上符合B家族DHFR的特征,结合图1所示EcDHFR和DfrB1的蛋白结构,DfrB7同样缺乏底物的特异性结合位点,对底物类似物TMP的亲合力也会低于EcDHFR。

2.2 *dfrB7* 导致菌株表现甲氧苄啶耐药性

通过药敏实验确定携带*dfrB7*的原始菌株表现出TMP的高耐药性(表1)。对存在*dfrB7*、*dfrB1*和*folA*基因的*E. coli* DH5 α 克隆菌株以及相应的转入空质粒的对照菌株测定其TMP和SXT的MIC值。从表1可看出,*dfrB7*所在的2个克隆菌株对TMP的最小抑菌浓度高达1024 mg/L和2048 mg/L,远高于作为对照的空载体菌株(2 mg/L)和敏感型*folA*基因所在的克隆菌株(4 mg/L),与原始菌株*A. hydrophila* 7T1的结果相近。类似地,*dfrB7*的克隆菌株对SXT的最小抑菌浓度比*E. coli* DH5 α (pACYC184)对照菌株高了至少128倍,因此*dfrB7*的克隆菌株与原始

菌株同样表现出较高的TMP和SXT的耐药性。此外,B家族代表性的*dfrB1*克隆菌株也表现出TMP的耐药性,但染色体上*folA*基因的克隆菌株仍对TMP表现敏感。在统一了遗传背景和启动子调控水平后,克隆菌株的药敏实验表明耐药性是由*dfrB1*和*dfrB7*基因引起,排除了TMP耐药性是由于原始菌株中启动子过表达的可能,证明新型*dfrB7*基因是导致菌株表现TMP高耐药性的原因。

2.3 DfrB7 和对照 DHFR 的酶活参数及 TMP 亲和力检测

为确定新型DfrB7催化效率和酶活性质,并探究菌体对TMP耐药性与酶活效率的关系,将*dfrB7*、作为对照的*dfrB1*和*folA*基因分别构建到诱导型质粒pET15b(+)和大肠杆菌表达菌株BL21(DE3)中,纯化出DHFR以进行体外酶活和抑制剂结合力实验。通过亲和层析和凝胶过滤层析纯化出DfrB1(8.4 kDa)、DfrB7(8.7 kDa)和EcDHFR(18 kDa),SDS-PAGE结果如图4所示。使用质谱检测分析,使这3个蛋白得到进一步确认。

表 1. *dfr* 相关菌株与质控菌株对甲氧苄啶和复方新诺明的最小抑菌浓度
Table 1. MICs for TMP and co-trimoxazole in *dfr*-containing and control strains

Strain (containing plasmid)	MIC/(mg/L)	
	Trimethoprim	Co-trimoxazole
<i>E. coli</i> ATCC25922	S (4)	S (1/19)
<i>A. hydrophila</i> 7T1 (<i>dfrB7</i>)	R (2048)	R (\geq 8/152)
<i>E. coli</i> DH5 α	S (4)	S (0.0625/1.1875)
<i>E. coli</i> DH5 α (pACYC184)	S (2)	S (0.25/4.75)
<i>E. coli</i> DH5 α (<i>folA</i> -pACYC184)	S (4)	S (1/19)
<i>E. coli</i> DH5 α (<i>dfrB1</i> -pACYC184)	R (2048)	R (\geq 64/1216)
<i>E. coli</i> DH5 α (<i>dfrB7</i> -pACYC184)	R (1024)	R (32/608)
<i>E. coli</i> DH5 α (pET15b)	S (1)	S (0.5/9.5)
<i>E. coli</i> DH5 α (<i>dfrB1</i> -pET15b)	R (2048)	R (128/2432)
<i>E. coli</i> DH5 α (<i>dfrB7</i> -pET15b)	R (2048)	R (128/2432)

R: resistant; S: susceptible.

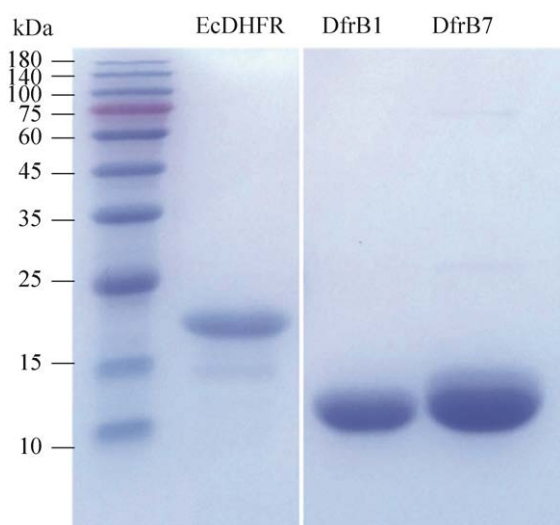


图 4. 二氢叶酸还原酶的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶图
Figure 4. SDS-PAGE of purified dihydrofolate reductases.

测定不同底物(DHF)浓度下,二氢叶酸还原酶催化 NADPH : DHF 氧化还原反应在 1 min 内 340 nm 处吸光度的变化速率,所得数据进行非线性回归分析,反应中 NADPH 的摩尔消光系数 ϵ 为 $12300 (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 计算得到相应的 K_m 、 k_{cat} 等酶活参数(表 2)。从表 2 可看出,相比 EcDHFR, B 家族 DfrB1 和 DfrB7 的底物亲和力(K_m)相近,但酶活效率(k_{cat})显著降低了 200–400 倍,使得催化效率(k_{cat}/K_m)也显著降低。由此可以说明,包括新型 DfrB7 在内的 B 家族 DHFR 催化 NADPH : DHF 氧化还原反应的酶活效率显著低于细菌染色体上 EcDHFR。使用等温滴定量热法

(ITC)测定并比较了对 TMP 敏感的 EcDHFR 以及 TMP 耐受的 DfrB1、DfrB7 对 TMP 的平衡解离常数(图 5, 表 2)。结果表明, EcDHFR 与 TMP 的平衡解离常数为 10.02 nmol/L, 与之前文章报道的 9.1 nmol/L 相近^[19], 而 ITC 实验未能检测到 DfrB1 或 DfrB7 与 TMP 的结合。ITC 实验表明,相比细菌染色体上 EcDHFR, B 家族 DHFR 对 TMP 的亲和力极低。综合数据说明 DfrB 介导的 TMP 高耐药性不是因为更高的酶活催化效率,更可能与抗生素的亲和力低相关。

3 讨论

现有研究认为,常存在于质粒上的 B 家族 *dfr* 基因能引起菌株对 TMP 的高耐药性。但解析 DfrB1 晶体结构后推测 B 家族 DHFR 由于缺乏专一高效的催化位点,在进化角度上并不是一个进化完全的酶,如何导致抗生素的不敏感可能需要从理化性质方面解释。B 家族 DHFR 是一种非常独特的酶,从结构到进化关系都完全不同于 A 家族典型的 DHFR。尤其四聚体结构形成一个单一具有 222 对称的活性位点孔,呈松散的沙漏状,底物 DHF 和辅因子 NADPH 都需要水分子等调节与蛋白的结合^[20–21]。本文基于已发现的 *dfrB7* 基因,通过序列比对和进化树分析确定了新型 *dfrB7* 基因家族分类。*dfrB7* 与其余 7 个 B 家族 *dfr*

表 2. 纯化 DHFR 的 NADPH : 二氢叶酸氧化还原酶动力学参数

Table 2. NADPH: dihydrofolate oxidoreductase enzymatic parameters of purified DHFRs

Enzyme	Enzymatic parameters			ITC measurements			
	$K_m/(\mu\text{mol/L})$	$k_{\text{cat}}/(\text{s}^{-1})$	$k_{\text{cat}}/K_m/[\text{L}/(\mu\text{mol} \cdot \text{s})]$	$K_D/(\text{nmol/L})$	$\Delta G/(\text{kcal/mol})$	$\Delta H/(\text{kcal/mol})$	$-T\Delta S/(\text{kcal/mol})$
EcDHFR	27.33±5.63	17.52±168.00	0.6410	10.02±3.31	-10.940±0.207	-13.260±0.986	2.30±1.13
DfrB1	25.19±5.00	0.08000±0.00725	0.0032	ND	ND	ND	ND
DfrB7	21.90±4.21	0.04500±0.00425	0.0021	ND	ND	ND	ND

Numbers are in mean±standard deviation. ND: not determined.

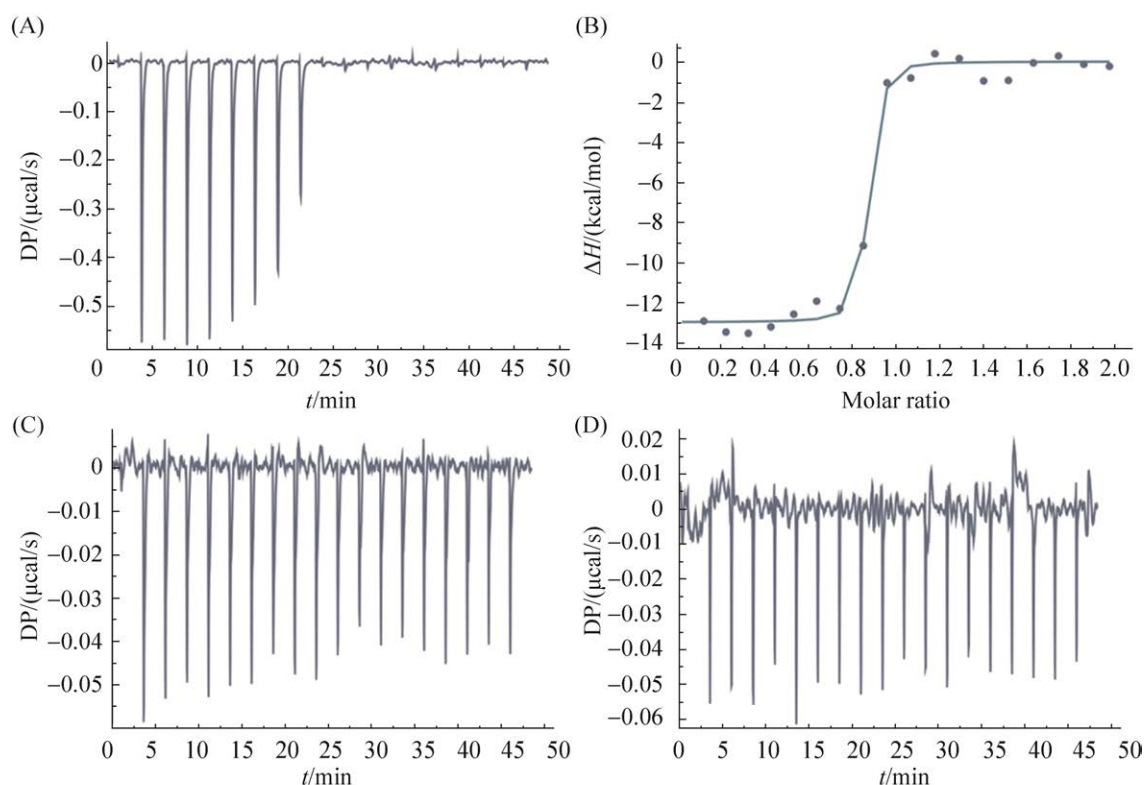


图 5. 等温滴定量热法分析 TMP 与 DHFR 和 NADPH 二元配合物的结合

Figure 5. Analysis of TMP binding with the binary complex of DHFR and NADPH using isothermal titration calorimetry. A: Binding of TMP to EcDHFR:NADPH complex; B: Binding of TMP to DfrB1:NADPH complex; C: Binding of TMP to DfrB7:NADPH complex. Curves represent non-linear least-squares fit to a 1:1 binding model.

基因编码的蛋白保持 88% 的序列相似性, 但 C 端多了 4 个氨基酸, 对理化性质的影响未知。基于此, 我们通过一系列生化实验和分析, 探究了 DfrB7 的具体酶动力学等生化特性并与 B 家族代表性的 DfrB1 以及染色体上 DHFR 相比较, 尝试解析 B 家族 DHFR 对 TMP 的耐受机制。此前对 TMP 获得性耐药的研究表明, *dfr* 基因启动子的过表达、一些关键位点氨基酸突变使得抗生素分子结合受限等都可能致耐药性的出现。原始菌株与克隆菌株的药敏实验表明 *dfrB7* 基因编码的功能性蛋白不能与 TMP 结合, 是菌株出现 TMP 耐药表型的原因。与本文对 DfrB1 和 DfrB7 酶活

性质的研究结论类似, 最新的文献报道了 B 家族 DHFRs 间的各项酶动力学参数具有很高的相似性^[22]。B 家族 DHFR 中只有 DfrB1 同时具有结构和动力学参数表征^[12], 此前以 DfrB1 为例, 研究表明 B 家族 DHFRs 的一个特性是对 TMP 等抗叶酸药物具有极低的结合力^[20], 从结构上分析, 一方面是相比底物 DHF, TMP 没有酰胺基团与 B 家族 DHFRs 骨架上的 Ile68 形成氢键^[23], 另一方面 B 家族 DHFRs 的疏水活性中心缺乏羧酸基团, 导致其不能像典型的 DHFR 那样与质子化的 TMP 形成静电相互作用^[19,22]。异源表达和纯化出 DfrB7 蛋白后, 我们通过具体的分子和生化实验

验证了 DfrB7 对 TMP 的低亲和力特性。

本文从蛋白功能角度, 考虑到酶活效率可能也是菌株躲避抗生素“攻击”的因素, 设计了体外酶活实验, 检测 TMP 与 DHFR 亲和力的 ITC 实验, 尝试从生化角度解释新型 DfrB7 对 TMP 耐药的具体策略。结果表明, 相比细菌染色体上进化完全的 DHFR, 包括 DfrB7 在内的 B 家族 DHFR 对 TMP 分子显著低的结合力是甲氧苄啶耐药性的原因, 这一结果也与之前对 DfrB1 晶体结构的解析和推论相一致。

参考文献

- [1] Watson M, Liu JW, Ollis D. Directed evolution of trimethoprim resistance in *Escherichia coli*. *The FEBS Journal*, 2007, 274(10): 2661–2671.
- [2] Then RL. Antimicrobial dihydrofolate reductase inhibitors - achievements and future options: review. *Journal of Chemotherapy*, 2004, 16(1): 3–12.
- [3] Huovinen P, Sundström L, Swedberg G, Sköld O. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1995, 39(2): 279–289.
- [4] Sköld O. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Veterinary Research*, 2001, 32(3/4): 261–273.
- [5] Wróbel A, Arciszewska K, Maliszewski D, Drozdowska D. Trimethoprim and other nonclassical antifolates an excellent template for searching modifications of dihydrofolate reductase enzyme inhibitors. *The Journal of Antibiotics*, 2020, 73(1): 5–27.
- [6] Kahlmeter G. An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO-SENS Project. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, 51(1): 69–76.
- [7] Kahlmeter G, Poulsen HO. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections in Europe: the ECO-SENS study revisited. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2012, 39(1): 45–51.
- [8] Allegra CJ, Kovacs JA, Drake JC, Swan JC, Chabner BA, Masur H. Activity of antifolates against *Pneumocystis carinii* dihydrofolate reductase and identification of a potent new agent. *The Journal of Experimental Medicine*, 1987, 165(3): 926–931.
- [9] Fleming MP, Datta N, Grüneberg RN. Trimethoprim resistance determined by R factors. *British Medical Journal*, 1972, 1(5802): 726–728.
- [10] Sánchez-Osuna M, Cortés P, Llagostera M, Barbé J, Erill I. Exploration into the origins and mobilization of di-hydrofolate reductase genes and the emergence of clinical resistance to trimethoprim. *Microbial Genomics*, 2020, 6(11): mgen000440.
- [11] Alonso H, Gready JE. Integron-sequestered dihydrofolate reductase: a recently redeployed enzyme. *Trends in Microbiology*, 2006, 14(5): 236–242.
- [12] Toulouse J, Yachnin BJ, Ruediger EH, Deon D, Gagnon M, Saint-Jacques K, Ebert MCC, Forge D, Bastien D, Colin DY, Vanden Eynde JJ, Marinier A, Berghuis AM, Pelletier JN. Structure-based design of dimeric bisbenzimidazole inhibitors to an emergent trimethoprim-resistant type II dihydrofolate reductase guides the design of monomeric analogues. *ACS Omega*, 2019, 4(6): 10056–10069.
- [13] Duff M, Desai N, Craig MA, Agarwal PK, Howell EE. Crowders steal dihydrofolate reductase ligands through quinary interactions. *Biochemistry*, 2019, 58(9): 1198–1213.
- [14] Ebert MCCJC, Morley KL, Volpato JP, Schmitzer AR, Pelletier JN. Asymmetric mutations in the tetrameric R67 dihydrofolate reductase reveal high tolerance to active-site substitutions. *Protein Science*, 2015, 24(4): 495–507.
- [15] Strader MB, Chopra S, Jackson M, Smiley RD, Stinnett L, Wu J, Howell EE. Defining the binding site of homotetrameric R67 dihydrofolate reductase and correlating binding enthalpy with catalysis. *Biochemistry*, 2004, 43(23): 7403–7412.
- [16] Xu H, Broersma K, Miao V, Davies J. Class 1 and class 2 integrons in multidrug-resistant gram-negative bacteria isolated from the Salmon River, British Columbia. *Canadian Journal of Microbiology*, 2011, 57(6): 460–467.
- [17] Reeve SM, Si D, Krucinska J, Yan YZ, Viswanathan K, Wang SY, Holt GT, Frenkel MS, Ojewole AA, Estrada A, Agabiti SS, Alverson JB, Gibson ND, Priestley ND, Wiemer AJ, Donald BR, Wright DL. Toward broad spectrum dihydrofolate reductase inhibitors targeting trimethoprim resistant enzymes identified in clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *ACS Infectious Diseases*, 2019, 5(11): 1896–1906.
- [18] Li L, Zhang MG, Wang WJ, Xia RR, Ma YN, Wei X, Wang XH, Sun XM, Xie XH, Xie SL, Wang MY, Xu H. Identification and characterization of two novel ISCR1-associated genes *dfrA42* and *dfrA43* encoding trimethoprim resistant dihydrofolate reductases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2021: AAC.02010–AAC.02020.
- [19] Abdizadeh H, Tamer YT, Acar O, Toprak E, Atilgan AR, Atilgan C. Increased substrate affinity in the *Escherichia coli* L28R dihydrofolate reductase mutant causes trimethoprim resistance. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2017, 19(18): 11416–11428.
- [20] Krahn JM, Jackson MR, DeRose EF, Howell EE, London RE. Crystal structure of a type II dihydrofolate reductase catalytic ternary complex. *Biochemistry*, 2007, 46(51): 14878–14888.

- [21] Chopra S, Dooling RM, Horner CG, Howell EE. A balancing act between net uptake of water during dihydrofolate binding and net release of water upon NADPH binding in R67 dihydrofolate reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(8): 4690–4698.
- [22] Toulouse JL, Shi GB, Lemay-St-denis C, Ebert MCCJC, Deon D, Gagnon M, Ruediger E, Saint-Jacques K, Forge D, Vanden Eynde JJ, Marinier A, Ji XH, Pelletier JN. Dual-target inhibitors of the folate pathway inhibit intrinsically trimethoprim-resistant DfrB dihydrofolate reductases. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2020, 11(11): 2261–2267.
- [23] Bastien D, Ebert MCCJC, Forge D, Toulouse J, Kadnikova N, Perron F, Mayence A, Huang TL, Vanden Eynde JJ, Pelletier JN. Fragment-based design of symmetrical bis-benzimidazoles as selective inhibitors of the trimethoprim-resistant, type II R67 dihydrofolate reductase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2012, 55(7): 3182–3192.

Characterization and biochemistry analysis of a novel trimethoprim resistant DfrB7 and the mechanism of trimethoprim resistance

Ling Li, Mingyu Wang*, Hai Xu*

State Key Laboratory of Microbial Technology, Microbial Technology Institute, Shandong University, Qingdao 266237, Shandong Province, China

Abstract: [Objective] To characterize novel acquired trimethoprim resistance gene *dfrB7*, and to determine the biochemical basis of acquired trimethoprim resistance for DfrB7 coded by novel *dfrB7* and previously known representative Family B DHFRs. [Methods] Phylogenetic analysis of previously reported DfrB proteins and the novel DfrB7 was performed. PCR-amplified *dfr* genes were cloned into pACYC184 and pET15b(+) vectors, followed by transformation into *Escherichia coli*. The *dfr*-pACYC184 plasmid containing *E. coli* strains were tested for trimethoprim susceptibility by microdilution broth method. Enzymatic catalysis parameters were determined by analyzing the NADPH: dihydrofolate oxidoreductase activities. Isothermal titration calorimetry was performed to measure the dissociation constants between TMP and DHFRs. [Results] Novel *dfrB7* gene conferred trimethoprim resistance (MIC \geq 1024 mg/L) when it was cloned into *E. coli*. Phylogenetic analysis showed that *dfrB7* encodes a Family B DHFR. Novel *dfrB7* and previously known representative *dfr* genes were overexpressed and purified for the analysis of enzymatic parameters and TMP affinity. Comparing with chromosomal DHFR, both DfrB1 and DfrB7 showed significantly lower activities, and Family B DHFRs have drastic lower affinities to trimethoprim. [Conclusion] DfrB7 encoded by a novel *dfrB7* gene has common characteristics of Family B DHFRs. The acquired resistance to trimethoprim is caused by the low affinities of Family B DHFRs to trimethoprim.

Keywords: dihydrofolate reductase, trimethoprim resistance, biochemistry analysis

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31770042, 31770043) and by the Shandong Province Key Research and Development Program (2020CXGC011305)

*Corresponding authors. Tel/Fax: +86-532-58630856; E-mail: Hai Xu, haixu@sdu.edu.cn, Mingyu Wang, wangmingyu@sdu.edu.cn

Received: 22 March 2021; Revised: 22 June 2021; Published online: 11 October 2021