Мини-обзор генома Burkholderia seminalis

Artyom Tyukaev[1]

[1] Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М. В. Ломоносова

АБСТРАКТ

В данном исследовании представлен обзор некоторых параметров генома Burkholderia seminalis, а именно нуклеотидный состав трех хромосом, анализ белок-кодирующих и РНК-кодирующих генов. Оценена вероятность случайного распределения генов между цепями ДНК. Был рассчитан GC-skew для каждой геномной молекулы. На основе результатов был выдвинут ряд предположений.

ВВЕДЕНИЕ

Представители рода Burkholderia принадлежат к классу β-протеобактерий и имеют широкое распространение, повсеместно обитая в почве, воде и в ассоциации с растениями, грибами, животными и человеком. Некоторые виды Burkholderia являются патогенами растений во многих овощах и фруктах, в то время как другие зарегистрированы как условно-патогенные микроорганизмы человека и других животных[1]. Однако многие другие виды Burkholderia полезны для растений, подавляя болезни растений и стимулируя рост растений с помощью различных процессов, включая производство антибиотиков, секрецию аллелохимических веществ, индукцию устойчивости растений к патогенам, фиксацию азота или усиление поглощения питательных веществ растениями-хозяевами[2].

B. seminalis TC3.4.2R3 имеет гены, кодирующие признаки, потенциально участвующие во взаимодействиях растений и микробов. А именно: 1) B. seminalis TC3.4.2R3 продуцирует ИУК и имеет гены ферментов биосинтеза ИУК. Burkholderia spp. 2) имеет ген ACC-дезаминазы, которая снижает уровень этилена, что индуцирует рост растения. 3) B. seminalis TC3.4.2R3 имеет полные консервативные кластеры для сидерофоров пиохелина и орнибактина, позволяющие эффективнее поглощать железо. 4) Геном также кодирует 21 предполагаемый TonB-зависимый рецептор внешней мембраны, класс белков, которые функционируют при поглощении ресурсов из окружающей среды[3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Данные по геному исследуемой бактерии были взяты с сайта Национального Центра Биотехнологической информации (NCBI). Для расчета нуклеотидного состава использовался язык программирования Python 3.9 и сервис Google colaboratory. Для расчета параметра GC-skew использовался сервис Webskew. Чтобы рассчитать GC-skew для каждой из хромосом использовался скрипт seqret из пакета EMBOSS на сервере kodomo ФББ МГУ, который разбивает файл генома на файлы с отдельными последовательностями. Для анализа данных использовались электронные таблицы Google Sheets.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Данные о геноме бактерии Burkholderia seminalis strain FL-5-4-10-S1-D7

Геном Burkholderia seminalis представлен тремя хромосомами. Информация о длине хромосом в п.н. бралась из assembly stats Burkholderia seminalis из базы данных NCBI (1). Как видно из данных, наименьшую длину имеет третья хромосома (1 093 546 п.н.). Общая длина генома бактерии составляет 7 648 944 п.н. Всего в геноме 6969 генов (включая белок-некодирующие последовательности)

Таблица 1. Данные о длине хромосом

ДНК	Длина (п.н.)
Хромосома 1	3 505 262
Хромосома 2	3 050 136
Хромосома 3	1 093 546

Для каждой из хромосом определен процентное содержание GC нуклеотидов (gc-perc), который рассчитывается по формуле (количество-GC-нуклеотидов) / (количество-ATCG-нуклеотидов) представленное в процентах. Расчет производился при помощи кода, написанного на Python (2).

Как видно по таблице, отличие в процентом содержании GC-нуклеотидов у второй хромосомы незначительно, и в среднем по всему геному gc-perc равен 67%.

Таблица 2. Процентное содержание GC-нуклеотидов

ДНК	Содержание GC-нуклеотидов (%)
Хромосома 1	67
Хромосома 2	68
Хромосома 3	67
Общее по геному	67

Высокое содержание GC-пар обеспечивает поддержание стабильности структуры ДНК при высоких температурах или других экстремальных для клетки условиях.

2. Гистограмма длин белков

Была составлена гистограмма длин белков Burkholderia seminalis. Судя по полученным данным, наиболее часто встречающаяся длина белкового продукта находится в диапазоне 100-400 а.к. Длину менее 60 а.к. имеет очень маленькое количество белков, и после значения длины,

равного 30, происходит резкий скачок. Можно выделить небольшой провал в диапазоне 120-210 с локальным минимумом в значении 180. Максимальная длина белкового продукта составляет 4503 а.к. Минимальная - 29 а.к. (4, лист Histogram)

Fig. 1. Гистограмма для длин белковых продуктов кодирующих последовательностей.

3. Распределение генов белков между прямой и комплементарной цепями

Исходя из полученных данных (3, лист protein strain), в среднем по геному на прямой и комплементарной цепочке закодировано примерно равное количество белков.

Fig. 2. Распределение белок-кодирующих генов между прямой и комплементарной цепочкой (+ and - strain).

4. Оценка случайности распределения генов по цепям ДНК

Для оценки случайности распределения генов на прямой и комплементарной цепи для каждой из хромосом мной был рассчитан статистический критерий Пирсона (хи-квадрат). Используемый уровень значимости - 0.05. Поставим нулевую гипотезу о случайном распределении генов между цепями. Предельный уровень значимости при наличии одной степени свободы равен 3,84. Более подробно данные представлены в сопроводительных

материалах (3, лист хи-квадрат). Как мы видим, для третьей хромосомы гены распределены случайно (Таблица 7), так как значение критерия хи-квадрат меньше порогового. Для первой и второй хромосомы наблюдаются отклонения от случайного распределения (Таблица 5, Таблица 6).

Таблица 5. Расчет критерия Пирсона для Хромосомы 1

Хромосома 1	Количество генов (Ожидаемое)	Количество генов (Наблюдаемое)	Хи квадрат
Прямая цепь	3244	3402	
Обратная цепь	3244	3086	
			15,39087546

Таблица 6. Расчет критерия Пирсона для Хромосомы 2

Хромосома 2	Количество генов (Ожидаемое)	Количество генов (Наблюдаемое)	Хи квадрат
Прямая цепь	2750	2642	
Обратная цепь	2750	2858	
			8,482909091

Таблица 7. Расчет критерия Пирсона для Хромосомы 3

Хромосома 3	Количество генов (Ожидаемое)	Количество генов (Наблюдаемое)	Хи квадрат
Прямая цепь	975	934	
Обратная цепь	975	1016	
			3,448205128

5. Типы белков протеома

1) Всего в геноме белок кодируют 6802 гена, из них 61 кодирует рибосомальные белки, то есть на их долю приходится 0,897% всех белок-кодирующих генов. Полный список белков с наименованиями содержится в сопроводительных материалах. (3, лист ribosomal_proteins)

2) Довольно значительная часть генов кодирует белки, функция которых не определена и существование которых под сомнением. Всего таких белков 730. В процентом соотношении о всех белок-кодирующих генов они составляют 10,7%. Полный список неопределенных белков находится в листе “hypotetical_protein”. Среди таких белков есть некоторые, которые имеют размер от 300 до 700 а.к., на основании чего можно сделать вывод о том, что значительная функциональная часть протеома исследуемой бактерии остается неисследованной. (3, лист hypothetical_protein)

3) Генов, кодирующих транспортные белки 804. В процентах они составляют 11,8% от всех белок-кодирующих последовательностей. (3, лист transport_protein)

6. Статистические данные о генах РНК

В протеоме Burkholderia seminalis представлено 89 генов, кодирующих РНК, включая различные ее типы: rRNA, tRNA, ncRNA, tmRNA. От всех генов это составляет 1,28%. Это заметно меньше, чем количество белок-кодирующих генов. Соотношение РНК-кодирующих генов к белок-кодирующих равно 0,013, что соотносится примерно как 1 к 75. (3, лист RNA_total)

Число генов рибосомальной РНК (rRNA) составляет 19, в процентах от всех РНК это 21,4%. Мною был обнаружен интересный факт особенности распределения генов РНК между тремя хромосомами исследуемой бактерии. Вторая и третья хромосомы несут по одной копии каждой rRNA, входящей в состав прокариотической рибосомы (5S RNA, 16S RNA, 23S RNA). В это же время первая хромосома несет по 3 копии каждой из вышеперечисленных RNA. Соотношение количества генов rRNA на первой хромосоме и ее длины не пропорционально соотносится с аналогичными параметрами для второй хромосомы, так как при относительно небольшой разнице в длине (500 тыс. нуклеотидов), первая хромосома несет в 3 раза больше копий генов rRNA. (3, лист rRNA)

Число генов транспортной РНК (tRNA) составляет 67. Это 75% от всех генов РНК в геноме. Причем 90% всех генов tRNA располагается на первой хромосоме (для сравнения третья хромосома кодирует только 3% всех tRNA). (3, лист tRNA)

Наибольшее количество генов среди РНК-кодирующих принадлежит генам tRNA, которые необходимы для синтеза белка. (3, лист RNA_stat)

Таблица 3. Данные о РНК

РНК	Количество	Процент от всех РНК
рРНК	19	21 %
тРНК	67	75 %

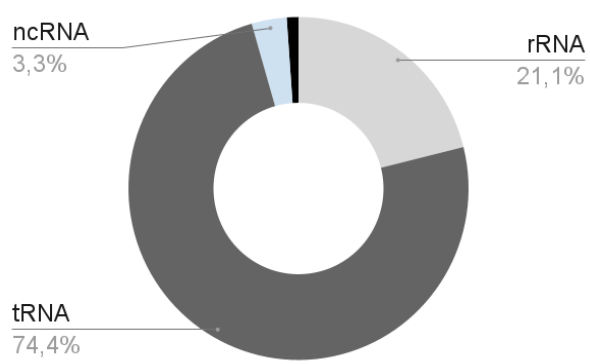


Fig. 3. Соотношение количества генов РНК в геноме.

7. Нуклеотидный состав геномной днк

С помощью программы на Python было посчитано количество нуклеотидов A, T, C, G для каждой из хромосом и генома (2). Соотношение нуклеотидов A и T, C и G согласуется с правилом Чаргаффа с погрешностью 0,32% для нуклеотидов G и C, что может быть связано с наличием модифицированных оснований в геноме.

8. Поиск участка начала (oriC) и терминации (ter) репликации

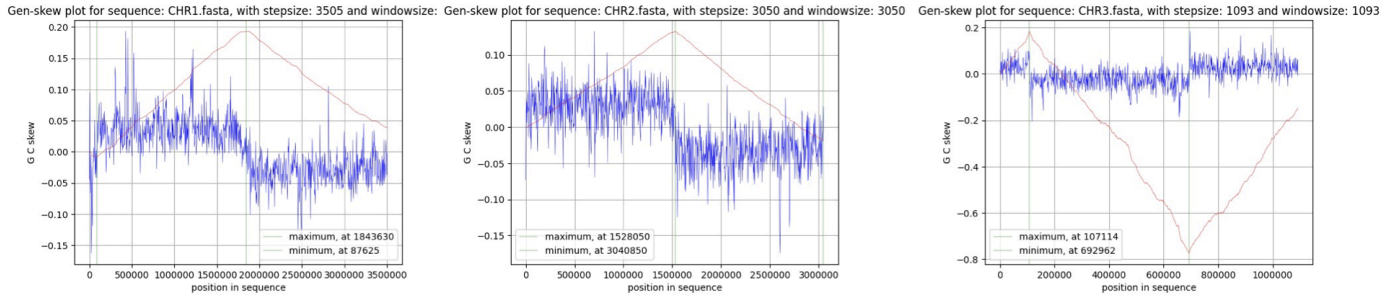
Был показан факт того, что с помощью вычисления соотношения между нуклеотидами G и C (так называемый GC-skew), можно определить место начала репликации (origin, далее - oriC) и ее конца (terminator, далее - ter). Место минимального значения GC-skew соответствует oriC, а максимального - ter. Действительно, ведь малая доля GC-пар в месте начала репликации значительно упрощает расплетение цепочки ДНК, что обеспечивает успешное формирование репликационных вилок. Высокий GC-состав в свою очередь будет способствовать терминации.

формула для вычисления GC-skew в определенном интервале:

$$GC\text{-}skew = (\#C - \#G)/(\#C + \#G)$$

где #C, #G - количество нуклеотидов C и G соответственно.

При расчете GC-skew на определенном участке интересующей нас последовательности получаются значения, которые затем взятием интеграла функции GC-skew образуют линию графика, минимум и максимум которого соответствуют расположению oriC и ter. Burkholderia seminalis имеет три хромосомы, поэтому поиск oriC и ter осуществлялся для каждой из них. Для расчёта GC-skew использовался сервис webskew (5).



Chromosome 1 Chromosome 2 Chromosome 3

Fig. 4. график параметра GC-skew для хромосом Burkholderia seminalis.

Таким образом, предполагаемое расположение oriC и ter для каждой хромосомы представлены в таблице 4.

Таблица 4. oriC и ter хромосом

Хромосома	Положение oriC (в окрестности нуклеотида)	Положение ter (в окрестности нуклеотида)
Хромосома 1	87 625	1 843 630
Хромосома 2	3 040 850	1 528 050
Хромосома 3	692 962	107 114

СОПРОВОДИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Данные NCBI по геному бактерии Burkholderia seminalis https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/001/718/535/GCF_001718535.1_ASM171853v/
2. Код на Python для вычисления количества нуклеотидов и содержания GC-нуклеотидов https://colab.research.google.com/drive/15hG2LABKM7hfMtZeDeJtOf6G94YdwtTV#scrollTo=QSo3kYLgu3dQ
3. Google таблица с исследованием https://docs.google.com/spreadsheets/d/1Ph2VqYGbyz4LUOxfEA631vTBg1ZhkiRI60ioHqRtXfM/edit?usp=sharing
4. Google таблица с гистограммой длин белковых продуктов https://docs.google.com/spreadsheets/d/1ToCCiWqTKR4F6HjoyOCHkqQffNrjUx_OFBItejuMKes/edit?usp=sharing
5. Сервис для расчета GC-skew https://genskew.csb.univie.ac.at/webskew

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] Elshafie, H.S.; Camele, I. An overview of metabolic activity, beneficial and pathogenic aspects of *Burkholderia* spp. *Metabolites* **2021**, *11*, 321.

[2] Hau-Hsuan Hwang, Pei-Ru Chien, Fan-Chen Huang, Shih-Hsun Hung, Chih-Horng Kuo, Wen-Ling Deng, En-Pei Isabel Chiang, Chieh-Chen Huang. A Plant Endophytic Bacterium, Burkholderia seminalis Strain 869T2, Promotes Plant Growth in Arabidopsis, Pak Choi, Chinese Amaranth, Lettuces, and Other Vegetables. *Microorganisms* **2021**, *9*(8), 1703.

[3] Welington L. Araújo, Allison L. Creason, Emy T. Mano, Aline A. Camargo-Neves, Sonia N. Minami, Jeff H. Chang and Joyce E. Loper. Genome Sequencing and Transposon Mutagenesis of Burkholderia seminalis TC3.4.2R3 IdentifyGenes Contributing to Suppression of Orchid Necrosis Caused byB. gladioli. Molecular Plant-Microbe Interactions **2016**, ISSN 0894-0282