



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.

¹Biology Department, Science Faculty, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

²Nanobiotechnology 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 PPathogenicity 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 ...

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 نقش بسیار مهمی در فهم ما در مورد نقش و کاربرد این ژن‌ها در باکتری و موجودات دیگر مانند میزبان آنها را داشته باشد. در مطالعه حاضر با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی مانند SeqWord Viewer در پایگاه‌های اطلاعاتی مانند عناصر ژنتیکی متحرک (MGEs)، ACLAME، Pathogenicity Islands DataBase (PAIDB) به بررسی ژن‌های تیپ III (T3SS) در بعضی از گونه‌های 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 انتقال یافته 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. P. syringae pv. aptata*, *P. syringae pv. Glycinea*, *fluorescens Pf-5*, *P. aeruginosa UCBPP* و *P. syringae pv. Pisi*, *syringae pv. japonica* و *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، به عنوان ابزارهای مورد نیاز در بیماری‌زایی باکتری محسوب می‌شوند که امکان انتقال ماکرومولکول‌های زیستی به خصوص 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. به طوری 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 به خصوصی برخوردار است. به طوری 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 باکتری‌های شامل سودوموناس، زانتوموناس، رالستونیا و سالمونلا موجود است^[3, 4]. این سیستم ترشحی می‌تواند در جایگاه‌هایی 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 اسیدآزمینه 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 به خصوص 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

حساب می‌آید [18, 19]. در این باکتری‌ها تیپ III ترشحی دارای نقش بسیاری در بیماری‌زایی است [20]. باکتری *Sودوموناس سیرینجی* (*P. syringae*) یکی از گونه‌های مهم بین باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی را شامل می‌شود [21, 22].

در این تحقیق از ابزار بیوانفورماتیکی SeqWord_Viewr 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 فلورسینس* (*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.

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 برآورد می‌شود (مانند ژن گروه خونی ABO). طبق گزارش‌هایی ۱۷ ژن در انسان از طریق HGT منتقل شده است. بعضی از این ژن‌ها در متابولیسم 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

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

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

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

ژن‌های مورد بررسی

در این آنالیز توالی‌های ژن‌های تیپ III سیستم ترش‌چی 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.

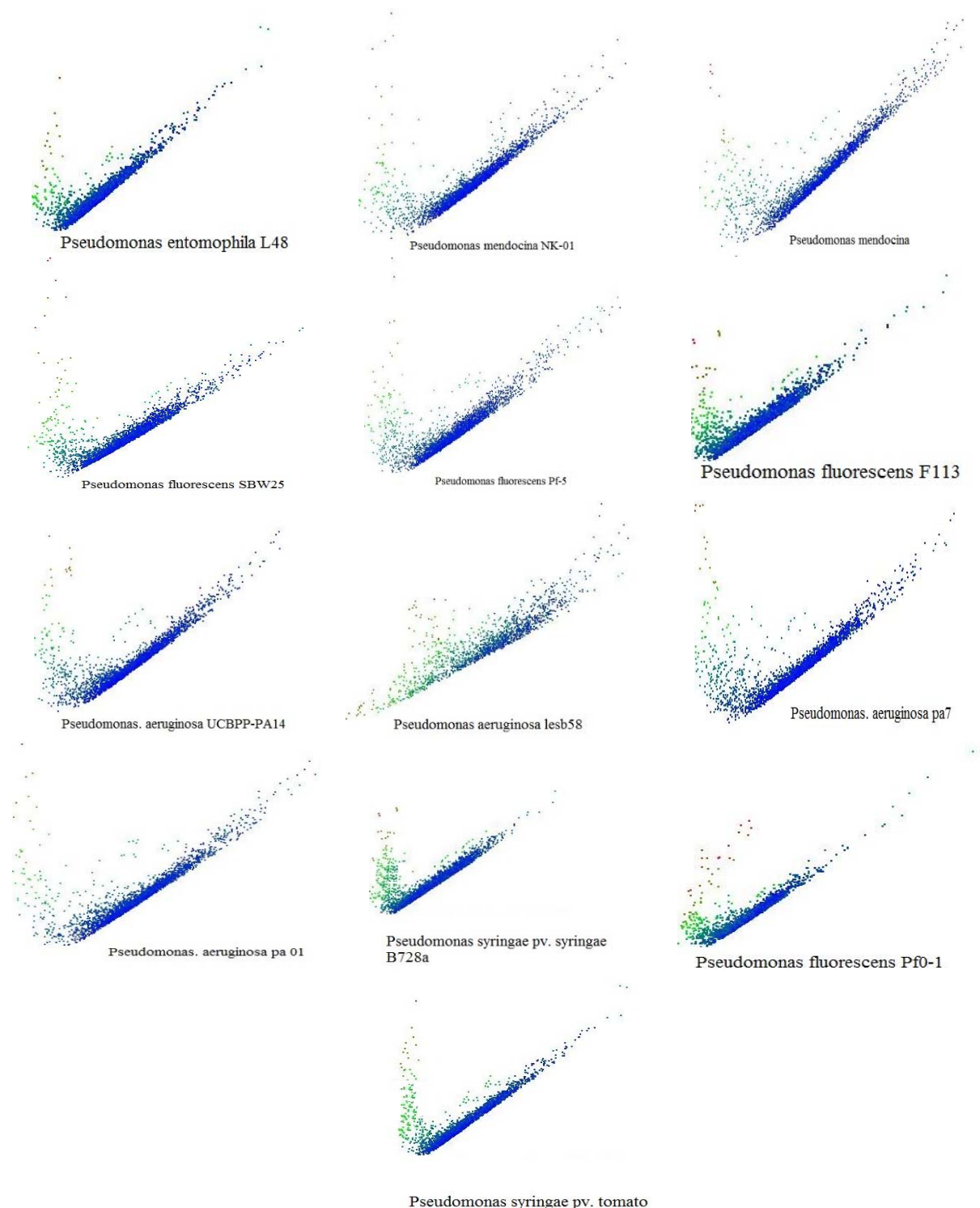
یافته‌ها

بررسی‌ها روی تمام ژن‌های تیپ III سیستم ترش‌چی 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 ترش‌چی 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، GRV: n1_4mer 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. fluorescens* Pf-5، *P. aeruginosa* LESB58، *P. syringae* pv. *glycinea*، *P. aeruginosa* UCBPP-PA14، *P. syringae* pv. *japonica*، *P. syringae* pv. *aptata*، *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

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 به ترتیب دارند. بررسی‌ها نشان می‌دهد که زیرگونه *P. fluorescens* F113 با ۱۱ ژن با قابلیت انتقال بیشترین مورد را نشان می‌دهد.

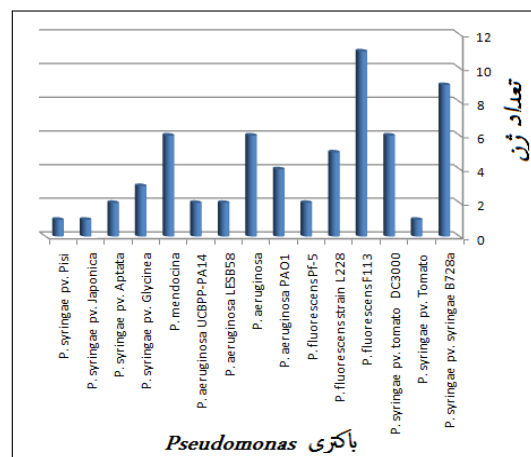
بررسی قرار گرفته و ژن‌های انتقال داده شده به صورت افقی را می‌توان به صورت سبز رنگ مشاهده کرد. این گراف‌ها نتایج را به صورت شماتیک نشان می‌دهند که تعداد، اسامی آنها و همچنین درصد ژن‌های انتقال یافته در جدول‌های ۱ و ۲ مشخص است. نمودار ۲ نشان‌دهنده تعداد ژن‌هایی هستند که با استفاده از نرم‌افزارهای SeqWord Viewer شناسایی و پیش‌گویی شده‌اند. این نمودار نشان‌دهنده تعداد ژن‌های تیپ III سیستم ترشحی در



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

درصد	ژن‌های افقی	باکتری
۷۰	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_007005.1:c1373498-1371411), HrcR (NC_007005.1:c1367326-1366928), syr_1199	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a
۳۰	hrpO	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>
۴۶	hrpJ, hrpB, hrcU, hrcQb, hrcQa, hrcC	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> . DC3000
۵۰	PSF113_RS58765, PSF113_RS58835 (NC_016830.1:c6466699-6466046, NC_004578.1:c1533172-1532093), PSF113_RS39375, PSF113_RS58760, PSF113_1781), hrcT, hrcS, hrcR, hrcV	<i>P. fluorescens</i> F113
۵۰	A7318_RS02950 (NZ_CP015639.1:c695815-695162, NZ_CP 015639.1:c69 6825-695812) m, A7318_RS02965	<i>P. fluorescens</i> strain L228
۱۰۰	hrpb, hrpa	<i>P. fluorescens</i> Pf-5
۷۵	pscL, pscO, pscR (NC_002516.2:c1844147-1843218)	<i>P. aeruginosa</i> PAO1
۵۰	rcpA, pcrT3SS (15596898, 15596899, 15596902, 15596912, 15596889)	<i>P. aeruginosa</i>
۱۰۰	hrpb, hrca (NC_008463)	<i>P. aeruginosa</i> LESB58
۱۰۰	hrpa	<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14
۵۰	hrpa	<i>P. entomophila</i> L48
۶۶	PMEN_RS00225, PMEN_RS00190, PMEN_RS00145, PMEN_RS00115	<i>P. mendocina</i>
۱۰۰	hrcU, hrcJ, hrpA	<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i>
۱۰۰	hrcN, hrcV	<i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i>
۱۰۰	hrcV	<i>P. syringae</i> pv. <i>japonica</i>
۱۰۰	hrcV	<i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i>

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]. *اریستوتال* 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 *شرشیا 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].



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 ضد میکروبی نقش دارند. باکتری‌ها و آغازیان دسته دیگری از میکروارگانیسم‌ها هستند که

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 پنجره‌های 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 انتقال یافته در موجود مبدأ 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 می‌نمایند.

تأییدیه اخلاقی: نویسندگان مقاله نهایت تلاش خود را در ارائه 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 تأمین 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.

ابزارهای بیوانفورماتیکی همچون SeqWord Genome Browser [23]، 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 به دلیل سرعت بالای آنالیز، بررسی تمام پارامترهای مهم مانند رابطه نیاکان، میزان GC، بررسی کامل ORF و قابلیت مشاهده نتایج به صورت 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 *P. syringae* pv. *glycinea*، *P. syringae* pv. *aptata*، *P. syringae* pv. *japonica*، *P. syringae* pv. *pisi*، *P. aeruginosa* UCBPP-PA1 و *P. fluorescens* f-5 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 به صورت جداگانه نشان می‌دهند که باکتری گونه‌های *S. enteritidis* 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 به تنهایی 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 منتقل یافته 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 *hrcS*، *hrcR*، *hrcV* و *hrcT* منتقل پیدا می‌کنند. گونه *S. enteritidis* آتروچینوزا که یکی از گونه‌های مهم و حیاتی 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 تأییدکننده این

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, Tümmeler 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, Tümmeler 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