



ارائه شده توسط:

سایت ترجمه فا

مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده

از نشریات معتبر

بینش هایی نسبت به سیستم CRISPR/Cas در گاردنلاواژینالیس

چکیده

زمینه: گاردنلاواژینالیس (*Gardnerella vaginalis*) به عنوان کلنی غالب کانال واژینال زنان با تشخیص واژینوز باکتریال یا BV شناسایی شده است. *G. vaginalis* می تواند از زنان سالم جداسازی بشود، و یک حالت بدون نشانه BV هم تشخیص داده شده است. رابطه *G. vaginalis* با انواع مختلف فنوتیپ های بالینی را می توان با انواع مختلف سیتوتوکسیته سوشها بنا به پیش فرض براساس محتوای ژن جداگانه توضیح داد. نقش انتقال ژن افقی در شکل گیری ژنوم *G. vaginalis* مورد تایید می باشد. محل CRISPR سیستم دفاعی میکروبی CRISPR/Cas یک دیدگاه تاریخی را درباره تماس پرویوکاریوتها با انواع عناصر ژنتیکی خارجی فراهم می سازد.

نتایج: جایگاه ژنی CRISPR/Cas با استفاده از داده های توالی موجود از سه ژنوم کامل *G. vaginalis* و 18 ژنوم پیش نویس *G. vaginalis* در پایگاه داده NCBI و نیز آمپلی کون های PCR ی DNA ژنومی 17 سویه بالینی آنالیز گردیدند. ژنهای cas در جایگاه CRISPR/Cas در *G. vaginalis* متعلق به زیرنوع E. coli بوده است. تقریباً 20٪ از spacer ها در پایگاه داده GenBank مطابقت داشتند. تجزیه و تحلیل توالی از آرایه های CRISPR نشان داد که تقریباً نیمی از فاصله ها با توالی های کروموزومی *G. Vaginalis* همسان بودند. اسپاررها که توالی کروموزومی *G. vaginalis* همسان بودند تعیین شدند که خود هدف نباشند و احتمالاً نه اجزای ژنهای مرتبط با عناصر متحرک و نه از پلاسمیدها / ویروس های مشتق شده بودند spacer . های اصلی هدف قرار داده شده توسط این spacer ها نشان دهنده موتیف های مجاور spacer های اصلی حفظ شده است.

نتیجه گیری ها: سیستم CRISPR / Caa در حدود نیمی از سوشهای آنالیز شده *G. vaginalis* را شناسایی کرده است. تجزیه و تحلیل ما روی توالی CRISPR یک ارتباط بالقوه را بین وجود آنها و بیماریزایی گونه های *G. vaginalis* نشان نمی دهد. بر اساس منشا فاصله اندازهای spacer موجود در آرایه های CRISPR ی *G. vaginalis* ، ما این فرضیه را ارائه می کنیم که انتقال ماده ژنتیکی بین سوشهای *G.*

vaginalis می تواند با مکانیزم CRISPR / Cas تنظیم شود. این مطالعه اولین تلاش برای تعیین و تجزیه و تحلیل جایگاه ژنی CRISPR باکتری جدا شده از کانال واژینال انسان است.

کلیدواژه ها: *Gardnerella vaginalis*، واژینوز باکتریال، CRISPR/cas، فاصله انداز spacer، تکرار،

PAM

زمینه

گاردنرلا واژینالیس، یک باکتری بی هوازی اختیاری از خانواده Bifidobacteriaceae است و قویا با واژینوز باکتریایی (BV) مرتبط است: یک بیماری با تخلیه واژینال بدبو می باشد. زنان مبتلا به BV در معرض خطر نتایج سلامتی ضعیف باروری و اکتساب برخی بیماری های منتقله جنسی هستند. BV بنا به تعریف تغییر گونه های میکروبی از لاکتوباسیل های تولیدکننده پراکسید هیدروژن گرفته تا باکتریهای بی هوازی مانند *G. vaginalis*، *Atopobium vaginae*، *Prevotella*، *Peptostreptococcus* و *Bacteroides spp* می باشند. استاندارد طلایی برای تشخیص آزمایشگاهی BV، رنگ آمیزی گرم است که برای تعیین غلظت نسبی لاکتوباسیل ها و باکتری مشخصه BV استفاده می شود. وضعیت BV بدون علامت نیز تشخیص داده شده است، هرچند رنگ آمیزی های گرم، کاهش لاکتوباسیل ها و افزایش فراوانی بی هوازی های مشخصه BV را آشکار کرده است. همان *G. vaginalis* که به عنوان ساکن غالب مجاری واژینال زنان مبتلا به BV بازیابی شده است در زنان BV منفی هم دیده می شود، هرچند در تعداد بسیار پایین تری می باشد. مسئله همسفرگی *G. vaginalis* هنوز معلوم نیست، زیرا جمعیت باکتری واژن دینامیک و در حال تغییر است و در طول چرخه قاعدگی تمایل به تغییر دارد تا غلبه موقتی *G. vaginalis* را در زنان سالم ایجاد کند. با استفاده از تکنیک های مستقل کشت، نشان داده شد که مجموعه فلور میکروبی واژینال ممکن است در میان جمعیت های انسانی متفاوت باشد: زنان سیاه پوست اسپانیایی و غیر اسپانیایی نسبت به زنان آسیایی و قفقازی دارای غیرهوازی های بیشتر معنی دار و لاکتوباسیل های کمتری می باشند. بنابراین، تعداد کم *Lactobacillus* لزوما نشان دهنده حالت BV نیست.

ارتباط *G. vaginalis* با فنوتیپ های مختلف بالینی می تواند با سیتوتوکسیته مختلف سویه ها توضیح داده شود، که احتمالاً براساس تفاوت های موجود در محتوای ژن آنها است. تا همین اواخر، با تعجب زیاد، اطلاعات اندکی از ژنتیک *G. vaginalis* در دست بود. در سال 2010، ژنومهای گونه های متعدد *G. vaginalis* از واژن بیماران مبتلا به BV و بیماران غیر BV مورد بررسی قرار گرفت، که اطلاعاتی در مورد باکتریوم ارائه کرده و امکان تجزیه و تحلیل ژنومی مقایسه ای را فراهم کردند. تلاشهایی نیز برای گسترش دانش تنوع ژنوتیپ و فنوتیپی سوش های *G. vaginalis* از نظر فاکتورهای بیماریزایی، به خصوص واژینولیسین، سیالیداز و پروتئین های تشکیل دهنده بیوفیلم انجام گرفته است. ابداع روش های تمایز ژنوتیپی *G. vaginalis* نشان داد که ژنوم ها دارای تغییرات و تنوع زیادی هستند. از اینرو، برخی روش های متداول، از جمله الکتروفورز ژل فیلد پالس، پلی مورفیسم طول فراگمنت محدودیت، تعیین نوع ریبوزومی کلاسیک با نقطه گذاری ساترن، و آنالیز انزیم محدودیت برای تعیین نوع این گونه ها قابل استفاده نیستند. روش تجزیه و تحلیل محدودیت DNA ی ریبوزومی تکثیر شده، در حالی برای تمایز کردن ژنوتیپی *G. vaginalis* قابلیت کاربرد دارد، به اندازه کافی برای مطالعات پاتوژنیک و اپیدمیولوژیک *G. vaginalis* تمیز دهنده نیست.

داده های اخیر از تجزیه و تحلیل ژنومی تطبیقی ژن *G. vaginalis* نشان می دهد که باکتری دارای ژنوم هسته ای کوچکی است که شامل 746 ژن است که تنها 27 درصد از پان ژنوم این گونه را تشکیل می دهد. تعداد کمی از ژن های منحصر به فرد در سوشهای انفرادی *G. vaginalis* و قابلیت انعطاف ژنومی در میان سوش ها نشان می دهد که انتقال ژن افقی (HGT) فعال است؛ اما نوترکیبی همولوگ تکراری در میان سوشهای *G. vaginalis* و نیز جذب DNA ی خارجی از سایر گونه ها وجود دارد.

تکرارهای پالیندرمیک کوتاه بین فاصله ای منظم خوشه بندی شده یا CRISPR ها و ژنهای cas مرتبط با آن، یک مکانیزم دفاع باکتریایی و اکثراً باکتریایی را علیه اسیدهای نوکلئیک خارجی تشکیل می دهد. اکثریت آرکه ها و تقریباً نیمی از ژنوم های باکتریایی حاوی جایگاه ژنی CRISPR هستند. جایگاه ژنی CRISPR شامل توالی های منحصر به فرد (Spacers) است که بین توالی های تکراری حفاظت شده کوتاهی قرار می گیرد. توالی spacer اغلب از نفوذ ویروس ها و پلاسمید های مهاجم ناشی می شود. مکانیزم دفاعی CRISPR / cas بر تداخل RNA تأثیر می گذارد که مانع از بروز عفونت باکتریوفاژ و کونژوگاسیون پلاسمید می شود و بنابراین

دو راه HGT را محدود می کند. تجزیه و تحلیل توالی CRISPR در بسیاری برنامه های کاربردی شامل تعیین ژنوتیپ سوش و مطالعه اپیدمیولوژیکی، تشخیص رویدادها و موانع تکاملی، بررسی تاریخچه تماس با ویروس و تغییرات جمعیت میزبان، با ارائه بینش هایی در مسیرهای غالب HGT استفاده شده است. در این تحقیق هدف تشخیص و تجزیه و تحلیل جایگاه ژنی CRISPR در ژنوم های 17 تا سوش *G. vaginalis* جدا شده از کانال واژینال زنان مبتلا به BV، و نیز در ژنوم 21 سوش *G. vaginalis* ذخیره شده در پایگاه داده ژنوم NCBI می باشد.

در مطالعه حاضر، منشا فاصله های CRISPR را که نمایانگر که حافظه ایمنولوژیک سوشهای *G. vaginalis* می باشد، مورد بررسی قرار دادیم و در مورد تاثیر CRISPR / Cas بر ظهور تغییرات ژنتیکی سوشهای *G. vaginalis* فرضیه هایی ارائه کردیم. همچنین، توزیع محدودی از جایگاه ژنی CRISPR را در بین سوش های *G. vaginalis* نشان دادیم.

ترجمه فا

روش اجرا
سوشهای *G. vaginalis*

در این مطالعه 17 سوش *G. vaginalis* جدا شده از نمونه های بالینی بدست آمده از کانال واژینال زنان مبتلا به BV مورد استفاده قرار گرفت. جدایه ها قبلا تعیین ژنوتیپ / بیوتیپ شد و با توجه به عوامل بیماریزای اصلی شناخته شده، یعنی واژینولیسین و سیلیداز تعیین مشخصات گردید.

سه ژنوم *G. vaginalis* کاملا تعیین توالی شده (ATCC14019, CP002104.1; 409-05, CP001849.1; HMP9231, CP002725.1) و 18 ژنوم پیش نویس *G. vaginalis* از پایگاه داده ژنوم NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/1967>) بازبازی گردیدند. شماره دسترسی ژنوم های پیش نویس در فایل اضافی شماره 1 آمده است.

تکثیر CRISPR و تعیین توالی آن

پرایمرهای تکثیر CRISPR با مقایسه ژنومی نواحی flanking CRANIS در سوشهای ATCC 14019, AMD, 409-05, 41V, 101, 315A *G. vaginalis* طراحی شده است. سه مجموعه متفاوت از پرایمرها؛ Cas-1-1fw, Cas-3-1fw, CR-1rev, CR-2rev و CR-3rev؛ برای تکثیر مناطق

CRISPR (فایل اضافی 2) مورد استفاده قرار گرفتند. PCR در یک مخلوط واکنش 50 میکرولیتری حاوی 0.2 میکرومول از هر پرایمر، 20 نانوگرم DNA ژنومی و 1.5 واحد مخلوط انزیمی بلند PCR (شرکت Thermo Scientific Fermentas، شهر Vilnius لیتوانی) انجام شد. مخلوط واکنش در معرض 28 سیکل دناتوراسیون به مدت 30 ثانیه در دمای 94 درجه سانتیگراد، حرارت دهی پرایمر در دمای 50 درجه سانتیگراد به مدت 40 ثانیه و امتداددهی به مدت 3 دقیقه در دمای 72 درجه سانتیگراد قرار گرفت. مرحله امتداددهی آخر تا 10 دقیقه طول کشید. محصولات PCR با استفاده از کیت استخراج GeneJet Gel (شرکت ThermoScientific Fermentas) طبق دستورالعمل کارخانه تخلیص شدند. قطعات DNA کلون شده در معرض تعیین توالی با استفاده از آنالیزر ژنتیکی ABI 3130XL قرار گرفتند. پیاده روی تعیین توالی با استفاده از پرایمرهای داخلی ساخته شده در توالی spacer برای تکمیل تعیین توالی بخش های PCR مورد بررسی قرار گرفت.

برای تکثیر آرایه های CRISPR سوش های GV28 و GV33، یک روش اندکی اصلاح شده خزش Spacer بکار گرفته شد. پرایمرها cas2 و توالی تکراری درون جایگاه ژنی CRISPR را هدف قرار دادند. محصول PCR حاصل نشان دهنده یک نردبان است که شامل تعدادی قطعات با طول های افزایشی است: هر قطعه طبق طول یک Spacer و یک تکرار متفاوت است. مخلوطی از قطعات به داخل حامل pJET1.2 (Thermo Scientific Fermentas) کلون شد؛ پلاسمید های نو ترکیب حاوی طولانی ترین درج های DNA انتخاب شدند و سپس تعیین توالی شدند. دور بعدی تکثیر از پرایمر تولید شده از توالی spacer بیشتر و پرایمر های واقع در مناطق جانبی پایین تر توالی CRISPR استفاده کردند (فایل اضافی 2). Contig های نتیجه شده به یک منطقه با همپوشانی حداقل متشکل از سه Spacer اضافه شدند.

تکثیر و تعیین توالی ژنهای cas

حضور ژنهای cas با تکثیر مناطق حاوی (cas5-cas6-cas1-cas2 (~ 3.6 kbp، cas3-cse1 (~ 3 kbp)

(cse2-cas5 (~ 2.7 kbp، cas5 (~ 0.88 kbp و cse2 (~ 0.6) تایید گردید. پرایمرهای مورد استفاده

در PCR در فایل اضافی 2 ارائه شده است. رژیم PCR حاوی 28 دوره دناتوراسیون در دمای 94 درجه

سانتیگراد برای 30 ثانیه، حرارت دهی پرایمر در دمای 58 درجه سانتیگراد به مدت 30 ثانیه و امتداددهی در دمای 72 درجه سانتیگراد به مدت 1 دقیقه/کیلوبایت PCR هدف بوده است. مرحله امتداددهی نهایی تا 10 دقیقه طول کشید. قطعات DNA کلونسازی شده حاوی cas5 و cas2 تعیین توالی شدند.

آنالیز توالی CRISPR

اطلاعات CRISPR برای سه ژنوم *G. vaginalis* (کدهای ATCC14019, 409-05, HMP9231) از پایگاه داده های CRISPR بازیابی گردید. CRISPRs Finder برای شناسایی توالی های تکرار و فاصله استفاده شده است. شناسایی ژنهای cas نیز با استفاده از NCBI BLAST انجام شد (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). هر قطعه CRISPR و اطلاعات cas که از پایگاه داده بازیابی شده بود، به صورت دستی اصلاح شد. جستجو برای شباهت های بین هر Spacer ها و توالی هایی که در GenBank ذخیره شده بودند، با استفاده از BLASTn ی NCBI انجام شد و مجموعه جستجو محدود به باکتریها (taxid: 2) یا ویروسها (taxid: 10239) شد. تمام تطابقات با امتیازی اندکی بالای 40 مربوط به هویت 100٪ بیش از حداقل 20 bp بعنوان نتایج مجاز مورد بررسی قرار گرفتند. تنها نتیجه های اولویت بالا مورد توجه قرار گرفت. تطابق با توالی هایی که در جایگاه ژنی CRISPR ی *G. vaginalis* یافت شدند، حذف شدند. Spacerها با استفاده از برنامه MAFFT با یکدیگر مقایسه شدند. Spacerهای CRISPR تا سه عدم انطباق که 100٪ همپوشانی بین توالی ها داشتند به صورت یکسان در نظر گرفته شدند. توالیهای مورد توافق تکرار CRISPR و alignment مناطق protospacer توسط WebLogo ایجاد گردید.

نتایج

معماری جایگاه ژنی CRISPR/Cas در سوشهای *G. vaginalis*

دو تا از سه ژنوم *G. vaginalis* با تعیین توالی کامل، 12 تا از 18 ژنوم پیش نویس در بانک GenBank و 6 تا ژن از 17 جدایه بالینی *G. vaginalis* دارای خوشه ژن cas و یک جایگاه ژنی CRISPR بودند. توالی های متشکل از تکرارها و spacers در مجاورت ژن های cas توالی CRISPR در نظر گرفته شد. جایگاه ژنی CRISPR/Cas در اکثر سوشها بین ژن هسته clpC اصلی و ژن کدگذاری کننده tRNA(Gly) قرار گرفته است (شکل 1).

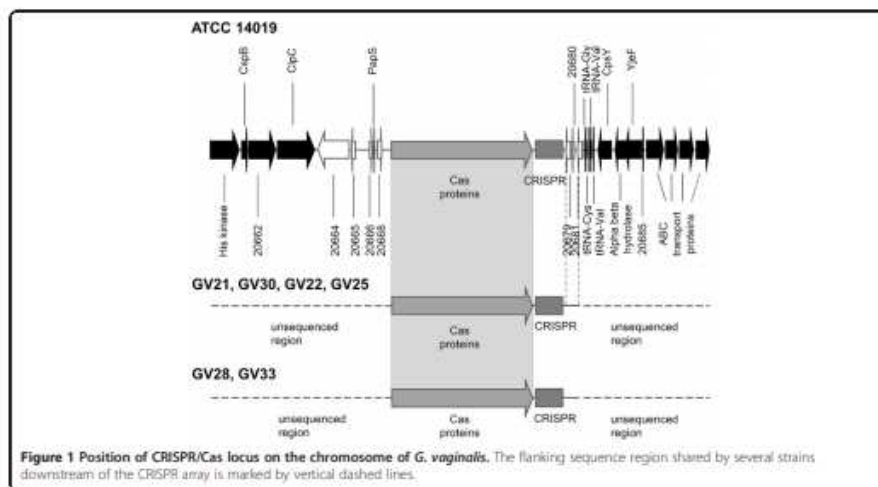
منطقه بین انتهای 3' ژنهای *clpC* و *cas* دارای ORF های کدگذاری کننده پروتئین های فرضیه ای بود و بسته به نوع سوش طول متغیری داشتند (تقریباً 5-19 kbp). ناحیه بین انتهای 3' آرایه CRISPR و ژن کدگذاری کننده *tRNA(Cys)* در میان سوش های

G. vaginalis حفظ نشده است و طول متغیر (0.4-1.8 kbp) بسته به سوشهای مختلف دارد. جایگاه ژنی CRISPR / Cas از سوشهای 409-05 و 00703B و 00703C2 دارای توالی های flanking مختلفی در اطراف خود بودند. قابل توجه اینکه، منطقه پایین دست آرایه های CRISPR که در سویه های بالینی GV21, GV25, GV22, GV30 یافت شدند مطابقتی با آنی که در ژنوم سوش ATCC14019 یافت شده است، دارد. درحالیکه توالی های flanking ی CRISPR سمت راست که در سوشهای GV28 و GV33 یافت گردیدند، هیچ شباهتی را به توالی های شناسایی شده پایین دست CRISPR های *G. vaginalis* نشان نداده است. به دلیل تنوع توالی های Flanking پایین دست جایگاه ژنی CRISPR و آمپلی کون طولی CRISPR، سوشهای GV28, GV30 حاوی ژنهای *cas* بودند ولی محصولات PCR را تولید نکردند. توالی های CRISPR در آن دو سوش با استفاده از شیوه خزش Spacer که در بخش روش اجرا توضیح داده شد، شناسایی گردید. توالی های نواحی CRISPR تکثیر شده شش سوش *G. vaginalis* که در این مطالعه آنالیز گردیده است، در پایگاه GenBank تحت شماره دستیابی JX215337-JX215342 ذخیره شده است. جایگاه ژنی *cas* از باکتری *G. vaginalis* شامل ژنهای *cas* یعنی *cas3-cse1-cse2-cse4-cas5-cas6e-cas1-cas2* می باشد. خوشه ژن شناسایی شده متعلق به تیپ 1، زیرتیپ I-E، تحت عنوان *Ecoli* می باشد. جایگاه های ژنی CRISPR در جریان پایینی *cas2* قرار داشتند و حاوی یک تا 50 توالی spacer بودند. تکثیر مناطق حاوی ژنهای *cas* مختلف برای حذف PCR های منفی کاذب برای توالی های CRISPR انجام گرفته است. محصولات PCR شامل مجموعه های مختلف ژنهای *cas*

(*cas5-cas6e-cas1-cas2, cas3-cse1, cse2-cas5, cas5, and cas2*) از سویه های بالینی شناسایی شده به شکل PCR مثبت برای توالی های CRISPR بدست آمدند. توالی های *cas2* و *cas5* در معرض تعیین توالی قرار گرفتند، و توالی های آنها در GenBank تحت شماره دسترسی JX215343-JX215345 ذخیره سازی گردید.

مشخصات توالی های تکرار و CRISPR spacer

توالی تکرار یافت شده در جایگاه ژنی CRISPR در 20 سوش *G. vaginalis* شامل 28 bp (شکل 2A) می باشد، درحالیکه spacer در جایگاه از لحاظ اندازه متغیر است و از 33 الی 34 bp کشیده شده است.



متغیرترین موقعیت های نوکلئوتیدی در انتهای پروکسیمال تکرار CRISPR یافت گردید (شکل 2A). توالی تکراری CRISPR تا اندازه ای جناس قلب دارد و تشکیل یک ساختار ثانویه فرضی RNA را با $\Delta G < -10 \text{ kcal/mol}$ می دهد (شکل 2B).

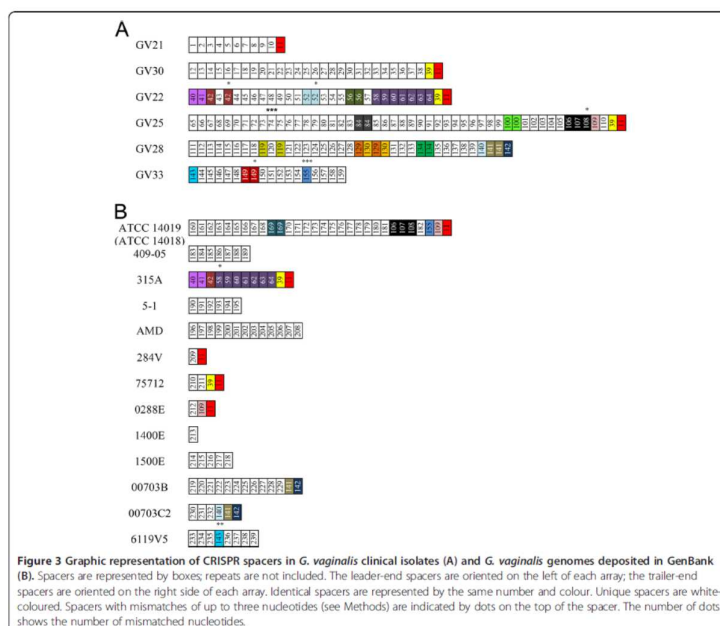
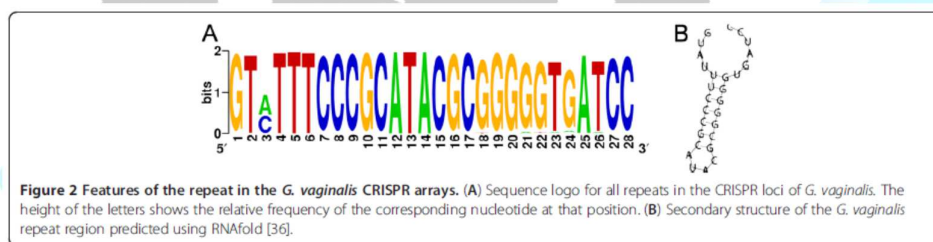
آرایه های CRISPR که در *G. vaginalis* یافت شده است از لحاظ طول و محتوای spacer متغیر بوده است: طولانی ترین محل ژن CRISPR حاوی 40 spacer منحصر به فرد (40/50) می باشد و در spacer بالینی GV25 شناسایی گردید، درحالیکه تنها یک spacer در مجاورت با ژنهای cas در سوش 1400E یافت شده است. بین شش سویه بالینی *G. vaginalis*، حدود 175 spacer شناسایی گردیدند. در میان آنها 129 spacer منحصر به فرد شناسایی گردید (شکل 3). چهارده ژنوم *G. vaginalis* که در GenBank ذخیره شده بود، حاوی 81 spacer منحصر به فرد از 110 توالی spacer بود که آنالیز گردیدند (شکل 3). تعداد کل 285 spacer در ژنهای cas در میان 20 سوش *G. vaginalis* حاوی جایگاه ژنی CRISPR/Cas شناسایی شدند (شکل 3).

spacer های انتهایی trailer در جایگاه ژنی CRISPR یعنی قدیمی ترین spacer ها دورترین محل را از توالی های پیشرو یافته اند، که نشان دهنده چندین نوع محافظت می باشد: نه تا سوش از *G. vaginalis* یک

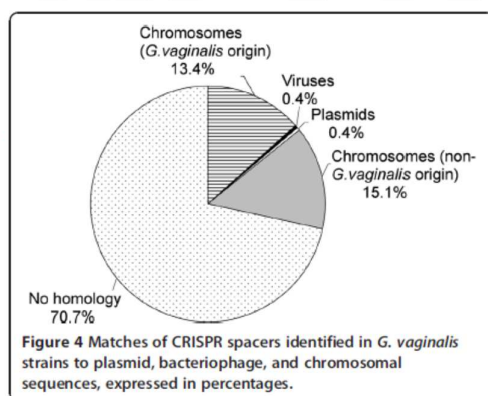
spacer، پنج سوش (در میان آنها سه سویه بالینی GV22 و GV25 و GV30) دو spacer را به اشتراک دارد، در صورتیکه سه سوش (GV28, 00703B, 00703C2) حاوی حفاظت توالی spacer مجزایی در انتهای Trailer می باشند (شکل 3). همه توالی های spacer که درون جایگاه ژنی CRISPR در *G. vaginalis* سوش 315A شناسایی شده اند، دارای یک نسخه در انتهای Trailer سویه بالینی GV22 بودند (شکل 3).

آنالیز توالی های CRISPR spacer

همه 210 توالی های spacer منحصر به فرد طبق توالی های فاز، پلاسمید و باکتریایی منفجر گردیدند. گفته شده است که صددرصد هویت میان توالی های spacer و spacer های اصلی برای فراهم سازی مصونیت با واسطه CRISPR لازم می باشد. درحالیکه تحمل برای عدم تطابق همچنان کاملاً روشن سازی نشده است. بنابراین یک جستجو برای spacer های اولیه انجام گردید که یک معیار هویت با شدت کمتری را با تعیین یک حدآستانه توضیح داده شده در بخش روش اجرا بررسی کرده است.



تعداد کل 70.7% spacer ها هیچ تطابقی با پایگاه داده های GenBank نداشت (شکل 4). به طور کلی، در میان 70 spacer با تطابق هایی با حدآستانه انتخابی، یک توالی تشابهی را با یک توالی ویروسی نشان داد، یک توالی با یک توالی پلاسمید تطابق یافت، و 68 توالی (97 درصد) تشابهی را با توالی های کروموزومی نشان داد (شکل 4، فایل اضافی شماره 3). در میان spacer های CRISPR که با توالی های کروموزومی با مبدا غیر G. vaginalis تطابق داشتند، پنج تا از 77 spacer مشابه با توالی های ناشی از باکتریهای مرتبط با انسان از جمله *Haemophilus influenzae*, *Weeksella virosa*, *Campylobacter jejuni* و *Bacillus cereus* (فایل اضافی 3B) بودند. تقریباً نیمی از spacer ها (32 تا از 77 تا) مشابه با توالی های کروموزومی *G. vaginalis* از جمله 10 spacer بود که صددرصد هویت را به اشتراک داشت (یعنی 33 تا از 33 نوکلئوتیدها، فایل اضافی 3A). همه این spacer ها، که تقریباً به طور یکنواختی در کل آرایه های CRISPR توزیع شده اند، توالی های منحصر به فردی به جز spacer شماره 106 می باشند که در انتهای CRISPR سوش ATCC14019 و ATCC 14018 و GV25 قرار گرفته اند.



28 spacer دارای تطابق برجسته نوکلئوتیدی با مناطق کروموزومی *G. vaginalis* (85 تا 100% هویت) بودند، به جز سه spacer در آرایه CRISPR از سوش 00703B و یک spacer که در سوش GV22 یافت شد که تا 77% هویت (فایل اضافی 3A) را نشان می دهد. چندین spacer هویت مشترک با توالی هایی که حاوی منبع منشاء فاژ هستند نشان می دهند. تجزیه و تحلیل ژنومهای *G. vaginalis* بیانگر وجود چهار تا هفت ژن مرتبط با فاژ بود، هرچند اکثرشان در یک سویه وجود داشت و در سویه های دیگر وجود نداشت. ما

قادر به تعیین این امر نبودیم که آیا سویه های بالینی حاوی توالی های منشاء فاژ هدف گیری شده spacer ها بودند یا خیر، زیرا توالی های ژنوم کامل هنوز در دسترس نیست.

اکثریت spacer ای که با توالی ها متناظر شده بودند، با عناصر متحرک مرتبط نبودند (فایل اضافی 3A). spacer های اصلی روی هر دو رشته کروموزومی *G. vaginalis* واقع شده است، و مناطق کدگذاری کننده و غیر کدگذاری کننده را در بر می گیرند. تعداد قابل توجهی از spacer ها که spacer های اصلی را هدف قرار داده اند، به صورت متوالی در آرایه های CRISPR توزیع شده اند. تقریباً 60 درصد از spacer های CRISPR که spacer های اصلی را هدف قرار داده اند، روی کروموزوم سوش شماره 05-409 از *G. vaginalis* (فایل 3A اضافی) قرار گرفته اند. همچنین، spacer های مختلف از آرایه های CRISPR از سویه های مختلف یک منطقه از کروموزوم را هدف قرار داده اند. یعنی spacer های آرایه های CRISPR از سوش GV22 (یک spacer)، GV25 (یک spacer)، GV28 (یک spacer)، و GV30 (پنج spacer) را در یک ناحیه کوچک به اندازه 1.1kpb خوشه بندی کرده است و با همان منطقه غیر کدگذاری کننده روی کروموزوم سوش 05-409 مطابقت دارد (فایل اضافی 3). ما spacer ها را در آرایه CRISPR از سوش 05-409 تعیین هویت نکردیم که دارای همولوژی مشترک با مناطق DNA ی کروموزوم *G. vaginalis* بوده اند. چندین spacer (شماره 100 و 163) که از سوشهای مختلف نشأت گرفته بودند ژن کدگذاری کننده ان-استیل مورامویل-ال-آلانین آمیداز را هدف گرفتند. ما پنج ژنوم *G. vaginalis* موجود در پایگاه داده ژنوم NCBI را که دارای spacer های هدف قرار دهنده مناطق کدگذاری کننده و مناطق غیر کدگذاری کننده در کروموزوم های سوش 05-409، 41V، 315A، 6420B، ATCC14019 و AMD بوده اند بررسی کردیم. ما یک تطابق بین spacer ها و توالی های ژنومی درونزاد نیافتیم، مگر توالی هایی که در آرایه های CRISPR قرار داشتند.

همچنین ما تجزیه و تحلیل کردیم که آیا spacer های اصلی واقع در کروموزوم *G. vaginalis* نشان دهنده توالی spacer های اصلی مجاور توالی های موتیف (PAM) محافظت شده می باشد یا خیر. ما spacer های اصلی را با مناطق همسایه حاوی 20 bp در هر دو طرف همتراز کردیم. همترازی برای ده spacer اصلی که 100٪ هویت را با spacer ها به اشتراک داشتند، اجرا گردید. موتیف نگهداری شده از دو نوکلئوتید (AA) که

بلافاصله در قسمت بالادست منطقه هدف واقع شده است شناسایی گردید (شکل 5). امضای AA ی PAM برای نه spacer اصلی تا 10٪ عدم انطباق واقع در منطقه دور از انتهای 5' و 3' spacer ها مورد تایید قرار گرفت. با اینحساب، موتیف ها در مجاورت spacer های اصلی واقع در DNA ژنومی *G. vaginalis* دارای امضاهای PAM هستند. جهت گیری PAM در *G. vaginalis* شامل 50-AA-protospacer-30 است که با جهت گیری PAM شناسایی شده در *E. coli* به عنوان CRISPR/Cas مطابقت دارد. هر دو باکتری متعلق به یک نوع هستند. در میان تمام آرایه های CRISPR در *G. vaginalis* اولین نوکلئوتید از 97.5% spacer ها یا C یا T بودند. فقط شش spacer شروع شده با A یا G (یعنی 2.5%) وجود داشتند. همه spacer ها که spacer های اصلی را روی کروموزوم *G. vaginalis* هدف قرار داده اند، با C یا T شروع شدند (18:13).

بحث

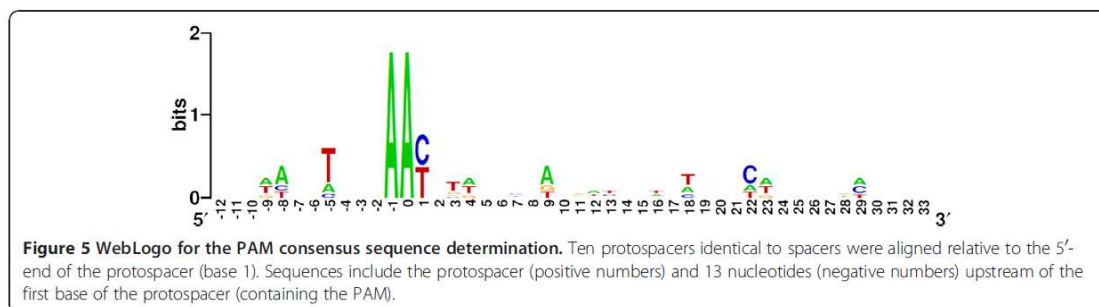
جایگاه ژنی CRISPR از سیستم دفاعی CRISPR/CAS تازه کشف شده در پروکاریوت ها در برابر ویروس ها و پلاسمید های مهاجم محافظت انجام می دهد و نقشه ی حافظه ایمونولوژیکی میکروارگانیسم است. توالی های spacer که در جایگاه ژنی CRISPR گنجانده شده، دیدگاهی تاریخی را در مورد تماس باکتری ها با انواع عناصر ژنتیکی خارجی ارائه می دهد. گزارش اخیر در مورد توانایی CRISPR/Cas برای جلوگیری از تغییرات طبیعی در *Streptococcus pneumoniae*، نقش CRISPR را در ایمنی مبتنی بر اسید نوکلئیک باکتریایی و تأثیری که CRISPR بر ظهور پاتوژن های باکتریایی دارد، افزایش داده است.

در مطالعه حاضر، ما آرایه های CRISPR را در 17 سویه بالینی *G. vaginalis* تازه مشخص شده و ژنوم 21 سوش *G. vaginalis* را در پایگاه داده ژنوم NCBI آنالیز کرده ایم. ما مشخصات spacer را بررسی کردیم و اثر احتمالی CRISPR/Cas را روی جذب ژنومی در *G. vaginalis* ارزیابی کرده ایم.

ما دریافتیم که 6 سویه بالینی (35٪) و 14 ژنوم *G. vaginalis* که در پایگاه داده NCBI (67 درصد) ذخیره شده اند، حاوی جایگاه ژنی CRISPR/Cas بودند. این جایگاه ژنی شامل ژن های Cas کامل و توالی های تکراری با spacer های بینابینی بوسیله تعداد متغیری از spacer ها هستند. توالی تکراری در آرایه CRISPR ی *G. vaginalis* با آنچه که در زیرنوع CAS-E ی *E. coli* یافت شده یکسان نبوده است. در آنالیز سیلیکو Silico از پروتئین های Cas مشخص گردید که توالی های به شدت محافظت شده (با بیش از 97 درصد

هویت) در میان سوش های *G. vaginalis* وجود دارند. پروتئین های Cas بالاترین تشابه (46 تا 63 درصد هویت) را با پروتئین های *A. vaginae* DSM15829 (زیرنوع Cas ی *Ecoli*) نشان می دهند. در عین حال، 9 تا 35 درصد هویت به پروتئین های Cas ازسوش *MG1655* ی *Ecoli* K12 امتیازبندی شده است، که به همان زیرنوع نسبت داده شده است. توالی پیشروی غنی از AT که بلافاصله در بالادست اولین CRISPR واقع است در ژنومهای همه سوشهای آنالیز شده *G. vaginalis* دیده شده است.

تجزیه و تحلیل گذشته نگر spacer نشان داد که فعالیت های جایگاه ژنی CRISPR/Cas بین سوشهای مختلف *G. vaginalis* متفاوت است. جایگاه ژنی CRISPR شناسایی شده در ژنوم سوش *GV25* از لحاظ درجه پلی مورفیسم spacer که توسط تعداد کل spacer های منحصر به فرد و نیز تعداد کل آرایش های spacer منحصر به فرد نشان داده شد، فعالترین حالت در نظر گرفته شده است. برعکس، محتوای spacer در آرایه CRISPR از سوش 315A می تواند نشان دهد که spacer های CRISPR ی تازه به دست آمده حذف شدند و قدیمی ترین spacer ها حفظ شده اند (شکل 3B). ممکن است فرض کنیم که فعالیت cas در ژنوم سوش 315A ی *G. vaginalis* حذف شده است.



در این مقاله، تجزیه و تحلیل جایگاه ژنی CRISPR نشان داد که اکثر spacer های CRISPR مشابه توالی های کروموزومی با منشا *G. vaginalis* و نیز غیر *G. vaginalis* می باشد. spacer با توالی های ویروسی و پلاسمید مطابقت می کند که منشأ احتمالی آنها را نشان می دهد، زیرا هیچ شواهدی از پلاسمید ها در معماری ژنومی *G. vaginalis* وجود ندارد و ویروس هایی که *G. vaginalis* را آلوده می کنند هنوز مشخص نشده اند. بخش قابل توجهی از spacer ها با توالیهای کروموزومی *G. vaginalis* مطابقت دارد. spacer ها اشتراک هویتی را با توالی های کدگذاری شده و کدگذاری نشده در کروموزوم *G. vaginalis* نشان داده اند. spacer ها خود هدفگذار نیستند و spacer های اصلی که روی کروموزوم قرار دارند، PAM ها را نمایش می دهند. این

مسئله که آیا C یا T اولین باز در spacer یا 29 امین باز تکراری در آرایه های CRISPR ی G. vaginalis است هنوز باقی است. در مطالعه ما همه spacer ها با هدف گیری spacer های اصلی در کروموزوم G. vaginalis با C یا T شروع می شوند. بنابراین spacer ها با AAT-PAM یا AAC-PAM مطابقت دارند، و فرض می شود که C/T از تکرار حاصل می شود. فرضیه های مرزهای تکرارهای CRISPR spacer/ها مستلزم آزمون آزمایشی است ولی ایده دوپلیکون duplicon جذاب به نظر می رسد.

تجزیه و تحلیل ژنوم G. vaginalis فرض را بر این می گذارد که توالی های کروموزومی که تحت هدفگذاری spacer ها قرار دارند از پلاسمید ها یا ویروس ها تولید نمی شود و ژن ها در مجاورت spacer های اصلی (تقریباً 5 کیلو بیت قسمت بالادست و 5 کیلو بیت قسمت پایین دست) منشا ویروسی ندارند. مشخص گردید که توالی های کدگذاری کننده ژن تحت هدف گیری سیستم CRISPR/Cas ی G. vaginalis شامل ژنهای مرتبط به عنصر متحرک مانند اصلاح محدودیت و سیستم های توکسین-آنتی توکسین یا ترانس پوزازها نیستند. دو spacer از سوش های مختلف، ژن کدگذاری کننده N-acetylmramoyl-L-alanine amidase را هدف قرار دادند که یک پروتئین دومین از خانواده CHAP است که مشخص گردید دارای توانایی لیزکنندگی است. چندین سوش دارای spacer های منطبق بر ژن کدگذاری کننده پروتئین 25 خانواده گلیکوزید هیدرولاز (GH) و مناطق غیر کدگذاری کننده در مجاورت نزدیک آن می باشند. خانواده GH 25 حاوی لیزوزیمی است که قادر به هیدرولیز پپتیدوگلیکان و دو پروتئین Abi است که مقاومت به دامنه وسیعی از باکتریوسین های مرتبط را ایجاد می کند. گفته می شود که این یافته ها در موافقت با داده هایی است که نشان می دهند سوش های G. vaginalis تولید موادی می کند که نسبت به سویه های باکتریایی معمول در مجموعه میکروبی واژینال حالت انتاگونیستی دارند. بخش اساسی spacer ها، مناطق غیر کدگذاری کننده یا پروتئین های فرضیه ای کدگذاری کننده ORF با عملکرد نامشخص را هدفگذاری می کنند.

داده های ما نشان می دهد که سیستم CRISPR/Cas در تماس با DNA ی G. vaginalis بوده است که به بیشترین احتمال منشا کروموزومی دارد و با ترانسفورماسیون، ترانسدوکاسیون، و یا مسیرهای کونژوگه قابل دسترسی است. اکتساب و تبادل DNA با ترانسفورماسیون طبیعی در میان سوشهای G. vaginalis به عنوان یک مسیر مطلوب شناسایی گردید. بعلاوه، مشخص گردید سوشهای G. vaginalis پروتئینهای ارتقای کیفیت

ComEA، ComEC و CinA را کدگذاری می کنند، [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi].
داده های ما در مورد منشاء spacer های شناسایی شده در آرایه های CRISPR ی *G. vaginalis* این فرضیه را مطرح می کنند که انتقال ماده ژنتیکی در میان سوشهای *G. vaginalis* می تواند توسط مکانیزم CRISPR/Cas تنظیم شود. شرایط مناسب برای انتقال DNA و فعالیت CRISPR به معنای حضور همزمان بیش از یک سوش *G. vaginalis* طی عفونت است که مطابق با گزارش های قبلی است. تأثیر CRISPR/Cas بر بیماریزایی *G. vaginalis* می تواند شامل هدفگذاری ژن 25 از خانواده GH توسط spacer باشد که محصول ارتقادهنده انحصار رقابتی توسط سوش 05-409 کدگذاری می کند [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi].

توزیع جایگاه ژنی CRISPR/Cas در میان باکتری های بیماریزا که ماده ژنتیکی جدید را همراه با ژن های بیماریزا اضافه می کند، از طریق ترانسفورماسیون طبیعی به حالت متغیر می باشد. وجود سیستم CRISPR/Cas در میان سوشهای *G. vaginalis* می تواند از روی زیستگاه باکتری تعیین بشود. شیوع کم ویروسها در آندومترיום انسان باعث تحریک به اکتساب CRISPR/Cas توسط *G. vaginalis* به عنوان یک سیستم ایمنی سازگار علیه DNA خارجی نمی شود.

TarjomeFa.Com

Table 1 G. vaginalis CRISPR spacers and known virulence features

Strain	Reference	Clinical status	Biotype	Sialidase A		Vaginolysin		CRISPR	
				Coding gene	Activity	Coding gene	Production level	Number of spacers	Number of unique spacers
ATCC 14019	[15]	BV	ND	+	ND	+	ND	30	24
ATCC 14018	[15]	BV	1	-	-	+	ND	30	24
409-05	[15]	Asymptomatic BV	ND	-	-	+	ND	7	7
HMP9231	CP002752.1	Not known	ND	+	ND	+	ND	-	-
101	[14]	BV	ND	+	ND	+	ND	-	-
41V	AEJE01000000.1	Healthy woman	ND	+	ND	+	ND	-	-
315A	AFDI01000000.1	Not known	ND	+	ND	+	ND	11	0
5-1	[14]	Healthy woman	ND	-	-	+	ND	6	6
AMD	[14]	BV	ND	-	-	+	ND	13	13
284V	[22]	Abnormal discharge & odor	1	+	ND	+	ND	2	1
75/12	[22]	BV	1	+	ND	+	ND	3	2
0288E	[22]	Abnormal discharge & odor	1	+	ND	+	ND	3	1
6420LIT	[22]	Healthy woman	2	-	-	+	ND	-	-
6420B	[22]	Healthy woman	2	-	-	+	ND	-	-
55152	[22]	Asymptomatic BV	3	+	ND	+	ND	-	-
1400E	[22]	Nugent score 9	4	+	ND	+	ND	1	1
1500E	[22]	Nugent score 7	5	+	ND	+	ND	5	5
00703Bmash	[22]	BV	2 or 5	+	ND	+	ND	13	11
00703C2mash	[22]	BV	2 or 5	+	ND	+	ND	6	3
00703Dmash	[22]	BV	3 or 7	+	ND	+	ND	-	-
6119V5	[22]	Nugent score 5	7	+	ND	+	ND	8	7
GV15	[18]	BV	5	+	S	+	Low	-	-
GV17	[18]	BV	5	+	S	+	Low	-	-
GV21	[18]	BV	1	+	W	+	Medium	11	10
GV22	[18]	BV	2	+	-	+	Low	30	13
GV23	[18]	BV	1	+	W	+	High	-	-
GV24	[18]	BV	1	+	-	+	Low	-	-
GV25	[18]	BV	1	+	W	+	Low	50	40
GV26	[18]	BV	1	+	-	+	Low	-	-
GV28	[18]	BV	5	+	S	+	High	37	25
GV29	[18]	BV	1	+	-	+	Low	-	-
GV30	[18]	BV	1	+	-	+	Low	29	27
GV31	[18]	BV	1	+	W	+	Medium	-	-
GV32	[18]	BV	1	+	-	+	Medium	-	-
GV33	[18]	BV	5	+	S	+	Low	18	14
GV34	[18]	BV	4	+	-	+	Low	-	-
GV35	[18]	BV	5	+	S	+	Low	-	-
GV36	[18]	BV	2	+	S	+	Medium	-	-

ND - not done.

با اینحال، واژن انسان محیط مناسب تری برای پیشرفت ویروس است و مخازن خارج واژن نیز بر توزیع ویروس ها در کانال واژینال تأثیر می گذارد. مقالات اخیر نشان دادند که باکتریهای بیماریزا ممکن است CRISPR/Cas را تحت فشار انتخابی خاص از دست بدهند. وجود مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی با از دست دادن جایگاه ژنی CRISPR/Cas در انتروکوکسی ها ارتباط دارد. ولی، ما یک همبستگی بین وجود جایگاه ژنی CRISPR/Cas و ژنهای مسئول مقاومت آنتی بیوتیکی/ضد میکروبی را در سوش های *G. vaginalis* پیدا نکرده ایم. در آنالیز سیلیکوی *Silico* ژنوم های *G. vaginalis* مشخص شد که سوش های 14018،

14019، 284 V، 315A، 1400E، 0288E و 00703B که همگی دارای CRISPR/Cas بودند؛ دارای ژن هایی بودند که ایجاد مقاومت به بلئومایسین و متی سیلین می کند؛ [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi] بعلاوه، سوش های 14018 و 14019 از *G. vaginalis* شامل یک ژن کدگذاری کننده یک آمینوگلیکوزید فسفوترانسفراز است که مقاومت به آمینوگلیکوزیدها را افزایش می دهد. فشار انتخابی برای بیماریزایی بجز مقاومت آنتی بیوتیکی نیز ممکن است اثری بر وجود جایگاه ژنی CRISPR/Cas داشته باشد. ولی در مطالعه ما، توزیع سیستمهای CRISPR/Cas در میان سوش های *G. vaginalis* با قابلیت بیماریزایی افزایش یافته که از بیماران BV جدا شده بود، متغیر بوده است (جدول 1). از اینرو نتایج ما رابطه احتمالی بین وجود جایگاه ژنی CRISPR و ویژگی های شناخته شده ی بیماریزایی سوشها را آشکار نکرده است (جدول 1). در کل، داده های ما نشان می دهد که تعیین نوع مبتنی بر CRISPR یک ابزار امیدوارکننده برای تمیز اپیدمیولوژیکی سوش های *G. vaginalis* نمی باشد. بعلاوه، DNA ژنومی *G. vaginalis* بقدری تغییرات زیادی را نشان داده است که احتمال ابداع یک تکنیک PCR معمول با استفاده از مجموعه پرایمرهای خاص برای تکثیر جایگاه های ژنی CRISPR شک برانگیز است.

این واقعیت که اکثریت سوش های *G. vaginalis* که تا کنون مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند، از بیماران BV نشانه دار و بدون نشانه جداسازی شده اند، در حالیکه تنها تعداد کمی از سوش ها از واژن زنان سالم به دست آمده است، می تواند انگیزه ای برای پیشروی جهت روشن سازی رابطه میان سوشهای همسفره *G. vaginalis* و جایگاه ژنی CRISPR/Cas باشد (جدول 1). یافته های اخیر در مورد نقش پروتئین های Cas در ایجاد ایمنی سازگار به باکتری ها می تواند انگیزه ای باشد برای آزمون تجربی فرضیه ها درباره نحوه اثرگذاری CRISPR/Cas بر تنظیم انتقال ماده ژنتیکی در میان سوشهای *G. vaginalis*.

این مطالعه اولین تلاش برای تعیین و آنالیز جایگاه ژنی CRISPR در باکتری های جداسازی شده از کانال واژینال انسان است. رابطه بین پروکاریوت ها و محیط آنها که در توالی spacer ی جایگاه های ژنی CRISPR ثبت می شود باعث روشن سازی تکامل ژنومی *G. vaginalis* می شود.

نتیجه گیری ها

سیستم CRISPR/Cas در ژنومهای حدود نیمی از سوشهای مورد بررسی *G. vaginalis* شناسایی شدند. ژنهای Cas در جایگاه ژنی CRISPR/Cas ی *G. vaginalis* متعلق به زیر نوع *E. coli* هستند. در مجموع تعداد Spacer 285 در مجاورت ژنهای cas در میان 20 سوش *G. vaginalis* حاوی جایگاه ژنی CRISPR/Cas شناسایی شدند. تقریباً 20٪ همه spacerها در آرایه های CRISPR در پایگاه داده GenBank دارای تطابق بودند. تجزیه و تحلیل توالی آرایه های CRISPR نشان داد که تقریباً نیمی از Spacerها با توالی های کروموزومی *G. vaginalis* مطابقت داشتند. Spacerهای دارای اشتراک هویت با این توالی های کروموزومی از نوع خودهدفگذار بودند و احتمالاً نه جز تشکیل دهنده ژن های مرتبط با عناصر متحرک بودند و نه از پلاسمید ها / ویروس ها منشأ یافته بودند. یافته های spacer با ژن های کروموزومی *G. vaginalis*، مناطق غیر کدگذاری کننده و یا پروتئین های فرضیه ای کدگذاری کننده ORF با عملکرد نامشخص متناظر بودند. protospacerهای موجود در کروموزوم *G. vaginalis* نشان دهنده PAM های محافظت شده می باشند. ما ارتباطی بین وجود جایگاه ژنی CRISPR و ویژگی های شناخته شده ی *G. vaginalis* پیدا نکردیم. بر اساس مبدا spacer های موجود در آرایه های CRISPR ی *G. vaginalis* ، ما این فرضیه را ارائه می کنیم که انتقال ماده ژنتیکی در میان سوشهای *G. vaginalis* می تواند با مکانیزم CRISPR/Cas تنظیم شود. یافته های ما می تواند بینش عمیقتری را در مورد ژنتیک *G. vaginalis* فراهم سازد و مطالعات بیشتری را در مورد نقش *G. vaginalis* در مجموعه فلور میکروبی میزبانش برانگیزد.

References

1. Carlin BW. *Gardnerella vaginalis*: characteristics, clinical considerations, and controversies. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5:213-237.
2. Menard JP, Mazouni C, Salem-Cherif I, Fenollar F, Raoult D, Boublil L, Gamme M, Bretelle F. High vaginal concentrations of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* in women undergoing preterm labor. *Obstet Gynecol* 2010; 115:134-140.
3. Ferhens K, Twin J, Fowkes FJ, Garland SM, Fehler G, Morton AM, Hocking JS, Tabrizi SN, Bradshaw CS. Bacterial vaginosis (BV) candidate bacteria: associations with BV and behavioural practices in sexually-experienced and inexperienced women. *PLoS One* 2012; 7:e30633.
4. Atashi J, Poole C, Ndiembe PM, Adimora AA, Smith JS. Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. *AIDS* 2008; 22:1493-1501.
5. Fredrickx DN, Fiedler TL, Thomas KK, Oakley BB, Marazzo JM. Targeted PCR of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 2007; 45:3270-3276.
6. Turovsky Y, Sutyak Noll K, Chikonda ML. The aetiology of bacterial vaginosis. *J Appl Microbiol* 2011; 110:1105-1128.
7. Workowski KA, Berman SM. Centers for disease control and prevention sexually transmitted disease treatment guidelines. *Clin Infect Dis* 2011; 53:559-563.
8. Leitch H, Kiss H. Asymptomatic bacterial vaginosis and intermediate flora as risk factors for adverse pregnancy outcome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007; 21:375-390.
9. Kim TK, Thomas SM, Ho M, Sharma S, Reich O, Frank JA, Yeater KM, Jiggs DR, Nkiamasa M, Stimpf R, Leigh SR, Tapping RI, Banik SR, Slauz JM, Gaskins HR, Weisbaum JS, Olsen GJ, Hoyer LL, Wilson BA. Heterogeneity of vaginal microbial communities within individuals. *J Clin Microbiol* 2009; 47:1181-1189.
10. Zazzaya-Hinchliffe M, Martin DH, Ferris MJ. Quantitative PCR assessments of bacterial species in women with and without bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 2010; 48:1812-1819.
11. Srinivasan S, Liu C, Mecheil CM, Fiedler TL, Thomas KK, Agnew KJ, Marazzo JM, Fredrickx DN. Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis. *PLoS One* 2010; 5:e10157.
12. Lamont RF, Sobel JD, Akins RA, Hassan SS, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP, Romero R. The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG* 2011; 118:533-549.
13. Foney LJ, Foster JA, Ledger W. The vaginal flora of healthy women is not always dominated by *Lactobacillus* species. *J Infect Dis* 2006; 194:1468-1469.
14. Herwich MD Jr, Alves JM, Buck GA, Strauss JF, Patterson JL, Oko AT, Gireid PH, Jefferson KK. Drawing the line between commensal and pathogenic *Gardnerella vaginalis* through genome analysis and virulence studies. *BMC Genomics* 2010; 11:2375.
15. Yeoman CI, Yildirim S, Thomas SM, Dunkin AS, Torralba M, Sutton G, Buhay CI, Ding Y, Duhan-Rocha SP, Murry DM, Qin X, Gibbs RA, Leigh SR, Stimpf R, White BA, Highlander SK, Nelson KE, Wilson BA. Comparative genomics of *Gardnerella vaginalis* strains reveals substantial differences in metabolic and virulence potential. *PLoS One* 2010; 5:e12411.
16. Patterson JL, Stull-Lane A, Gireid PH, Jefferson KK. Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of *Gardnerella vaginalis* relative to other bacterial vaginosis-associated anaerobes. *Microbiology* 2010; 156:392-399.
17. Santiago GL, Deschaght P, El Alla N, Klama TN, Verstraeten H, Jefferson KK, Temmerman M, Vaneechoutte M. *Gardnerella vaginalis* comprises three genotypes of which two produce sialidase. *Am J Obstet Gynecol* 2011; 204:650 e1-7.
18. Reckatyte M, Janulaitiene M, Lasickiene R, Zvirbaliene A. Genetic and biochemical diversity of *Gardnerella vaginalis* strains isolated from women with bacterial vaginosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012; 65:69-77.
19. Wu SR, Hiller SL, Nath K. Genomic DNA fingerprint analysis of biotype 1 *Gardnerella vaginalis* from patients with and without bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 1996; 34:192-195.
20. Ingjanni A, Petruzzelli S, Morandotti G, Pompei R. Genotypic differentiation of *Gardnerella vaginalis* by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997; 18:61-66.
21. Anouchcheva AA, Simoes JA, Behbakht K, Faro S. *Gardnerella vaginalis* isolated from patients with bacterial vaginosis and from patients with healthy vaginal ecosystems. *Clin Infect Dis* 2001; 33:1022-1027.
22. Ahmed A, Earl J, Retchless A, Hillier SL, Rabe LK, Chernes TL, Powell E, Jantto R, Eutsey R, Hillier NL, Boisy R, Dahlgren ME, Hall BC, Costerton AN, Post JC, Hu FZ, Ehrlich GD. Comparative genomic analyses of seventeen clinical isolates of *Gardnerella vaginalis* provides evidence of multiple genetically isolated clades consistent with sub-speciation into genovars. *J Bacteriol* 2012; 194:3922-3937.
23. Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. 2010; 327:167-170.
24. Grissu L, Vergnaud G, Prouzet C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinform* 2007; 8:172-182.
25. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 2007; 315:1709-1712.
26. Matruffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* 2008; 322:1843-1845.
27. Matruffini LA. Impact of CRISPR immunity on the emergence of bacterial pathogens. *Future Microbiol* 2012; 5:693-695.
28. Karginov IV, Hannon GJ. The CRISPR system: small RNA-guided defence in bacteria and archaea. *Mol Cell* 2010; 37:7-19.
29. Rezzonico F, Smits TH, Duffy B. Diversity, evolution, and functionality of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) regions in the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77:3819-3829.
30. Barrangou R, Horvath P. CRISPR: new horizons in phage resistance and strain identification. *Annu Rev Food Sci Technol* 2012; 3:143-162.
31. Bruggemann H, Lomholt HB, Tettelin H, Kilian M. CRISPR/Cas loci of type II *Propionibacterium acnes* confer immunity against acquisition of mobile elements present in type I *P. acnes*. *PLoS One* 2012; 7:e34171.
32. Rho M, Wu YW, Tang H, Doak TG, Ye Y. Diverse CRISPR evolving in human microbiomes. *PLoS Genet* 2012; 8:e1002441.
33. Katoh K, Asimenos G, Toh H. Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. *Methods Mol Biol* 2009; 537:39-64.
34. Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* 2004; 14:1188-1190.
35. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brava S, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Wolf YI, Yakunin AF, van der Oost J, Koonin EV. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9:467-477.
36. Holmacker I. Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:3429-3431.
37. Weinberger AD, Sun CL, Plucinski MM, Deneff VJ, Thomas BC, Horvath P, Barrangou R, Gilmore MS, Getz WM, Barfield JF. Persisting viral sequences shape microbial CRISPR-based immunity. *PLoS Comput Biol* 2012; 8:e1002475.
38. Horvath P, Romero DA, Côté-Morvoin AC, Richards M, Deveau H, Moineau S, Boyaval P, Fremaux C, Barrangou R. Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* 2008; 190:1401-1412.
39. Sapranavskas R, Gasunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Sikeny Y. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 2011; 39:9275-9282.
40. Semenov E, Jore MM, Datsenko KA, Semenov A, Westra ER, Wanner B, van der Oost J, Brava S, Severinov K. Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108:10098-10103.
41. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology* 2009; 155:733-740.
42. Swarts DC, Mosterd C, van Passel MW, Broca S. CRISPR interference directs strand specific acquisition. *PLoS One* 2012; 7:e35888.
43. Bikard D, Hantum-Aslan A, Mucka D, Matruffini LA. CRISPR interference can prevent natural transformation and virulence acquisition during *in vivo* bacterial infections. *Cell Host Microbe* 2012; 12:177-186.
44. Díez-Villaseñor C, Almendros C, García-Martínez J, Mojica FJ. Diversity of CRISPR loci in *Escherichia coli*. *Microbiology* 2010; 156:1351-1361.
45. Touchon M, Rocha EP. The small, slow and specialized CRISPR and anti-CRISPR of *Escherichia coli* and *Salmonella*. *PLoS One* 2010; 5:e11126.
46. Stern A, Keren L, Wurtzel O, Amital G, Sorek R. Self-targeting by CRISPR: gene regulation or autoimmunity. *Trends Genet* 2010; 26:335-340.

47. Goren MG, Yosef I, Auster O, Qimron U: Experimental definition of a clustered regularly interspaced short palindromic duplicon in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 2012, **423**:14–16.
48. Brodt A, Lurie-Weinberger MN, Gophna U: CRISPR loci reveal networks of gene exchange in archaea. *Biol Direct* 2011, **6**:65.
49. Bateman A, Rawlings ND: The CHAP domain: a large family of amidases including GSP amidase and peptidoglycan hydrolases. *Trends Biochem Sci* 2003, **28**:234–237.
50. Kjos M, Snipen L, Salehian Z, Nes IF, Diep DB: The Abi proteins and their involvement in bacteriocin self-immunity. *J Bacteriol* 2010, **192**:2068–2076.
51. Teixeira GS, Soares-Brandão KL, Branco KM, Sampaio JL, Nardi RM, Mendonça M, Almeida RB, Farias LM, Carvalho MA, Nicoli JR: Antagonism and synergism in *Gardnerella vaginalis* strains isolated from women with bacterial vaginosis. *J Med Microbiol* 2010, **59**:891–897.
52. Piot P, van Dyke E, Peeters M, Hale J, Totten PA, Holmes KK: Biotypes of *Gardnerella vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1984, **20**:667–679.
53. Vestergaard AL, Knudsen UB, Munk T, Rosbach H, Bialasiewicz S, Sloots TP, Martensen PM, Antonsson A: Low prevalence of DNA viruses in the human endometrium and endometriosis. *Arch Virol* 2010, **155**:693–703.
54. Marazzo JM, Fiedler TL, Srinivasan S, Thomas KK, Liu C, Ko D, Xie H, Saracino M, Fredricks DN: Extravaginal reservoirs of vaginal bacteria as risk factors for incident bacterial vaginosis. *J Infect Dis* 2012, **205**:1580–1588.
55. Palmer KL, Gilmore MS: Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas. *mBio* 2010, **1**:e00227-10.
56. Delaney NF, Balenger S, Bonneaud C, Marx CJ, Hill GE, Ferguson-Noel N, Tsai P, Rodrigo A, Edwards S: Ultrafast evolution and loss of CRISPRs following a host shift in a novel wildlife pathogen, *Mycoplasma gallisepticum*. *PLoS Genet* 2012, **8**:e1002511.
57. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V: Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Sci USA* 2012, **109**:E2579–E2586.



TarjomeFa.Com

برای خرید فرمت ورد این ترجمه، بدون واتر مارک، اینجا کلیک نمایید.

این مقاله، از سری مقالات ترجمه شده رایگان سایت ترجمه فا میباشد که با فرمت PDF در اختیار شما عزیزان قرار گرفته است. در صورت تمایل میتوانید با کلیک بر روی دکمه های زیر از سایر مقالات نیز استفاده نمایید:

لیست مقالات ترجمه شده ✓

لیست مقالات ترجمه شده رایگان ✓

لیست جدیدترین مقالات انگلیسی ISI ✓

سایت ترجمه فا ؛ مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده از نشریات معتبر خارجی