Archive of SID

ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(3):511-518

Horizontal transfer analysis of type III secretion system (T3SS) genes in several types of Pseudomonas bacteria using Seqword software

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Panahi A.*[1] *PhD,*
Vaseghi A.[2] *PhD*

How to cite this article
Panahi A, Vaseghi A. Horizontal transfer analysis of type III secretion system (T3SS) genes in several types of Pseudomonas bacteria using Seqword software. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(3):-511-518.

[1]Biology Department, Science Faculty, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
[2]Nanobiotechnology Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Correspondence
Address: Biology Department, Science Faculty, University of Mohaghegh Ardabili, Daneshgah Street, Ardabil, Iran. Postal Code: 5619913131
Phone: +98 (45) 31505208
Fax: +98 (45) 31505208
arpanahi@uma.ac.ir

Article History
Received: December 26, 2018
Accepted: March 13, 2019
ePublished: September 21, 2019

ABSTRACT

All bacteria have many different secretion systems to transfer of their macromolecules to out. Currently, seven secretion systems have been identified. Transfer, tracing, and horizontal transmission of this gene groups, are many important in our understanding about these gene's application in bacteria and other substances. In this study, we examined Type III secretion system (T3SS) genes in Pseudomonas with using the bioinformatics software such as SeqWord Genome Browser in some databases for instants, ACLAME, Mobil Elements Genetic (MGEs), and PAthogenicity Islands Data Base (PAIDB). The results indicated that the T3SS genes transfers are observed with the percentage between 30% and 100%. Our findings also show the P. fluorescens bacterium has the most species with 15 transmitted genes. Bioinformatics predictors showed P. fluorescens F113 subtype with 11 genes had the highest transferability of T3SS cluster genes. The bacteria species such P. Fluorescens Pf-5, P. syringae pv. Glycinea, P. syringae pv. Aptata, P. syringae pv. Japonica, P. syringae pv. Pisi, P. aeruginosa UCBPP-PA14 show up about 100% of horizontal transfer from T3SS. Our results also indicated that T3SS, which are important in the bacteria disease, have the highest transmission rates. This study indicates can be showing the systematic transmission of disease from host and pathogen during the evolution.

Keywords Systematic Horizontal Transfer; Secretion System Proteins; Pathogens Genes

CITATION LINKS

[1] Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types: Induction of ... [2] Type III secretion systems and ... [3] Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry ... [4] Salmonella pathogenicity island 2-encoded type III secretion system mediates ... [5] A cloned pathogenicity island from enteropathogenic ... [6] Process of protein transport by the type ... [7] Two-component sensor RhpS promotes induction ... [8] Safety assessment of transgenic organisms ... [9] Biased gene transfer in microbial ... [10] Lateral gene transfers and the origins of the eukaryote proteome ... [11] Horizontal gene transfer in eukaryotic ... [12] Interpolated variable order motifs for identification ... [13] Horizontal gene transfer in bacterial and archaeal complete ... [14] A new computational method for the detection of horizontal gene ... [15] Bioinformatic detection of horizontally transferred DNA in bacterial ... [16] Detecting horizontal gene transfer between closely related ... [17] Comparative ribosomal protein sequence analyses of a phylogenetically ... [18] Pseudomonas aeruginosa: New insights for the healthcare ... [19] Veterinary, microbiology and microbial ... [20] The type III secretion system of Pseudomonas aeruginosa: Infection ... [21] Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of Pseudomonas ... [22] Pseudomonas syringae pathovars and related pathogens-identification, epidemiology, and ... [23] SeqWord Gene Island Sniffer: A program to study the lateral genetic exchange among ... [24] Global features of sequences of bacterial chromosomes, plasmids and phages revealed by analysis of oligonucleotide usage ... [25] The SeqWord Genome Browser: An online tool for the identification and visualization of atypical regions of bacterial genomes through ... [26] Horizontal gene transfer: Evidence and possible ... [27] Lateral gene transfer and the nature of bacterial ... [28] A computational approach for identifying pathogenicity islands in prokaryotic ... [29] Role of horizontal gene transfer in the evolution of Pseudomonas aeruginosa ... [30] HGTector: An automated method facilitating genome-wide discovery of putative horizontal gene ... [31] HGT-Finder: A new tool for horizontal gene transfer finding and application to Aspergillus ... [32] T-REX: A web server for inferring, validating and visualizing phylogenetic trees and ...

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی انتقال افقی ژن‌های مربوط به پروتئین‌های تیپ III سیستم ترشحی T3SS در چندین گونه باکتری سودوموناس با استفاده از نرم‌افزار SeqWord

علیرضا پناهی* PhD
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
اکبر واثقی PhD
گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده
همه باکتری‌ها دارای سیستم ترشحی برای انتقال ماکرومولکول‌های خود به بیرون هستند. در حال حاضر هفت سیستم ترشحی شناسایی شده است. بررسی انتقال افقی این ژن‌ها و ردیابی آنها، می‌تواند نقس بسیار مهمی در فهم ما در مورد نقش وکاربرد این ژن‌ها در باکتری و موجوات دیگر مانند میزبان آنها را داشته باشد. در مطالعه حاضر با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی مانند SeqWord_Viewer در پایگاهای اطلاعاتی مانند عناصر ژنتیکی متحرک (MGEs)، ACLAME، PAthogenicity Islands DataBase (PAIDB) به بررسی ژن‌های تیپ III (T3SS) در بعضی از گونه‌ای باکتری سودوموناس پرداخته شد. نتایج نشان داد انتقال افقی بین ژن‌های تیپ III بین ۳۰ تا ۱۰۰% است. همچنین باکتری گونه *سودوموناس فلورسنس* با ۱۵ ژن انتقال‌یافته بیشترین گونه را دارد. بررسی‌های بیوانفورماتیکی نشان داد که گونه *P. fluorescens F113* با ۱۱ ژن بیشترین قابلیت انتقال ژن‌های تیپ ۳ سیستم ترشحی را دارد. همچنین نتایج نشان می‌دهد که انتقال افقی در بین ژن‌های تیپ سه در بعضی از گونه‌ها همچون *P. fluorescens Pf-5*، *P. syringae pv. Glycinea*، *P. syringae pv.aptata*، *P. syringae pv.*Japonica، *P. syringae pv. Pisi* و *P. aeruginosa UCBPP-PA14* و انتقال ۱۰۰% در تیپ III سیستم ترشحی مشاهده شد. می‌توان از بررسی‌ها استنتاج کرد که باکتری‌های با احتمال بالا در بیماری‌زایی، بیشترین انتقال افقی را دارند که نشان‌دهنده انتقال سیستماتیک انتقال بیماری بین میزبان و عامل بیماری‌زایی طی تکامل است.

کلیدواژه‌ها: انتقال سیستماتیک افقی، پروتئین‌های سیستم ترشحی، ژن‌های بیماری‌زایی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۲۲
*نویسنده مسئول: arpanahi@uma.ac.ir

مقدمه

سیستم‌های ترشحی، به‌عنوان ابزارهای مورد نیاز در بیماری‌زایی باکتری محسوب می‌شوند که امکان انتقال ماکرومولکول‌های زیستی به‌خصوص پروتئین‌ها و دیگر مولکول‌های تولیدشده در باکتری‌ها به سایر سلول را فراهم می‌سازند. نقش اصلی این سیستم‌ها می‌تواند حفاظتی (آنزیم‌ها و توکسین‌ها) در مقابل مهاجم، انتقال پوشش سلولی، دیواره سلولی، پروتئین‌های غشای سلولی و همچنین برقراری ارتباط بین سلولی باشد. امروزه بررسی‌های مولکولی نشان می‌دهد که هفت نوع عمده سیستم ترشحی وجود دارد که عمدتاً براساس پروتئین‌های تشکیل‌دهنده آنها طبقه‌بندی می‌شود. این در حالی است که اختلاف‌هایی بین سیستم ترشحی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت نیز دیده می‌شود. بررسی‌های مختلف در مورد این سیستم‌ها نشان می‌دهد که سیستم ترشحی باکتری‌ها در پاتوژنیسیته آنها نقش بسیار مهمی دارد. به‌طوری که در گرم منفی می‌توان به نقش عبور از سیتوپلاسم، پری‌پلاسم، غشای خارجی و در گرم مثبت بیشتر عبور از غشای سیتوپلاسمی، اشاره کرد[1]. در بین این سیستم‌های ترشحی، تیپ III سیستم ترشحی (T3SS) از اهمیت به‌خصوصی برخوردار است. به‌طوری که T3SS مجموعه‌ای از ساختارهایی برای انتقال پروتئین‌های بیماری‌زا به درون سیتوزل سلول‌های یوکاریوتی ارایه می‌دهد. عمده پروتئین‌های T3SS، پروتئین‌های ساختاری هستند که شامل ساختار میله داخلی و منفذ، پروتئین‌های افکتور که برای اتصال به سلول میزبان و ایجاد عفونت اولیه لازم هستند و همچنین چاپرون‌ها که در سیتوپلاسم باکتری به افکتورها متصل شده و آنها را به کمپلکس منفذ هدایت می‌کنند[2]. T3SS در جنس‌های مختلف باکترهایی شامل سودوموناس، زانتوموناس، رالستونیا و سالمونلا موجود است[3, 4]. این سیستم ترشحی می‌تواند در جایگاهایی مانند عناصر ژنتیکی غیرپایدار، پلاسمید و جزایر پاتوژنیسیته مانند rp-PA روی باکتری سودوموناس‌ها دیده شود[5]. نقش اصلی T3SS، حمل و انتقال پروتئین‌های موثر در بیماری‌زایی از غشاهای باکتریایی به درون سلول‌ها است. ژن‌هایی که اجزای پروتئینی T3SS را می‌سازند[6]، در تعداد زیادی از باکتری‌های گرم منفی پاتوژن‌های گیاهی و حیوانی حفاظت‌شده هستند[7]. بررسی‌های اسیدآمینه موجود در انواع T3SS نشان‌دهنده شباهت در حدود ۷۰% است[8].

عناصر ژنتیکی متحرک (MGE) توالی‌هایی هستند که می‌توانند بین یک ژنوم یا ژنوم‌های مختلف حرکت کنند و در تکامل موجودات نقش بسیار حیاتی دارند[9]. MGE دارای توالی‌های به‌خصوص ساختاری یا ژن‌هایی که می‌توانند در درون و بین ژنوم مختلف منتقل شوند، هستند. ۵۰% ژنوم انسان، ۳۵% ژنوم *اشرشیا کلی* (*E. coli*) و ۸۰% ژنوم موش از MGE تشکیل شده است[8]. بررسی‌ها نشان می‌دهد که منشا این توالی‌ها عمدتاً خارج ژنومی است[10]. MGE از طریق مکانیزم‌هایی می‌تواند در انتقال افقی ژن دخالت و آن را تسهیل کند. عناصر القایی یکی از موثرترین مکانیزم‌ها در سیستم انتقال افقی ژن‌ها است. این عناصر همچنین می‌توانند عملکرد ژن‌هایی که در نزدیکی محل ورود ژن به ژنوم میزبان هستند را نیز تغییر دهند[11]. این تغییرات می‌تواند شامل تخریب یا غیرفعال‌سازی ژن‌ها در جایگاه ورود ژن باشد. برای مثال ممانعت از یک توالی تنظیمی، تعمیر شکست‌های DNA دو رشته‌ای و حفظ تلومر در دروزوفیلا را شامل می‌شود. انتقال ژن از یک موجود به موجود دیگر بدون داشتن رابطه والد و فرزندی یا رابطه سلول مادری و سلول دختری، انتقال افقی ژن (HGT) نامیده می‌شود. این مکانیزم یا پدیده در تکامل باکتری‌ها نقش داشته و در حدود ۱۷% ژنوم باکتری‌ها از طریق انتقال افقی ژن به دست آمده است. برای تسهیل سازگاری باکتری‌ها با استرس‌های محیطی، برخی صفات

www.SID.ir

Archive of SID

سازگاری از طریق انتقال افقی ژن به دست آمده است[8]. *آلاستیرکریسپ* نشان داد که انتقال افقی ژن (HGT) در انسان هم رخ می‌دهد و این انتقال ژنی تا ده‌ها یا صدها ژن خارجی هم براورد می‌شود (مانند ژن گروه خونی ABO). طبق گزارش‌هایی ۱۷ ژن در انسان از طریق HGT منتقل شده است. بعضی از این ژن‌ها در متابولیزم لیپید که شامل تجزیه اسیدهای چرب و ایجاد گلیکولیپیدها هستند، درگیرند. همچنین HGTهایی را در ویروس‌ها و قارچ‌ها شناسایی کردند که مسئول بیش از انتقال ۵۰ ژن هستند[8]. برای تسهیل سازگاری باکتری‌ها با استرس‌های محیطی برخی صفات سازگاری از طریق انتقال افقی ژن به دست آمده است[12]. در سال ۲۰۰۰ سانتیاگو در بررسی روی ژن‌های انتقالی از باکتری به آرکی‌ها نشان داد تا ۱۵% ژن‌ها انتقال افقی پیدا کرده است[13]. *اریستوتال* در سال ۲۰۰۵ روش و نرم‌افزار جدید برای بررسی ژن‌هایی که به‌صورت افقی منتقل می‌شود، معرفی کرد. *اریستوتال* و همکاران بیشتر از نرم‌افزاری که براساس مرزهای کدون در بررسی انتقال افقی ژن‌ها هستند، استفاده کردند[14-16].

جنس سودوموناس سویه‌هایی دارد که در انسان و حیوانات و بسیاری از گیاهان بیماری‌زا هستند[17]. *سودوموناس آئروژینوزا* که یک باکتری گرم منفی است و در خاک، آب و محیط‌های مرطوب به وفور یافت می‌شود یک بیماری‌زای فرصت‌طلب در بیمارستان به حساب می‌آید[18,19]. در این باکتری‌ها تیپ III ترشحی دارای نقش بسیاری در بیماری‌زایی است[20]. باکتری *سودوموناس سیرینجی* (*P. syringae*) یکی از گونه‌های مهم بین باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی را شامل می‌شود[21,22].

در این تحقیق از ابزار بیوانفورماتیکی SeqWord_Viewer موجود در پایگاه اطلاعاتی SeqWord Genome Browser و پایگاه‌های اطلاعاتی دیگر مانند MGEs، ACLAM استفاده شد. در این نرم‌افزارها از الگوریتم‌های مختلفی که مبنای این الگوریتم‌ها براساس روابط نیاکان، وجود توالی خاص در ابتدا و انتهای ژن، مقدار G+C موجود در داخل توالی و وجود نقاط داغ طراحی شده استفاده شد.

برنامه‌ها و روش‌های آنالیز

باکتری‌های مورد بررسی: در این تحقیق از باکتری‌های گونه‌های *سودوموناس آئروجینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*)، *سودوموناس فلورسنس* (*Pseudomonas fluorescens*)، *سودوموناس سیرینجی* (*Pseudomonas syringae*)، *سودوموناس انتوموفیل* (*Pseudomonas entomophila*)، *سودوموناس مندوسینا* (Pseudomonas mendocina) و همچنین برخی سویه‌ها و ژن‌های تیپ III سیستم ترشحی که در جدول ۱ استفاده شد.

جدول ۱) لیست باکتری‌های و ژن‌های مورد بررسی دارای تیپ سه سیستم ترشحی

Accession number	Gene number	باکتری‌ها
NC_007005.1c1373498-1371411	Psyr_1216	
NC_007005.1-c1374679-1373498	Psyr_1216	
NC_007005.1:c1368032-1367316	Psyr_1216	
NC_007005.1:1357786-1359888	Psyr_1216	
NC_007005.1:1357344-1357784	Psyr_1216	
NC_004578.1:1527570-1528151	hrpE	
NC_007005.1:1356477-1357058	hrpE	*P. syringae pv. syringae* B728a
NC_007005.1:c1367326-1366928	HrcR	
NC_007005.1:c1366931-1366278	HrcR	
NC_007005.1:c1370406-1369057	hrcN	
NC_007005.1:1355109-1355915	Psyr_1196	
NC_007005.1:c1369054-1368608	Psyr_1212	
NC_007005.1:1357142-1357366	syr_1199	
NC_004578.1:1528457-1528888	PSPTO_1388	*P. syringae* pv. tomato
NC_004578.1:c1537026-1536580	hrpO	
NC_004578.1:1528890-1530989	hrpT	
NC_004578.1:1530986-1531189	hrpT	
NC_004578.1:c1536007-1535291	hrpP	
NC_004578.1:c1542594-1541488	hrpJ	
NC_004578.1:1528246-1528470	hrpG	
NC_004578.1:1527570-1528151	hrpE	
NC_004578.1:1527004-1527534	hrpD	*P. syringae* pv. tomato. DC3000
NC_004578.1:c1535301-1534888	hrcQb	
NC_004578.1:c1535301-1534888	hrcQb	
NC_004578.1:c1536573-1536004	hrcQa	
NC_004578.1:c1535301-1534888	hrcQa	
NC_004578.1:c1538378-1537029	hrcN	
AAC34756.1	hrcC	
NC_016830.1:6458039-6458632	PSF113_RS61480	
NC_016830.1:c6467802-6466696	PSF113_RS58840	
NC_016830.1:c6466699-6466046	PSF113_RS58835	
NC_016830.1:c6466036-6465782	PSF113_RS58835	
NC_016830.1:6459857-6462007	PSF113_RS58800	
NC_016830.1:6456198-6456572	PSF113_RS58765	
NC_016830.1:2084414-2085448	PSF113_RS39390	
NC_016830.1:2082709-2083368	PSF113_RS39375	*P. fluorescens* F113
NC_004578.1:1526201-1527007	hrpD	
NC_004578.1:1525818-1526192	hrpB	
NC_004578.1:c1541488-1539401	hrcV	
NC_004578.1:c1533172-1532093	PSF113_RS39375	
NC_004578.1:c1533963-1533169	hrcT	
NC_004578.1:c1534230-1533964	hrcS	
NC_004578.1:c1534840-1534238	HrcR	

www.SID.ir

Archive of SID

ادامه جدول ۱) لیست باکتری‌های و ژن‌های مورد بررسی دارای تیپ سه سیستم ترشحی

باکتری‌ها	Gene number	Accession number
P. fluorescens strain L228	A7318_RS02970	NZ_CP015639.1:c699946-699047
	A7318_RS02950	NZ_CP015639.1:c695815-695162
	A7318_RS02950	NZ_CP015639.1:c696825-695812
	A7318_RS02960	NZ_CP015639.1:c697705-697277
	A7318_RS02965	NZ_CP015639.1:c697280-696822
	A7318_RS25310	NZ_CP015639.1:c5582323-5580392
P. fluorescens Pf-5	hrpb	NC_004129
	hrpa	NC_524511
P. aeruginosa PAO1	pscR	NC_002516.2:c1844147-1843218
	pscR	NC_002516.2:c1843221-1842568
	pscO	NC_002516.2:c1847036-1845714
	pscL	NC_002516.2:1865494-1866138
P. aeruginosa	rcpA	NC_002516.2:c4829629-4828379
	pcrT3SS	15596897
	pcrT3SS	15596896
	pcrT3SS	15596898
	pcrT3SS	15596899
	pcrT3SS	15596900
	pcrT3SS	15596902
	pcrT3SS	15596903
	pcrT3SS	15596912
	pcrT3SS	15596913
	pcrT3SS	15596889
	pcrV	NC_002516.2:1852288-1853172
P. aeruginosa LESB58	hrca	NC_011770
	hrpb	NC_011752
P. aeruginosa UCBPP-PA14	hrpa	NC_008463
P. entomophila L48	hrpa	NC_008027
	hrpb	NC_085422
P. mendocina	PMEN_RS00230	NC_009439.1:44435-44698
	PMEN_RS00225	NC_009439.1:43774-44427
	PMEN_RS00195	NC_009439.1:39429-40343
	PMEN_RS00190	NC_009439.1:36171-37328
	PMEN_RS00145	NC_009439.1:c28721-28353
	PMEN_RS00115	NC_009439.1:c25618-23528
P. syringae pv. glycinea	hrcJ	AAC35801.1
	hrcU	AAC35808.1
	hrpA	AAB00135.1
P. syringae pv. aptata	hrcN	EGH75935
	hrcV	EGH75937
P. syringae pv. japonica	hrcV	EGH28146
P. syringae pv. pisi	hrcV	EGH41115

ژن‌های مورد بررسی

در این آنالیز توالی‌های ژن‌های تیپ III سیستم ترشحی را طبق جدول ۱ از سایت NCBI استخراج کردیم که این توالی‌ها از توالی‌های مهم و اساسی در باکتری سودوموناس هستند.

نرم‌افزارهای مورد استفاده

در این بررسی، از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی SeqWord Genome Browser و SeqWord_Viewer [12, 23] موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی همچون پایگاه اطلاعات جزایر بیماریزایی (PAIDB)، ACLAME استفاده شد. طبق تعریف و اساس کار سایت، نرم‌افزار شامل پارامترهایی مانند X، Y و Z تعریف شده است نشان‌دادن ژن‌هایی که قابلیت انتقال افقی دارند را براساس پارامترهایی مانند انحراف الگوی منطقه‌ای (D)، الگوی انحراف (PS) و واریانس نسبی (rv) تعریف می‌کنند. همچنین طبق الگوی لگاریتمی تعریف‌شده توسط *رو*[24] از الگوی بیانی (OU) برای بررسی ژن‌های انتقال افقی استفاده شد.

یافته‌ها

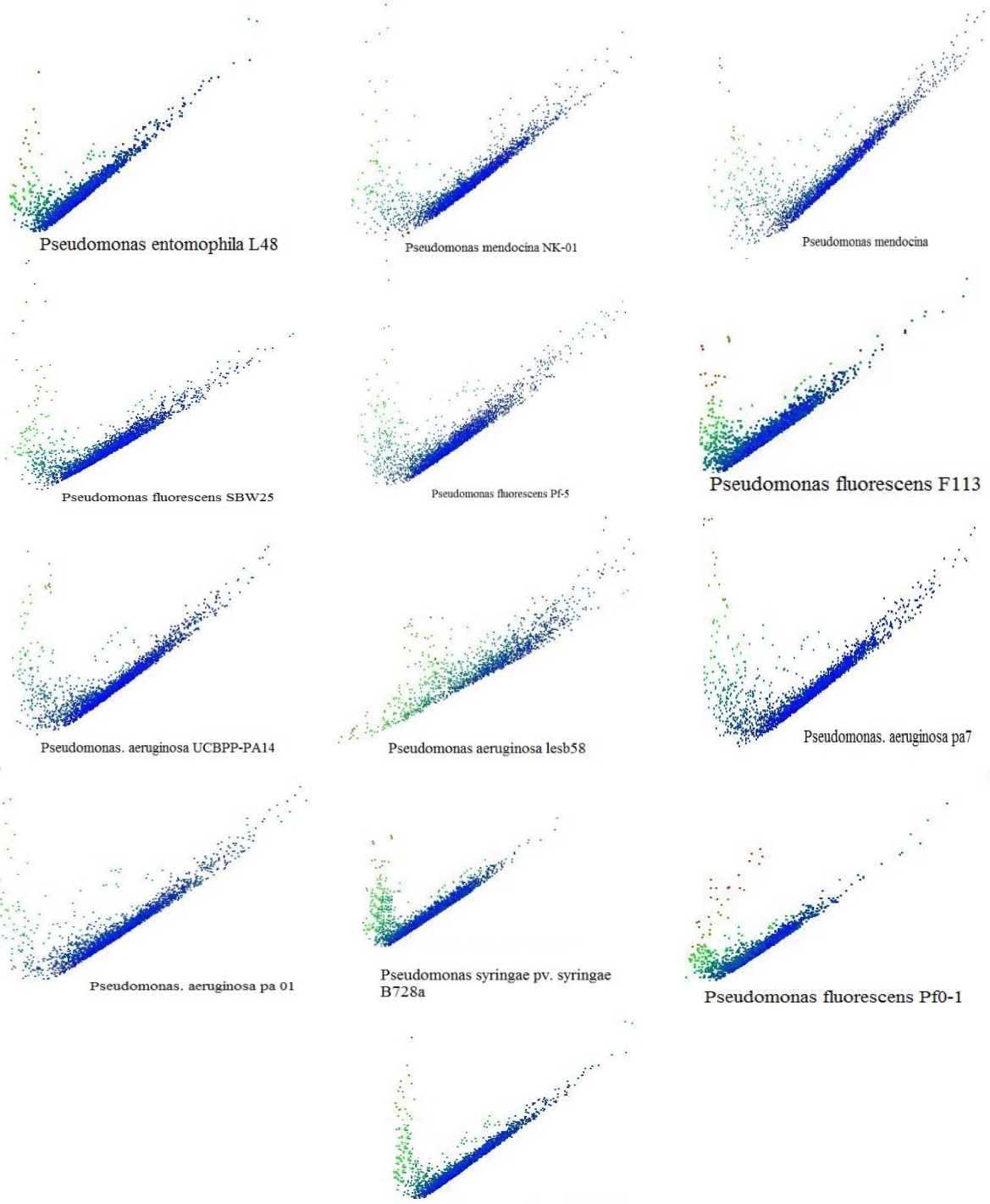
بررسی‌ها روی تمام ژن‌های تیپ III سیستم ترشحی موجود در جزایر بیماری‌زایی باکتری‌های موجود در جدول ۱ صورت گرفت و توالی‌ها به‌صورت فرمت FASTA از بانک‌های اطلاعاتی استخراج و در داخل نرم‌افزار وارد شد. برای واردکردن نمونه ژن‌ها توالی‌هایی از ژن‌ها که میزان بالای درصد GC را داشتند، انتخاب شدند و در مرحله بعد نتایج جدول ۱ را به دست آوردیم. این نتایج نشان می‌دهد که انتقال در ژن‌های تیپ III سیستم ترشحی در گونه‌های باکتری سودوموناس دارای انتقال افقی متفاوتی است. در این نرم‌افزار برای نشان‌دادن انواع ژن‌های دارای انتقال افقی برای محور n1_4mer: RV برای محور X، n1_4mer: GRV برای محور Y و n0_4mer: D برای محور Z تعریف شده است. همچنین ژن‌هایی که دارای بالاترین میزان انتقال افقی هستند را با رنگ سبز و ژن‌های دیگر با رنگ قرمز و قهوه‌ای مشخص شده‌اند[25]. نتایج نشان می‌دهد که انتقال افقی ژن‌های تیپ III بین ۳۰ تا ۱۰۰% متغیر است. در باکتری‌های *P. aeruginosa LESB58*، *P. fluorescens Pf-5*، *P. aeruginosa UCBPP-PA14*، *P. syringae pv. glycinea*، *P. syringae pv. aptata*، *P. syringae pv.japonica*، *P.syringae pv. pisi* انتقال تمام ژن‌های مورد بررسی برای این گونه از باکتری‌ها مشاهده شد. کمترین میزان درصد انتقال مربوط به *P. syringae pv. tomato* است که انتقال فقط در ۳۰% ژن‌ها مشاهده شد. نمودار ۱ که نتایج حاصل از نرم‌افزار SeqWord_Viewer برای باکتری‌های مورد بررسی است، نشان‌دهنده کل تعداد ژن‌هایی هستند که در باکتری‌های مورد

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی قرار گرفته و ژن‌های انتقال داده‌شده به‌صورت افقی را می‌توان به‌صورت سبزرنگ مشاهده کرد. این گراف‌ها نتایج را به‌صورت شماتیک نشان می‌دهند که تعداد، اسامی آنها و همچنین درصد ژن‌های انتقال‌یافته در جدول‌های ۱ و ۲ مشخص است.

نمودار ۲ نشان‌دهنده تعداد ژن‌هایی هستند که با استفاده از نرم‌افزارهای SeqWord_Viewer شناسایی و پیش‌گویی شده‌اند. این نمودار نشان‌دهنده تعداد ژن‌های تیپ III سیستم ترشحی در باکتری‌های مختلف هستند. نمودار نشان می‌دهد که باکتری گونه *سودوموناس فلورسنس* با ۱۵ عدد ژن، باکتری با گونه *سودوموناس آئروجینوزا* با ۱۲ عدد ژن، *P. syringae pv. tomato* با ۷ عدد ژن و *P. syringae* pv. *syringae B728a* با ۹ عدد، بیشترین گونه‌ها را به‌ترتیب دارند. بررسی‌ها نشان می‌دهد که زیرگونه *P.fluorescens F113* با ۱۱ ژن با قابلیت انتقال بیشترین مورد را نشان می‌دهد.



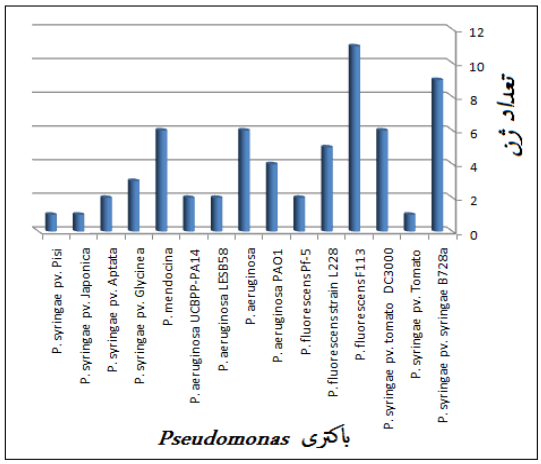
نمودار ۱) نتایج حاصل از آنالیز نرم‌افزار SeqWord Genome Browser برای گونه‌های *سودوموناس انتوموفیل*، *سودوموناس فلورسنس*، *سودوموناس مندوسینا*، *سودوموناس سیرینجی*

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲) تعداد و درصد ژن‌های انتقال داده‌شده که توسط نرم‌افزار SeqWord_Viewer تشخیص داده شده است.

باکتری	ژن‌های افقی	درصد
P. syringae pv. syringae B728a	hrcN, hrpE, Psyr_1216 (NC_007005.1:1356477-1357058, NC_007005.1: c 1366931-1366278, NC_007005.1:1356477-1357084 NC_007005.1-c1374679-1373498, NC_007005. 1c1373498-1371411), HrcR (NC_007005.1:c1367326-1366928), syr_1199	۷۰
P. syringae pv. tomato	hrpO	۳۰
P. syringae pv. tomato. DC3000	hrpJ, hrpB, hrcU, hrcQb, hrcQa, hrcC	٤٦
P. fluorescens F113	PSF113_RS58765, PSF113_RS58835 (NC_016830.1:c6466699-6466046, NC_004578.1:c1533172-1532093), PSF113_RS39375, PSF113_RS58760, PSF113_1781), hrcT, hrcS, hrcR, hrcV	۵۰
P. fluorescens strain L228	A7318_RS02950 (NZ_CP015639.1:c695815-695162, NZ_CP 015639.1:c69 6825-695812) m, A7318_RS02965	۵۰
P. fluorescens Pf-5	hrpb, hrpa	۱۰۰
P. aeruginosa PAO1	pscL, pscO, pscR (NC_002516.2:c1844147-1843218)	۷۵
P. aeruginosa	rcpA, pcrT3SS (15596898, 15596899, 15596902, 15596912, 15596889)	۵۰
P. aeruginosa LESB58	hrpb, hrca (NC_008463)	۱۰۰
P. aeruginosa UCBPP-PA14	hrpa	۱۰۰
P. entomophila L48	hrpa	۵۰
P. mendocina	PMEN_RS00225, PMEN_RS00190, PMEN_RS00145, PMEN_RS00115	٦٦
P. syringae pv. glycinea	hrcU, hrcJ, hrpA	۱۰۰
P. syringae pv. aptata	hrcN, hrcV	۱۰۰
P. syringae pv. japonica	hrcV	۱۰۰
P. syringae pv. pisi	hrcV	۱۰۰



نمودار ۲) نمودار مربوط به تعداد ژن‌های انتقال‌یافته در گونه‌های باکتری سودوموناس

بحث

انتقال افقی ژن، یکی از مهم‌ترین عوامل مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها است[8]. انتقال ژن از یک موجود به موجود دیگر بدون داشتن رابطه والد فرزندی یا رابطه سلول مادری سلول دختری در تکامل باکتری‌ها نقش بسزایی دارد. برای تسهیل سازگاری باکتری‌ها با استرس‌های محیطی برخی صفات سازگاری از طریق انتقال افقی ژن به دست آمده است[12]. در حال حاضر ۱۲۸۸ ژن خارجی اضافی در ژنوم انسان شناسایی شده است. بیشتر ژن‌های انتقال داده‌شده عمدتاً در واکنش‌های ایمنی بدن شامل واکنش التهابی، سیگنال‌دهی ایمنی سلول و واکنش‌های ضدمیکروبی نقش دارند. باکتری‌ها و آغازیان دسته دیگری از میکروارگانیزم‌ها هستند که ژن‌های فراوانی از ویروس‌ها به آنها انتقال داده شده است. همچنین بعضی از ژن‌ها در باکتری‌ها شناسایی شده‌اند که از قارچ‌ها منشا گرفته‌اند[13]. سیستم‌های ترشحی به‌خصوص سیستم ترشحی نوع سه در باکتری‌های گرم منفی نقش عبور از سیتوپلاسم، پری‌پلاسم، غشای خارجی و در گرم مثبت بیشتر عبور از غشای سیتوپلاسمی و دیواره سلولی را بر عهده دارند[1]. نقش اصلی سیستم نوع T3SS، حمل و انتقال پروتئین‌های موثر در بیماری‌زایی باکتری‌ها به درون سلول‌ها است[5]. *ریستوتال* و همکاران در سال ۲۰۰۵ روش و نرم‌افزار جدیدی برای بررسی ژن‌های که به‌صورت افقی منتقل می‌شوند را معرفی کردند[14-16]. در روش‌های سنتی بیشتر از روش‌های فیلوژنتیکی برای بررسی و مطالعه انتقال افقی استفاده می‌شود[26]. در روش‌های جدید بیشتر از پارامترهایی همچون مقدار GC برای بررسی انتقال افقی ژن‌ها استفاده شده است[27]. در بررسی روی باکتری *اشرشیا کلی* برای مطالعه ژن‌های که به‌صورت افقی منتقل می‌شود، محققان سعی بر استفاده از ORFهایی که تکراری بوده و در توالی‌های ژنوم باکتری‌هایی مختلف، وجود دارد، استفاده شده است. توالی‌های مانند جزایر پاتولوژیکی (PI) از دسته‌های ژنی هستند که قابلیت انتقال افقی بالایی دارند که با روش‌های مختلف بیوانفورماتیکی مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته‌اند[28]. در سال ۲۰۰۹ مقاله‌ای با عنوان نقش انتقال افقی در تکامل باکتری *سودوموناس آئروجینوزا* منتشر شد که نشان‌دهنده انتقال توسط باکتریوفاژ است. به نظر می‌رسد انتقال افقی در *سودوموناس آئروجینوزا* توسط باکتریوفاژ احتمالاً یک تعامل بین پاتوژن و میزبان بوده که عمدتاً برای نگهداری و حفظ فنوتیپ‌های بیماری‌زایی در *سودوموناس آئروجینوزا* است[29].

www.SID.ir

Archive of SID

ابزارهای بیوانفورماتیکی همچون SeqWord Genome Browser [23]، HGT، HGTector [30]، HGTFinder [31]، trex [32] و سایت‌های آنلاین همچون (MGEs)، ACLAME بیشتر از پارامترهای مهم در بررسی انتقال عمودی و افقی طی نسل‌های مختلف استفاده می‌کنند. نرم‌افزارهایی همچون SeqWord به‌دلیل سرعت بالای آنالیز، بررسی تمام پارامترهای مهم مانند رابطه نیاکان، میزان GC، بررسی کامل ORF و قابلیت مشاهده نتایج به‌صورت گراف بین پژوهشگران مقبولیت فراوانی دارد. ما در بررسی توالی‌هایی در بعضی از ژن‌های موجود در واریانت‌هایی مانند pscR (NC_002516.2:c1844147-1843218) در سویه *P. aeruginosa PAO1* انتقال افقی مشاهده نمودیم، در صورتی که واریانت دیگر این ژن با نام NC_002516.2:c1843221-1842568 انتقال صورت نمی‌پذیرد. این نتایج اختصاصیت و حساسیت نرم‌افزار برای بررسی انتقال افقی ژن‌های خاص را نشان می‌دهد. ما در این پژوهش نشان دادیم که بعضی از ژن‌ها کاملاً در گونه‌های باکتری‌های *سودوموناس سیرینجی*، *P. syringae pv. glycinea*، *P.syringae pv aptata*، *P. syringae pv. Japonica*، *P. syringae pv. pisi*، *P. aeruginosa UCBPP-PA1*، *P. fluorescens f-5* و *P. aeruginosa LESB58* منتقل می‌شود. بررسی روی نرم‌افزار نشان‌دهنده انتقال افقی ژن‌های تیپ III از ۳۰% در باکتری *P. syringae* pv tomato تا ۱۰۰% در بیشتر سویه‌ها متغیر است.

نتایج نمودارهای ۱ و ۲ به‌صورت جداگانه نشان می‌دهند که باکتری گونه‌های *سودوموناس فلورسنس* با سه سویه مختلف، ژن‌های مختلفی را انتقال می‌دهند. در سویه *P. fluorescens Pf-5*، hrpb و hrpa منتقل می‌شوند که در میزان بیماری‌زایی باکتری نمی‌تواند به‌تنهایی عمل کند، تمام ژن‌هایی که به تیپ III سیستم ترشحی مربوط بودند از طریق انتقال افقی انتقال پیدا کرده‌اند. در سویه *P. fluorescens strain L228* تعداد ژن‌های منتقل‌یافته و توالی آنها با توالی تیپ III مشابه بوده و بالای ۸۰% مشابهت توالی دیده می‌شود. این نتایج نشان‌دهنده وجود نقاط داغ در این تیپ از سیستم‌های ترشحی بوده که بسیار ناپایدار هستند و قابلیت انتقال بالایی دارند. سویه *P. fluorescens F113* با تعداد یازده ژن از مجموع تیپ‌های III سیستم ترشحی بیشترین تعداد از نظر عددی را به خود اختصاص داد این در حالی است که فقط در مجموع ۵۰% ژن‌ها که عمدتاً تیپ III سیستم ترشحی مانند hrcV، hrcR، hrcS و hrcT منتقل پیدا می‌کنند. گونه *سودوموناس آئروجینوزا* که یکی از گونه‌های مهم و حیاطی در آلودگی‌های بیمارستانی است نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این باکتری نشان‌دهنده انتقال تمام ژن‌هایی که در بیماری‌زایی نقش دارند، است.

بررسی‌های بیوانفورماتیکی می‌تواند نشان‌دهنده این فرضیه باشند که باکتری‌هایی که میزان بالایی بیماری‌زایی در موجودات زنده را دارند، بیشترین انتقال افقی را نشان می‌دهند که تاییدکننده این فرضیه است که انتقال سیستماتیک بیماری بین میزبان و پاتوژن طی تکامل صورت گرفته است. همچنین انتقال افقی بین ژن‌های سیستم ترشحی تیپ III نشان‌دهنده اهمیت آنها در انتقال عوامل بیماری، و همچنین انتقال ژن‌هایی برای مقابله با مقاومت میزبان در مقابل پاتوژن را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

ابزارهای بیوانفورماتیکی پنجره‌ای جدید برای بررسی و شناسایی ژن‌هایی که عامل مهم بیماری‌زایی هستند که انتقال این ژن‌ها می‌تواند بین موجودات یک گونه یا از گونه به گونه‌ای دیگر و حتی از موجود به موجود دیگر انتقال پیدا کند، است. نتایج چنین بررسی‌ها می‌تواند در شناسایی جایگاه ژن انتقال‌یافته در موجود مبدا و روش‌های مقابله با آن را نشان دهد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان این مقاله کمال تشکر و قدرانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی بابت حمایت مالی و معنوی در اجرای این طرح را می‌نماید.

تاییدیه‌اخلاقی: نویسندگان مقاله نهایت تلاش خود را در ارایه صحیح داده‌ها را در جهت اخلاق حرفه‌ای علمی نموده‌اند.

تعارض منافع: مقاله حاضر هیچ نوع تعارضی در منافع و یافته‌های دیگر طرح‌های تحقیقاتی نداشته و ندارد.

سهم نویسندگان: علیرضا پناهی (نویسنده اول)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۶۰%)؛ اکبر واثقی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۴۰%)

منابع مالی: منابع مالی از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی تامین شده است.

منابع

1- Avery OT, MacLeod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus type III. J Exp Med. 1944;79(2):137-58.

2- Coburn B, Sekirov I, Finlay BB. Type III secretion systems and disease. Clin Microbiol Rev. 2007;20(4):535-49.

3- Alto NM, Shao F, Lazar CS, Brost RL, Chua G, Mattoo S, et al. Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry functions. Cell. 2006;124(1):133-45.

4- Gallois A, Klein JR, Allen LA, Jones BD, Nauseef WM. Salmonella pathogenicity island 2-encoded type III secretion system mediates exclusion of NADPH oxidase assembly from the phagosomal membrane. J Immunol. 2001;166(9):5741-8.

5- McDaniel TK, Kaper JB. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic Escherichia coli confers the attaching and effacing phenotype on E. coli K-12. Mol Microbiol. 1997;23(2):399-407.

6- Ghosh P. Process of protein transport by the type III secretion system. Microbiol Mol Biol Rev.

www.SID.ir

Archive of SID

Microbiol. 2009;7(9):654-65.
21- Hwang MS, Morgan RL, Sarkar SF, Wang PW, Guttman DS. Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of Pseudomonas syringae. Appl Environ Microbiol. 2005;71(9):5182-91.
22- Fatmi MB, Collmer A, Iacobellis NS, Mansfield JW, Murillo J, Schaad NW, et al, editors. Pseudomonas syringae pathovars and related pathogens-identification, epidemiology, and genomics. Berlin: Springer Science & Business Media; 2008. pp. 420-30.
23- Bezuidt O, Lima-Mendez G, Reva ON. SeqWord Gene Island Sniffer: A program to study the lateral genetic exchange among bacteria. World Acad Sci Eng Technol. 2009;3(10):2399-404.
24- Reva ON, Tümmler B. Global features of sequences of bacterial chromosomes, plasmids and phages revealed by analysis of oligonucleotide usage patterns. BMC Bioinform. 2004;5(1):90.
25- Ganesan H, Rakitianskaia AS, Davenport CF, Tümmler B, Reva ON. The SeqWord Genome Browser: An online tool for the identification and visualization of atypical regions of bacterial genomes through oligonucleotide usage. BMC Bioinform. 2008;9(1):333.
26- Syvanen M. Horizontal gene transfer: Evidence and possible consequences. Annu Rev Genet. 1994;28(1):237-61.
27- Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. Nature. 2000;405(6784):299-304.
28- Yoon SH, Hur CG, Kang HY, Kim YH, Oh TK, Kim JF. A computational approach for identifying pathogenicity islands in prokaryotic genomes. BMC Bioinform. 2005;6(1):184.
29- Qiu X, Kulasekara BR, Lory S. Role of horizontal gene transfer in the evolution of Pseudomonas aeruginosa virulence. In: De Reuse H, Bereswill S, editors. Microbial pathogenomics. 6th Volume. Basel: Karger Publishers; 2009. pp. 126-39.
30- Zhu Q, Kosoy M, Dittmar K. HGTector: An automated method facilitating genome-wide discovery of putative horizontal gene transfers. BMC Genom. 2014;15(1):717.
31- Nguyen M, Ekstrom A, Li X, Yin Y. HGT-Finder: A new tool for horizontal gene transfer finding and application to Aspergillus genomes. Toxins. 2015;7(10):4035-53.
32- Boc A, Diallo AB, Makarenkov V. T-REX: A web server for inferring, validating and visualizing phylogenetic trees and networks. Nucleic Acids Res. 2012;40(W1):W573-9.
2004;68(4):771-95.
7- Xiao Y, Lan L, Yin C, Deng X, Baker D, Zhou JM, et al. Two-component sensor RhpS promotes induction of Pseudomonas syringae type III secretion system by repressing negative regulator RhpR. Mol Plant Microbe Interact. 2007;20(3):223-34.
8- OECD. Safety assessment of transgenic organisms: OECD consensus documents. 3. Paris: OECD; 2010. pp. 171-4.
9- Andam CP, Gogarten JP. Biased gene transfer in microbial evolution. Nat Rev Microbiol. 2011;9(7):543-55.
10- Hirt RP, Alsmark C, Embley TM. Lateral gene transfers and the origins of the eukaryote proteome: A view from microbial parasites. Curr Opin Microbiol. 2015;23:155-62.
11- Keeling PJ, Palmer JD. Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. Nat Rev Genet. 2008;9(8):605-18.
12- Vernikos GS, Parkhill J. Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: Revisiting the Salmonella pathogenicity islands. Bioinformatics. 2006;22(18):2196-203.
13- Garcia-Vallvé S, Romeu A, Palau J. Horizontal gene transfer in bacterial and archaeal complete genomes. Genome Res. 2000;10(11):1719-25.
14- Tsirigos A, Rigoutsos I. A new computational method for the detection of horizontal gene transfer events. Nucleic Acids Res. 2005;33(3):922-33.
15- Langille MG, Brinkman FS. Bioinformatic detection of horizontally transferred DNA in bacterial genomes. F1000 Biol Rep. 2009;1:25.
16- Adato O, Ninyo N, Gophna U, Snir S. Detecting horizontal gene transfer between closely related taxa. PLoS Comput Biol. 2015;11(10):e1004408.
17- Ochi K. Comparative ribosomal protein sequence analyses of a phylogenetically defined genus, Pseudomonas, and its relatives. Int J Syst Bacteriol. 1995;45(2):268-73.
18- Ashton Acton Q, editor. Pseudomonas aeruginosa: New insights for the healthcare professional. Atlanta: Scholarly Editions; 2013. pp. 11-32.
19- Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Hartigan P, Fanning S, Fitzpatrick ES. Veterinary, microbiology and microbial disease. 2nd Edition. Hoboken: John Wiley & Sons; 2011. pp. 225-43.
20- Hauser AR. The type III secretion system of Pseudomonas aeruginosa: Infection by injection. Nat Rev

www.SID.ir