



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Πτυχιακή Εργασία
**Διερεύνηση του ρόλου των CRISPR/Cas
συστημάτων σε στελέχη *Escherichia coli***

Κικίδου Ελισσάβετ του Θεοδώρου



Λάρισα, 2023

Θέμα πτυχιακής εργασίας: «Διερεύνηση του ρόλου των CRISPR/Cas συστημάτων σε στελέχη *Escherichia coli*»

Κικίδου Ελισσάβετ

Diploma Thesis: «Investigation of the role of CRISPR / Cas systems in *Escherichia coli* strains»

Kikidou Elissavet

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Κωνσταντίνος Παπαγιαννίτης (επιβλέπων),
Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Μικροβιολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κωνσταντίνος Ματθιόπουλος (συνεπιβλέπων),
Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Ευθυμία Πετεινάκη, Καθηγήτρια Ιατρικής
Βιοπαθολογίας-Κλινικής Μικροβιολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	5
Περίληψη	6
Abstract.....	7
Εισαγωγή.....	8
Συστήματα CRISPR/Cas.....	8
Δομή και μηχανισμός λειτουργίας των συστημάτων CRISPR/Cas.	8
Ταξινόμηση συστημάτων CRISPR/Cas	10
<i>Escherichia coli</i>	11
Οριζόντια Μεταφορά Γονιδίων (HGT).....	15
Κινητά Γενετικά Στοιχεία (MGEs).....	16
Σκοπός.....	20
Υλικά και Μέθοδοι.....	21
Λήψη δειγμάτων	21
Καλλιέργεια δειγμάτων και απομόνωση στελεχών	21
Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA των στελεχών <i>E. coli</i> (DNA extraction)	21
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	21
PCR για ανίχνευση housekeeping genes του <i>E. coli</i>	25
PCR για ανίχνευση γονιδίων CRISPR/Cas	28
PCR για ανίχνευση γονιδίων β-λακταμάσων CTXM1, CTXM9	30
Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	31
Καθαρισμός προϊόντων PCR	32
Αλληλούχηση Sanger.....	32
Βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων	33
Πρόγραμμα BioEdit	33
PubMLST	33
CRISPR-Cas Finder	33
Blast.....	34
Αποτελέσματα.....	36
Έλεγχος παρουσίας γονιδίων που κωδικοποιούν για τις β-λακταμάσες CTX-M-1 & CTX-M-9 στα στελέχη <i>E.coli</i>	36
Τυποποίηση στελεχών με MLST.....	36
Έλεγχος της παρουσίας CRISPR/Cas συστημάτων στα στελέχη <i>E. coli</i>	37
Ανάλυση των CRISPR συστοιχιών	39

Τύπου I-E CRISPR/Cas συστήματα	44
Τύπου I-F CRISPR/Cas συστήματα	45
Συμπεράσματα-Συζήτηση.....	59
Βιβλιογραφία	52

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά το χρονικό διάστημα Δεκεμβρίου 2022-Ιουνίου 2023.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της πτυχιακής μου εργασίας, Επίκουρο Καθηγητή Ιατρικής Μικροβιολογίας, κ. Παπαγιαννίτη Κωνσταντίνο, για τη βοήθειά του, την καθοδήγηση και τις συμβουλές του κατά τη διάρκεια της έρευνας.

Επιπλέον, ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον φίλο και μεταπτυχιακό φοιτητή Λάζαρο Γκαγκαλέτσιο για την πολύτιμη βοήθεια του κατά τη διάρκεια των πειραμάτων αλλά και το ευχάριστο κλίμα.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κ. Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο, καθηγητή Μοριακής Βιολογίας στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και την κ. Πετεινάκη Ευθυμία, καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας-Κλινικής Μικροβιολογίας του τμήματος Ιατρικής για την άψογη συνεργασία ως συνεπιβλέποντες της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους φίλους και τους συγγενείς μου που με στήριζαν κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Τα CRISPR/Cas συστήματα αποτελούν έναν από τους πιο κοινούς μηχανισμούς άμυνας που εμφανίζονται στους προκαρυωτικούς οργανισμούς. Ο μηχανισμός λειτουργίας τους βασίζεται στην ικανότητά τους να ενσωματώνουν το ξένο γενετικό υλικό, με σκοπό την ανίχνευση και καταστροφή του σε μια επόμενη μόλυνση. Αποτελούνται από τις CRISPR συστοιχίες που είναι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, οι οποίες διακόπτονται από μη επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που ονομάζονται διαχωριστές (spacers) και είναι τμήματα του ξένου γενετικού υλικού που έχουν επέλθει από παλαιότερες μολύνσεις του προκαρυώτη. Τα CRISPR/Cas συστήματα εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία και ταξινομούνται σε 2 κλάσεις και 6 τύπους.

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την ύπαρξη και τον ρόλο των CRISPR/Cas συστημάτων σε κλινικά στελέχη *E. coli* που απομονώθηκαν από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας κατά το χρονικό διάστημα 2021-2023. Τα κλινικά αυτά στελέχη με τη χρήση PCR και βιοπληροφορικών αναλύσεων τυποποιήθηκαν (μέσω MLST) και μελετήθηκε η προέλευση των spacers που παρουσίαζαν με σκοπό τη ανάδειξη των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ τους αλλά και την πιθανή συσχέτισή τους με χαρακτηριστικά όπως η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Παλαιότερες μελέτες έχουν δείξει την ύπαρξη δύο συστημάτων CRISPR/Cas σε στελέχη *E. Coli*, που ανήκουν στους υποτύπους I-E και I-F.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το 15% των στελεχών αυτών εμφάνισαν CRISPR/Cas συστήματα τύπου I-E και I-F. Το 80% αυτών εμφάνιζε παράλληλα και γονίδια ανθεκτικότητας σε β-λακταμικά αντιβιοτικά. Αντιθέτως, σε στελέχη που απουσίαζαν CRISPR/Cas συστήματα, το 72% αυτών παρουσίασαν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Επιπλέον, μέσω τυποποίησης των στελεχών με MLST βρέθηκε ότι τα περισσότερα από αυτά ανήκαν σε διαφορετικούς κλώνους, ενώ αυτά που ανήκαν στον ίδιο κλώνο παρουσίαζαν κοινά spacers, με κάποια να εμφανίζουν καινούρια spacers, υποδηλώνοντας την εξελικτική τους πορεία. Με την βοήθεια βιοπληροφορικής ανάλυσης δείξαμε ότι το 75% των spacers ταίριαζε με χρωμοσωμικές αλληλουχίες του *E. coli* ή ήδη χαρακτηρισμένες CRISPR περιοχές, το 16,5 % φάνηκε να μην ταιριάζει με χαρακτηρισμένες αλληλουχίες στις βάσεις δεδομένων και το 8,5% αντιστοιχούσε σε αλληλουχίες πλασμιδίων και φάγων που σχετίζονται με την έκφραση πρωτεϊνών, όπως αντιπεριοριστικές πρωτεΐνες (antirestriction protein) που σχετίζονται με την οριζόντια μεταφορά γονιδίων, αλλά και πρωτεΐνες με δράση N-6 DNA μεθυλάσης που εμπλέκονται στον αμυντικό μηχανισμό του βακτηρίου. Συμπερασματικά, στην παρούσα έρευνα βρέθηκαν CRISPR/Cas συστήματα σε κλινικά στελέχη *E. coli* που παρουσιάζουν ταυτόχρονα γονίδια ανθεκτικότητας σε β-λακταμικά αντιβιοτικά σε ποσοστό σχεδόν ίδιο με στελέχη που δεν εμφάνισαν CRISPR/Cas, ενώ παράλληλα βρέθηκαν στελέχη που ανήκουν στους ίδιους κλώνους και παρουσιάζουν ίδια spacers.

Abstract

CRISPR/Cas systems are one of the most common defence mechanisms seen in prokaryotic organisms. Their mechanism of operation is based on their ability to integrate foreign genetic material in order to detect and destroy it in a subsequent infection. They consist of CRISPR arrays, which are repetitive sequences interrupted by non-repetitive sequences called spacers, which are portions of the foreign genetic material that have been introduced by earlier infections of the prokaryote. CRISPR/Cas systems are highly diverse and are classified into 2 classes and 6 types.

In this study, we investigated the existence and role of CRISPR/Cas systems in clinical *E. coli* strains isolated from the University General Hospital of Larissa during the period 2021-2023. These clinical strains using PCR and bioinformatic analyses were typed (via MLST) and the origin of the spacers they presented was studied in order to highlight the phylogenetic relationships between them and their possible association with characteristics such as antibiotic resistance. Previous studies have shown the existence of two CRISPR/Cas systems in *E. coli* strains belonging to subtypes I-E and I-F.

The results showed that 15% of these strains displayed CRISPR/Cas systems of type I-E and I-F. 80% of them also displayed genes for resistance to beta-lactam antibiotics. In contrast, in strains lacking CRISPR/Cas systems, 72% of them showed antibiotic resistance genes. Furthermore, by typing the strains with MLST, it was found that most of them belonged to different clones, while those belonging to the same clone showed common spacers, with some showing new spacers, indicating their evolutionary pathway. Using bioinformatic analysis, we showed that 75% of the spacers matched chromosomal sequences of *E. coli* or already characterized CRISPR regions, 16.5 % appeared to be mismatched with characterized sequences in the databases and 8.5 % corresponded to plasmid and phage sequences associated with the expression of proteins, such as antirestriction proteins associated with horizontal gene transfer and proteins with N-6 DNA methylase activity involved in the defense mechanism of the bacterium. In conclusion, the present study found CRISPR/Cas systems in clinical strains of *E. coli* that simultaneously exhibit beta-lactam antibiotic resistance genes at a rate almost identical to strains that did not display CRISPR/Cas, while also finding strains belonging to the same clones and exhibiting identical spacers.

Εισαγωγή

Συστήματα CRISPR/Cas

Τα συστήματα CRISPR/Cas αποτελούν ένα προκαρυωτικό προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα που υπάρχει σε πολλά βακτήρια και αρχαία. Αποτελούνται από ομαδοποιημένες τακτικά διακεκομμένες σύντομες παλινδρομικές επαναλήψεις (CRISPR) και συσχετισμένες με CRISPR πρωτεΐνες (Cas). Το CRISPR/Cas αποτρέπει τη μόλυνση από βακτηριοφάγους και ιούς, με την αποδόμηση των ξένων νουκλεϊκών οξέων που εισέρχονται στο κύτταρο. Τα συστήματα αυτά εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία και πολυπλοκότητα και οι διάφορες παραλλαγές τους μπορούν να αποτυπώσουν τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ τους, δίνοντας πληροφορίες για το σύστημα της προσαρμοστικής ανοσίας (Makarova et al, 2015).

Δομή και μηχανισμός λειτουργίας των συστημάτων CRISPR/Cas

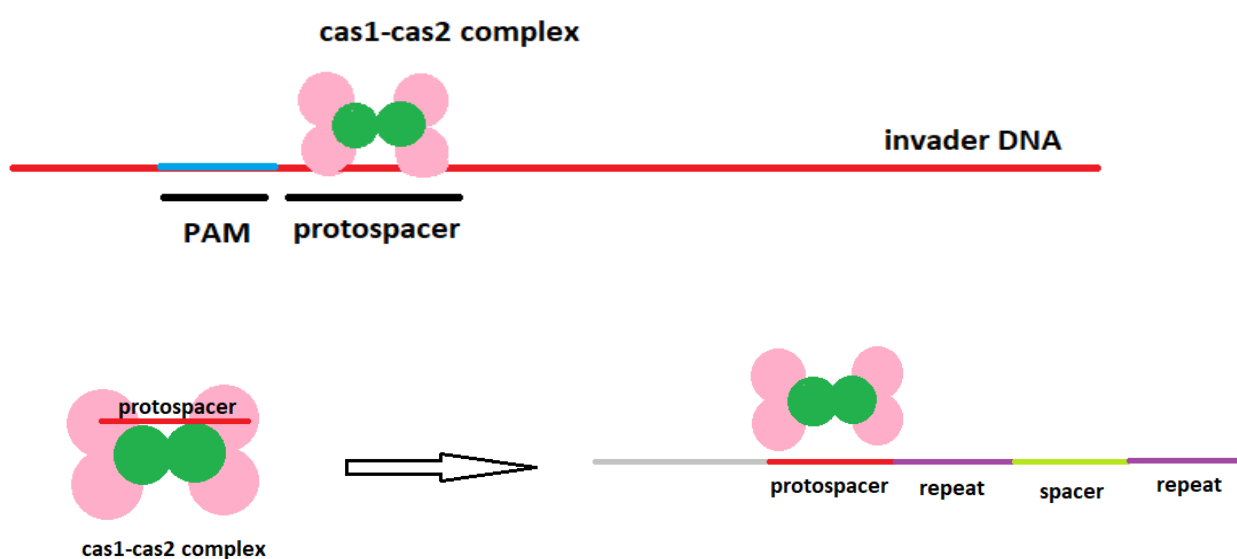
Η λειτουργία των συστημάτων CRISPR/Cas βασίζεται στην ικανότητά τους να ενσωματώνουν κομμάτια ξένου DNA (spacers) στην περιοχή CRISPR και να τα μεταγράφουν, με αποτέλεσμα να παράγεται ένα crRNA που λειτουργεί ως οδηγός στοχεύοντας το ξένο γονιδίωμα με σκοπό την αποικοδόμηση του.

Μια τυπική δομή του συστήματος περιλαμβάνει τις συστοιχίες CRISPR που είναι μια σειρά από επαναλαμβανόμενες ακολουθίες (repeats), οι οποίες διακόπτονται από μικρά τμήματα μη επαναλαμβανόμενων ακολουθιών (spacers) που προέρχονται από τα ξένα γενετικά στοιχεία τα οποία ενσωματώνονται. Εκτός από τις συστοιχίες αυτές υπάρχει και το οπερόνιο των *cas* γονιδίων που κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες Cas, οι οποίες είναι απαραίτητες τόσο για την ενσωμάτωση των spacers αλλά και για την αποικοδόμηση του ξένου γενετικού υλικού. Οι υποτύποι των CRISPR/Cas συστημάτων και ο αριθμός των μονάδων spacers-repeats ποικίλλει μεταξύ των ειδών. (Εικόνα 1) (Amitai et al, 2016).



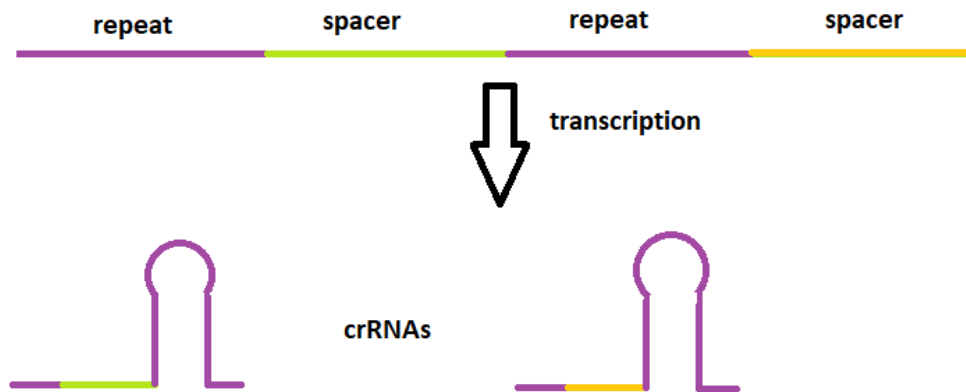
Εικόνα 1: Δομή συστήματος CRISPR/Cas

Ο μηχανισμός δράσης του συστήματος CRISPR/Cas χωρίζεται σε τρία κύρια στάδια: 1) προσαρμογή 2) μεταγραφή και ωρίμανση του crRNA και 3) παρεμβολή. Κατά το στάδιο της προσαρμογής οι πρωτεΐνες Cas προσδιορίζουν την αλληλουχία του spacer του ξένου DNA και βοηθούν στην ενσωμάτωσή του στην συστοιχία CRISPR. Πιο συγκεκριμένα, το σύμπλεγμα Cas1–Cas2, που περιλαμβάνει δύο διμερή Cas1 και ένα διμερές Cas2, λαμβάνει τον πρωτοδιαχωριστή (protospacer) του εισερχόμενου DNA/RNA του εισβολέα, ενσωματώνοντάς τον ως νέο spacer στη συστοιχία CRISPR. Η αναγνώρισή του βασίζεται στην ταυτοποίηση παρακείμενων μοτίβων πρωτοδιαχωριστών (PAM) και το ενσωματωμένο τμήμα συνδυάζεται με μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (repeat) (Εικόνα 2) (Amitai et al, 2016).



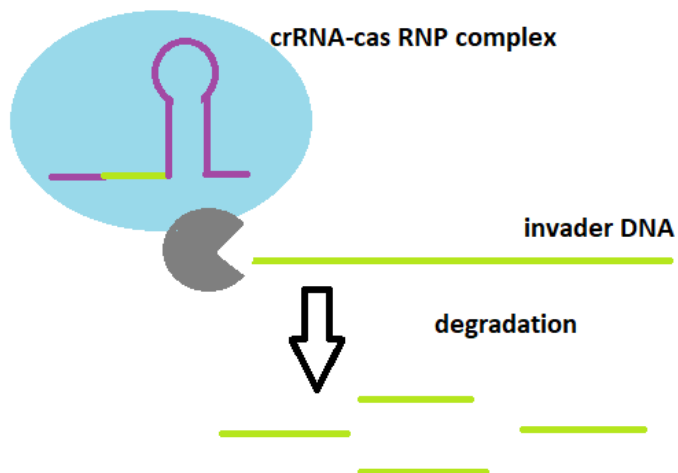
Εικόνα 2: Προσαρμογή

Στο επόμενο στάδιο, γίνεται η μεταγραφή της περιοχής CRISPR σε ένα πρόδρομο μετάγραφο (pre-crRNA) το οποίο υφίσταται επεξεργασία και ωρίμανση ώστε να προκύψει το crRNA. Κάθε crRNA περιέχει ένα μόνο spacer μαζί με μία επαναλαμβανόμενη αλληλουχία και συνδυάζεται με μία ή περισσότερες Cas πρωτεΐνες ώστε να δημιουργηθεί το ενεργό σύμπλοκο ριβονουκλεοπρωτεϊνών (RNP) CRISPR/Cas (Εικόνα 3) (Amitai et al, 2016).



Εικόνα 3: Μεταγραφή και ωρίμανση crRNA

Κατά το τελευταίο στάδιο της παρεμβολής, το crRNA λειτουργεί ως οδηγός και το σύμπλεγμα crRNA/Cas RNP αναγνωρίζει το DNA/RNA στόχο μέσω συμπληρωματικού ζευγαρώματος, η αλληλουχία του οποίου στη συνέχεια αποικοδομείται από νουκλεάσες (*Εικόνα 4*) (Amitai et al,2016).



Εικόνα 4: Παρεμβολή

Ταξινόμηση συστημάτων CRISPR/Cas

Τόσο οι αλληλουχίες των πρωτεϊνών Cas όσο και των CRISPR/cas τόπων εμφανίζουν σημαντική ποικιλομορφία. Για τον λόγο αυτό όλα τα CRISPR/Cas συστήματα χωρίζονται σε δύο ξεχωριστές κατηγορίες, με βάση τη σύνθεση των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων (RNP). Τα συστήματα κλάσης 1 έχουν σύμπλοκα πολλαπλών υπομονάδων που περιλαμβάνουν πολλές πρωτεΐνες Cas, όπως

για παράδειγμα το σύμπλεγμα Cascade ή το σύμπλεγμα Csm13, ενώ στα συστήματα κλάσης 2, τα σύμπλοκα αποτελούνται από μια ενιαία, μεγάλη, πρωτεΐνη Cas πολλαπλών τομέων, όπως για παράδειγμα την Cas9. Οι δύο κατηγορίες CRISPR/Cas χωρίζονται σε τρεις τύπους η καθεμία, τύπους I, III και IV στην κλάση 1 και τύπους II, V και VI στην κλάση 2. Κάθε τύπος ταξινομείται περαιτέρω σε πολλαπλούς υποτύπους που διακρίνονται από πιο λεπτές διαφορές στην οργάνωση του γενετικού τόπου και συχνά κωδικοποιούν ειδικές για τον υπότυπο πρωτεΐνες Cas. Εκτός αυτού οι μηχανισμοί επεξεργασίας του pre-crRNA διαφέρουν επίσης μεταξύ των δύο κλάσεων. (Nishimasu et al, 2017).

Οι κύριοι τύποι συστημάτων CRISPR/Cas είναι οι τύποι I, II και III και IV. Οι τύποι CRISPR/Cas διαχωρίζονται με βάση τα αντίστοιχα «γονίδια υπογραφής» και τον τρόπο που αυτά οργανώνονται. Όλοι οι γενετικοί τόποι του τύπου I περιέχουν το γονίδιο *cas3*, που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με δράση ελικάσης, η οποία σε συνδυασμό με μια ενδονουκλεάση εμπλέκεται στη διάσπαση του DNA στόχου. Επιπλέον, τα συστήματα τύπου I χωρίζονται σε έξι υποτύπους, I-A έως I-F, καθένας από τους οποίους έχει το δικό του γονίδιο υπογραφής. Αντίστοιχα, το γονίδιο υπογραφής για το σύστημα CRISPR/Cas τύπου II είναι το *cas9*, το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που είναι απαραίτητη τόσο για τη διάσπαση του DNA στόχου όσο και για την ωρίμανση του crRNA. Τα συστήματα CRISPR-Cas τύπου II ταξινομούνται επί του παρόντος σε τρεις υποτύπους II-A, II-B και II-C. Τέλος, όλα τα συστήματα τύπου III διαθέτουν το γονίδιο υπογραφής *cas10* και χωρίζονται σε δύο υποτύπους III-A και III-B (Makarova et al, 2015).

Escherichia coli

Το *E. coli* είναι ένα από τα καλύτερα χαρακτηρισμένα μοντέλα οργανισμών. Ανήκει στην κατηγορία των Gram-αρνητικών βακτηρίων της οικογένειας των *Enterobacteriaceae*, είναι μη σποριογόνος προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός και ανήκει φυσιολογικά στο μικροβίωμα του γαστρεντερικού σωλήνα των ανθρώπων και των θερμόαιμων ζώων. Το *E. coli* είναι από τα πρώτα βακτηριακά είδη που αποικίζουν το έντερο κατά τη βρεφική ηλικία, φτάνοντας τελικά σε πολύ υψηλή πυκνότητα (Tenaillon et al, 2010).

Το *E. coli* είναι ένα μεσόφιλο βακτήριο και η βέλτιστη ανάπτυξή του εμφανίζεται στους 39°C, ενώ η μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 48°C και η ελάχιστη 8°C. Το *E. coli* αναπτύσσεται σε μια ποικιλία θρεπτικών μέσων που περιέχουν γλυκόζη, χλωριούχο ασβέστιο, θειικό μαγνήσιο, θειικό αμμώνιο, δισόξινο φωσφορικό κάλιο και νερό (Madigan et al, 2015). Αναπτύσσεται παρουσία οξυγόνου αλλά και απουσία αυτού μπορεί να συνεχίσει να αναπτύσσεται χρησιμοποιώντας ζύμωση ή αναερόβια αναπνοή. Η ικανότητα τους να συνεχίσουν την ανάπτυξη απουσία οξυγόνου είναι ένα πλεονέκτημα για τα βακτήρια επειδή η επιβίωσή τους αυξάνεται σε περιβάλλοντα όπου κυριαρχεί το νερό (Ingledew et al, 1984).

Βασίλειο	Bacteria
Φύλο	Pseudomonadota
Κατηγορία	Gammaproteobacteria
Τάξη	Enterobacterales
Οικογένεια	Enterobacteriaceae
Γένος	Escherichia
Είδος	<i>E. coli</i>
Συνώνυμο	Bacillus coli communis Escherich

Πίνακας 1: Η επιστημονική ταξινόμηση του *E. coli* (NCBI)

Η σχέση μεταξύ του *E. coli* και του ξενιστή του χαρακτηρίζεται ως κομμενσαλισμός, στον οποίο ένας εκ των δύο οργανισμών επωφελείται από τη συμβιωτική τους σχέση, ενώ ο άλλος παραμένει ανεπηρέαστος. Το μικροβίωμα του *E. coli* παρέχει ορισμένα οφέλη στον ξενιστή του αποτρέποντας τον αποικισμό από παθογόνους μικροοργανισμούς, μέσω βακτηριοσινών και άλλων μηχανισμών (Tenailon et al, 2010).

Αρχικά, όλα τα στελέχη *E. coli* είχαν θεωρηθεί μη παθογόνοι οργανισμοί. Ωστόσο, στη δεκαετία του 1940 τα στελέχη *E. coli* εντοπίστηκαν σε συνδυασμό με περιπτώσεις βρεφικής διάρροιας και βρέθηκε ότι σχετίζονται με συγκεκριμένους ορότυπους του *E. coli*, που αναφέρονταν ως εντεροπαθογόνα *E. coli* (EPEC). Το *E. coli* έχει συσχετιστεί από τότε με διάφορες κλινικές καταστάσεις και έχουν οριστεί αρκετοί παθογόνοι ορότυποι (Chaudhuri et al, 2012). Μια σημαντική κατηγορία αυτών των παθογόνων αποτελούν τα *E. coli* που παράγουν τοξίνες Shiga (STEC) και αναγνωρίστηκαν από τις αρχές της δεκαετίας του 1980. Τα βακτήρια αυτά έχουν ταξινομηθεί σε οροπαθοτύπους A έως E ανάλογα με την ικανότητα τους να προκαλούν ασθένειες (Toro et al, 2013).

Σύμφωνα με την έρευνα των Whittam et al., 1983b (μέσω Multi-locus enzyme electrophoresis-MLEE), οι Ochman και Selander (1984b) δημιούργησαν μια συλλογή αναφοράς που αποτελείται από 72 στελέχη *E. coli* τα οποία απομονώθηκαν από ανθρώπους και 16 άλλα θηλαστικά είδη. Αυτά τα στελέχη, αποτελούν την συλλογή ECOR (*E. coli* reference) και αντιπροσωπεύουν την πλήρη ποικιλότητα του είδους (Chaudhuri et al, 2012).

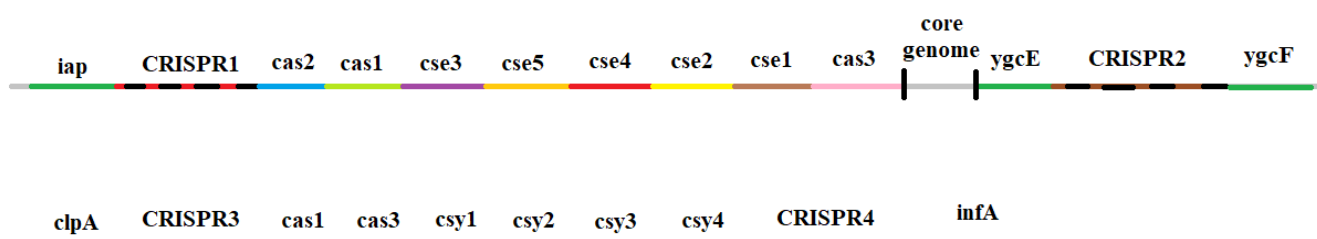


Εικόνα 5: Αποικίες *E.coli* σε MacConkey άγαρ
(<http://www.bacteriainphotos.com/escherichia-coli.html>)

Η πρώτη πλήρης αλληλουχία DNA ενός γονιδιώματος *E. coli* (εργαστηριακό στέλεχος K-12 παράγωγο MG1655) δημοσιεύτηκε το 1997 και είναι ένα κυκλικό μόριο DNA μήκους 4,6 εκατομμυρίων ζευγών βάσεων, που περιέχει 4288 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (οργανωμένα σε 2584 οπερόνια), επτά οπερόνια ριβοσωμικού RNA (rRNA) και 86 γονίδια μεταφορικού RNA (tRNA). Το γονιδίωμα, επίσης, περιέχει σημαντικό αριθμό μεταθετών γενετικών στοιχείων, αλληλουχίες εισδοχής (insertion sequence; IS) και υπολείμματα βακτηριοφάγων (Bhawsinghka et al, 2020).

Οι αλληλουχίες CRISPR ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά στο *E. coli* το 1987. Τέσσερις τόποι CRISPR έχουν περιγραφεί στο *E. coli*. Τα CRISPR1 και CRISPR2 έχουν πανομοιότυπες συναινετικές επαναλήψεις και βρίσκονται μεταξύ των γονιδίων *iap* και *ycgF*. Τα CRISPR3 και το CRISPR4 που έχουν επίσης ταυτόσημες επαναλήψεις βρίσκονται μεταξύ *clpA* και *infA* γονιδίων (Εικόνα 6). Τα CRISPR1/*cas* γονίδια σχηματίζουν τον υπότυπο I-E CRISPR, ενώ τα CRISPR3/*cas* γονίδια σχηματίζουν τον υποτύπο I-F CRISPR (Toro et al, 2013). Σε έρευνα των Touchon et al. έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία των τόπων CRISPR1 και CRISPR2 συνδέεται άμεσα με την παρουσία του γονιδίου *cas2*, όπως και η παρουσία των CRISPR3 και CRISPR4 σχετίζεται με την παρουσία του γονιδίου *cas1* (Touchon et al, 2011). Ο βασικός ρόλος αυτών των συστημάτων είναι γνωστό ότι είναι η προστασία έναντι ξένων γενετικών στοιχείων. Ωστόσο, πολλοί θεωρούν ότι η εξέλιξη των παθογόνων στελεχών αποδίδεται στην απόκτηση στοιχείων όπως τρानσποζονίων, φάγων, γενετικών νησίδων και πλασμιδίων μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων. Για παράδειγμα, γενετικές αναλύσεις κάποιων STEC οροτύπων αποκάλυψαν ότι έχουν πολύ μεγαλύτερα

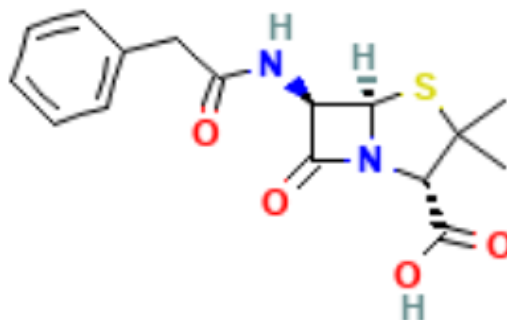
γονιδιώματα από τα μη παθογόνα *E. coli*, κυρίως λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας σε μεταθετά στοιχεία, οπότε υπάρχει πιθανότητα συσχέτισης της εμφάνισης λοιμογόνου δράσης με τα συστήματα CRISPR και την εισαγωγή ξένων γενετικών στοιχείων σε αυτά (Toro et al, 2013).



Εικόνα 6: Περιοχές CRISPR1-CRISPR2, CRISPR3-CRISPR4 και συσχετιζόμενα γονίδια *cas*.

Η μικροβιακή τους αντοχή είναι επίσης ένα σημαντικό και παγκόσμιο πρόβλημα υγειονομικής περίθαλψης, καθώς η αυξημένη κατανάλωση αντιμικροβιακών παραγόντων και η ακατάλληλη χρήση τους έχει οδηγήσει έναν μεγάλο αριθμό βακτηρίων να ανταποκριθούν στη χρήση αντιβιοτικών μεταδίδοντας τη μικροβιακή αντοχή σε άλλα είδη. Πρόσφατα δεδομένα από τη δεκαετία του 2000 έδειξαν ότι υπάρχει αντοχή σε όλες τις κύριες κατηγορίες αντιβιοτικών μεταξύ των στελεχών *E. coli*. Η αντοχή του *E. coli* και άλλων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων σε διάφορα αντιμικροβιακά οφείλεται στην ανάπτυξη πολλών διαφορετικών μηχανισμών, όπως ένζυμα αδρανοποίησης και τροποποίησης αντιβιοτικών, β-λακταμάσες, αλλοιωμένη διαπερατότητα, μεταλλάξεις κλπ. (Paitan et al, 2018).

Για παράδειγμα, το *E. coli* είναι εγγενώς ανθεκτικό στην πενικιλίνη G (Εικόνα 8), την πρώτη β-λακτάμη που εισήχθη στον κλινικό τομέα ως αντιβιοτικό. Στο *E. coli*, η παραγωγή β-λακταμάσης είναι ο σημαντικότερος μεσολαβητής που προσδίδει αντοχή στο φάσμα των β-λακταμών. Οι β-λακταμάσες είναι μια ευρεία κατηγορία ενζύμων, τα οποία συχνά κωδικοποιούνται σε πλασμίδια και παράγονται συνηθέστερα από τα *Enterobacteriaceae* όπως το *E. coli*, προσδίδοντας αντοχή στις πενικιλίνες και τις κεφαλοσπορίνες. (Allocati et al, 2013).



Εικόνα 8: Πενικιλίνη G (NCBI)

Μεταξύ των νέων β-λακταμασών που εμφανίζονται στα Gram- αρνητικά παθογόνα, σημαντικό ρόλο έχουν και οι β-λακταμάσες εκτεταμένου φάσματος μοριακής τάξης A (ESBLs) που είναι ενεργές έναντι των κεφαλοσπορινών διευρυμένου φάσματος και μονοβακτάμων. Ένα παράδειγμα τέτοιων β-λακταμασών αποτελούν οι CTX-M που εξαπλώνονται μεταξύ των εντεροβακτηριδίων παγκοσμίως (Rossolini et al, 2008).

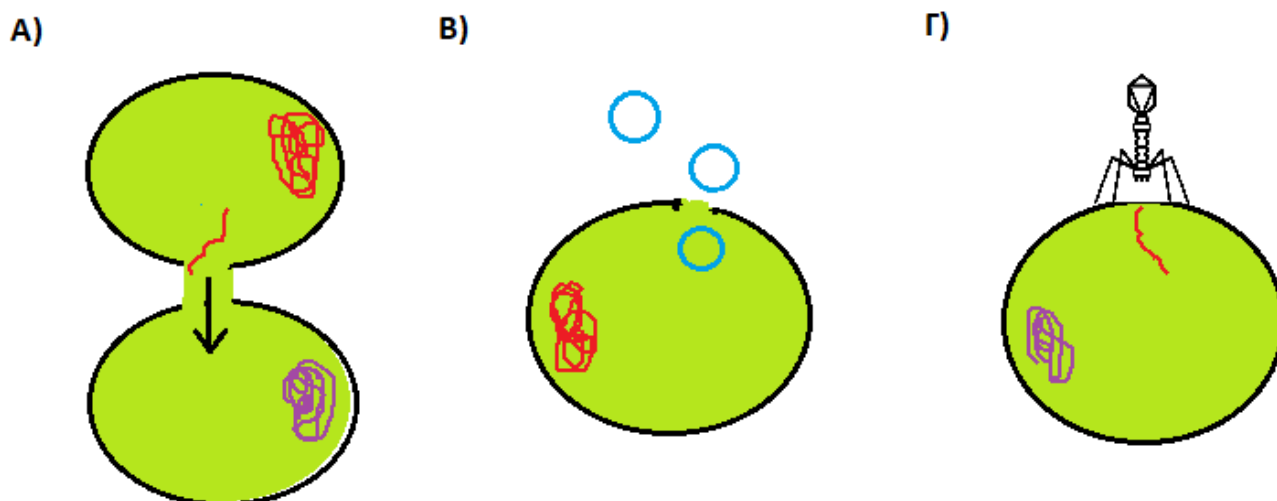
Οριζόντια Μεταφορά Γονιδίων (Horizontal Gene Transfer – HGT)

Η οριζόντια μεταφορά γονιδίων (HGT) είναι η κοινή χρήση γενετικού υλικού μεταξύ οργανισμών που δεν έχουν σχέση γονέα-απογόνου και αποτελεί έναν μηχανισμό προσαρμογής σε βακτήρια και αρχαία. Για την επιβίωση του μεταφερόμενου γονιδίου στον δέκτη για μεγάλα χρονικά διαστήματα, χρειάζεται το γονίδιο να παρέχει ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα είτε στον εαυτό του είτε στον αποδέκτη, αλλιώς υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να χαθεί με την πάροδο του χρόνου. Οι τρεις κύριοι μηχανισμοί της οριζόντιας μεταφοράς στους προκαρυώτες είναι η σύζευξη, ο μετασχηματισμός και η μεταγωγή (Soucy et al, 2015).

Η σύζευξη είναι ένας μονόδρομος μηχανισμός μετάδοσης του DNA από το ένα κύτταρο στο άλλο μέσω ενός «συζευκτικού πυλώνα» που μεταφέρει το DNA και απαιτεί τη φυσική επαφή μεταξύ του δότη και του κυττάρου δέκτη. Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη σύζευξη μεταφέρονται από πλασμίδια ή βακτηριοφάγους γνωστά ως «συζευκτικά», διασφαλίζοντας έτσι τη μετάδοσή τους. Ωστόσο, αυτά τα συζευκτικά στοιχεία μπορεί να φέρουν μαζί τους το DNA του ξενιστή και έτσι να οδηγήσουν στη μεταφορά γονιδίων διαφορετικών από το δικό τους (*Εικόνα 9Α*).

Ο μετασχηματισμός είναι ένας μηχανισμός με τον οποίο το κυτταρόπλασμα ενός κυττάρου λαμβάνει το ελεύθερο DNA που υπάρχει στο περιβάλλον και τυπικά προέρχεται από νεκρούς οργανισμούς. Ορισμένα βακτήρια είναι πολύ επιλεκτικά ως προς τον τύπο του DNA που επιτρέπουν να εισαχθεί στο κύτταρο γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να ευνοείται ο ανασυνδυασμός με στενούς συγγενείς (*Εικόνα 9Β*).

Η μεταγωγή είναι ένας τύπος μεταφοράς που λαμβάνει χώρα μέσω ενός βακτηριοφάγου που μεταδίδει το DNA από το ένα κύτταρο στο άλλο. Ο ξενιστής, στο τέλος του κύκλου αντιγραφής του, υφίσταται λύση και το τεμαχισμένο DNA του γονιδιώματος του συσκευάζεται μέσα σε μολυσματικά σωματίδια φάγων και μπορεί στη συνέχεια να εγχυθεί σε άλλο κύτταρο (*Εικόνα 9Γ*) (Daubin et al, 2016).



Εικόνα 9: Μηχανισμοί οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων Α) Σύζευξη Β) Μετασχηματισμός Γ) Μεταγωγή

Εκτός από αυτούς τους μηχανισμούς υπάρχουν κι άλλοι μηχανισμοί μεταφοράς γονιδίων, όπως οι παράγοντες μεταφοράς γονιδίων (GTA) και η κυτταρική σύντηξη. Τα GTA είναι ενσωματωμένα στο χρωμόσωμα του ξενιστή και έχουν μικρά τυχαία κομμάτια του γονιδιώματος του σε καψίδια με σκοπό τη μεταφορά σε άλλους ξενιστές. Ουσιαστικά, οι παράγοντες μεταφοράς γονιδίων έχουν εξελιχθεί από προφάγους που έχασαν την ικανότητα τους να στοχεύουν το δικό τους DNA και σε αντίθεση με τους φάγους, δεν μπορούν να μεταφέρουν όλα τα γονίδια που τα κωδικοποιούν σε έναν νέο ξενιστή. Η κυτταρική σύντηξη είναι μια κυτταρική διαδικασία κατά την οποία πολλά μη πυρηνικά κύτταρα ενώνονται φυσικά μεταξύ τους με σκοπό να σχηματίσουν ένα πολυπύρρηνο κύτταρο, μια διαδικασία που περιλαμβάνει αμφίδρομη γονιδιακή μεταφορά μεταξύ των κυττάρων (Soucy et al, 2015).

Κινητά Γενετικά Στοιχεία (Mobile Genetic Elements – MGEs)

Τα κινητά γενετικά στοιχεία (MGEs) είναι τμήματα του DNA που μπορούν να μεταφερθούν μέσα σε ένα γονιδίωμα ή από ένα είδος σε ένα άλλο (Frost et al, 2005). Η συχνότητα της μετάθεσης αυτών των στοιχείων είναι συνήθως της τάξης των 10^{-7} με 10^{-2} μεταθέσεων ανά γενιά. Τα στοιχεία αυτά συμβάλλουν στην εξέλιξη, καθώς μπορούν να διαμορφώσουν το γενετικό περιεχόμενο προκαλώντας αναδιατάξεις και διπλασιασμούς αλληλουχιών. Ωστόσο, η υψηλή συχνότητα μετάθεσης αυξάνει την

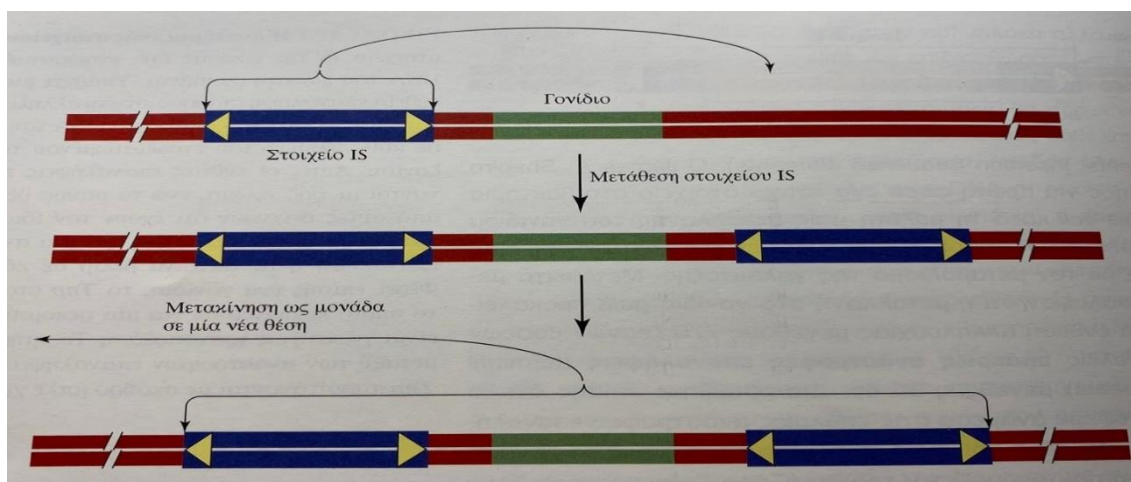
πιθανότητα διακοπής της λειτουργίας ενός απαραίτητου γονιδίου και πολλές φορές οι μεταλλάξεις που προκαλούνται από τα μεταθετά στοιχεία οδηγούν στην εμφάνιση διάφορων γενετικών διαταραχών ή ακόμα και στον θάνατο των ξενιστών. Από την άλλη πολλά κινητά γενετικά στοιχεία έχουν εξελιχθεί ώστε να προκαλούν μικρές βλάβες ή ακόμα και να παρέχουν οφέλη στους ξενιστές τους, όπως για παράδειγμα ανοχή σε αντιβιοτικά. Υπάρχουν πολλοί τύποι μεταθετών στοιχείων, με τους κυριότερους να είναι τα πλασμίδια, οι αλληλουχίες εισαγωγής (IS) και τα τρανσποζόνια (Burton E, 2012).

Τα πλασμίδια είναι κυκλικά, αυτοαναπαραγόμενα, μη χρωμοσωμικά στοιχεία DNA που υπάρχουν συνήθως στα βακτηριακά γονιδιώματα. Τα πλασμίδια έχουν βρεθεί σε πολλά βακτηριακά γονιδιώματα και κωδικοποιούν γονίδια τόσο για βασικές λειτουργίες, όπως η αντιγραφή και η συντήρηση του πλασμιδίου όσο και βοηθητικές λειτουργίες που αφορούν τον ξενιστή (Billane et al, 2022). Τα πλασμίδια διαφέρουν σε πολλά χαρακτηριστικά όπως το μέγεθος, τον αριθμό αντιγράφων, την περιεκτικότητα βάσεων G-C, τον μηχανισμό αναπαραγωγής κλπ. Ωστόσο, χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τα πλασμίδια χαμηλού αριθμού αντιγράφων (LCPs) και τα πλασμίδια υψηλού αριθμού αντιγράφων (HCPs). Τα LCP είναι συνήθως μεγάλα σε μέγεθος (από δεκάδες έως εκατοντάδες κιλοβάσεις), με χαμηλό αριθμό αντιγράφων ενώ τα HCP είναι μικρά και έχουν υψηλούς αριθμούς αντιγράφων. Λόγω του αριθμού αντιγράφων τους, τα πλασμιδιακά γονίδια τείνουν να εκφράζονται πιο έντονα από τα χρωμοσωμικά και για αυτόν τον λόγο τα πλασμίδια έχουν αξιοποιηθεί για τη παραγωγή πρωτεϊνών σε μεγάλη κλίμακα. Για παράδειγμα, γονίδια που κωδικοποιούν β-λακταμάσες βρίσκονται τόσο στα πλασμίδια όσο και στα χρωμοσώματα, αλλά τα επίπεδα ανοχής σε αντιβιοτικά είναι υψηλότερα (έως και 128 φορές) όταν αυτά τα ένζυμα κωδικοποιούνται από πλασμίδια. Τα πλασμίδια μπορούν να μεταφερθούν με τους μηχανισμούς που αναλύσαμε παραπάνω όπως η σύζευξη και ο μετασχηματισμός (Rodríguez-Beltrán et al, 2021).

Οι αλληλουχίες εισδοχής (IS) αποτελούν σημαντικό συστατικό των περισσότερων βακτηριακών γονιδιωμάτων. Έχουν πλέον ταυτοποιηθεί πάνω από 1000 διαφορετικά στοιχεία IS, περίπου 750 έως 2500 bp, τα οποία ταξινομούνται σε 20 διαφορετικές οικογένειες με βάση τα διάφορα χαρακτηριστικά τους (Burton E, 2012). Οι αλληλουχίες εισδοχής είναι μικρές σε μέγεθος και γενετικά συμπαγείς. Γενικότερα, κωδικοποιούν μόνο λειτουργίες που εμπλέκονται στην κινητικότητά τους, όπως *cis* παράγοντες, αλληλουχίες DNA που ορίζουν τα άκρα του στοιχείου και ένα ένζυμο, την

τρανσποζάση (Trase), που αναγνωρίζει και επεξεργάζεται αυτά τα άκρα. Επίσης, η πλειονότητα των IS εμφανίζει σύντομες τερματικές αλληλουχίες ανεστραμμένης επανάληψης (IR) μεταξύ 10 και 40 bp (Mahillon et al, 1998).

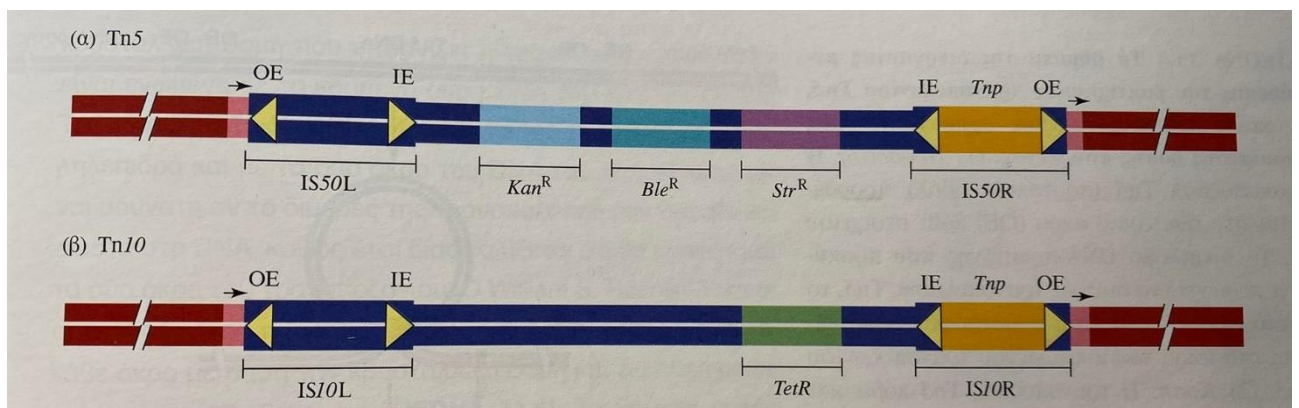
Τα στοιχεία IS είναι δομικοί λίθοι μιας δομής που ονομάζεται σύνθετο τρανσποζόνιο και σχηματίζεται όταν ένα στοιχείο IS εισάγεται εκατέρωθεν ενός ή περισσότερων γονιδίων. Η μετακίνηση ολόκληρου του τρανσποζονίου διευκολύνεται όταν χρησιμοποιούνται για τη μετάθεση τα εξωτερικά άκρα των IS (Εικόνα 10). (Burton E, 2012).



Εικόνα 10: Σύνθετο τρανσποζόνιο (Burton E, 2012)

Τα σύνθετα τρανσποζόνια μπορεί να είναι ωφέλιμα για τον ξενιστή, αν το γονίδιο που εμπεριέχεται μεταξύ των αλληλουχιών εισδοχής προσφέρει κάποιο πλεονέκτημα, όπως ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Για παράδειγμα, το *E. coli* φέρει δύο σημαντικά τρανσποζόνια που έχουν μελετηθεί εκτενώς, τα Tn5 και Tn10. Το Tn5 φέρει αλληλουχίες εισδοχής στα άκρα του που συμβολίζονται με IS50L και IS50R, με τα εσωτερικά τους άκρα να συμβολίζονται με IE και τα εξωτερικά με OE. Αντίστοιχα, το Tn10 φέρει αλληλουχίες IS10L και IS10R. Μόνο οι δεξιές αλληλουχίες εισαγωγής (IS50R, IS10R) και των δύο τρανσποζονίων φέρουν λειτουργικά γονίδια που κωδικοποιούν την τρανσποζάση. Μεταξύ των IS περιέχονται γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά όπως η καναμυκίνη, μπλεομυκίνη, στρεπτομυκίνη και τετρακυκλίνη (Εικόνα 11) (Burton E, 2012).

Η αναγνώριση των κινητών μεταθετών στοιχείων ως ξένο γενετικό υλικό από τα CRISPR/Cas συστήματα μπορεί να οδηγήσει πιθανότατα στην αποικοδόμηση τους και κατ' επέκταση στην σίγαση των γονιδίων που μεταφέρουν όπως γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Για τον λόγο αυτό είναι ενδιαφέρουσα η μελέτη και η συσχέτιση των CRISPR/Cas συστημάτων με το ποσοστό απόκτησης γονιδίων ανθεκτικότητας, όπως έχει αποδειχθεί και από παλαιότερες έρευνες ότι στελέχη βακτηρίων που φέρουν CRISPR/Cas συστήματα εμφανίζουν και μικρότερο ποσοστό γονιδίων ανθεκτικότητας σε σχέση με στελέχη που δεν φέρουν τέτοιου είδους συστήματα (Pursey et al., 2021).



Εικόνα 11: Ανατομία των τρανσποζονίων Tn5 και Tn10 στα *E.coli* (Burton E, 2012)

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η διερεύνηση των συστημάτων CRISPR/Cas σε κλινικά βακτηριακά στελέχη *E. coli*, με στόχο την αναγνώριση των διαχωριστών (spacers) που περιέχουν και την αξιολόγηση της πληροφορίας τους. Με την βοήθεια βιοπληροφορικών αναλύσεων θα μπορούσαμε να ταυτοποιήσουμε την προέλευση των αλληλουχιών των διαχωριστών και να ταυτοποιήσουμε τα γενετικά στοιχεία με τα οποία έχουν έρθει σε επαφή τα βακτηριακά στελέχη. Ακόμη θα μπορούσαμε να συσχετίσουμε την ύπαρξη των συστημάτων CRISPR/Cas με κάποια χαρακτηριστικά των συγκεκριμένων στελεχών, όπως το μειωμένο ποσοστό απόκτησης γονιδίων αντοχής.

Υλικά και Μέθοδοι

Λήψη δειγμάτων

Σε συνεργασία με το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας (ΠΓΝΛ) συλλέξαμε 98 διαφορετικά κλινικά στελέχη *E.coli* από ασθενείς διαφόρων κλινικών, τη χρονική περίοδο 2021-2023.

Καλλιέργεια δειγμάτων και απομόνωση στελεχών

Τα κλινικά στελέχη καλλιεργήθηκαν σε αιματούχο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (blood agar) και επώασή τους σε κλίβανο για 24 h σε θερμοκρασία 37 °C υπό αερόβιες συνθήκες. Ύστερα από την ανάπτυξη τους, όλες οι αποικίες *E. coli* απομονώθηκαν και αποθηκευτήκαν σε θρεπτικό ζωμό με 20% γλυκερόλη και διατηρήθηκαν στην κατάψυξη στους -70 °C.

Απομόνωση ολικού DNA των στελεχών *E. coli* (DNA extraction)

Για την απομόνωση του γενετικού υλικού χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα Bruker Life Science GenoXtract. Το συγκεκριμένο μηχάνημα επιτρέπει την αυτοματοποιημένη εξαγωγή νουκλεϊκών οξέων από διάφορα υλικά δείγματος, όπως πνευμονικά και εξωπνευμονικά δείγματα, κόπρανα, αίμα, ούρα, ορό, επιχρίσματα ή σφαιρίδια κυττάρων μέσω της τεχνολογίας μαγνητικών σφαιριδίων. Το kit που χρησιμοποιήθηκε είναι το GTX NA Extraction Kit, VER 1.0. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την απομόνωση DNA είναι τα εξής:

- 1) Επαναδιάλυση των βακτηρίων που είχαν αναπτυχθεί στα τρυβλία σε 220 μl απιονισμένου νερού, μέσα σε ένα Eppendorf, με χρήση vortex.
- 2) Προσθήκη 50 μl πρωτεϊνάσης K στα επαναδιαλυμένα βακτήρια, η οποία χρησιμοποιείται για την πέψη πολλών μολυσματικών πρωτεϊνών και για την αποικοδόμηση νουκλεασών προστατεύοντας τα νουκλεϊκά οξέα.
- 3) Εισαγωγή των δειγμάτων στο μηχάνημα μαζί με κενά Eppendorf για κάθε δείγμα, στα οποία θα τοποθετηθεί το απομονωμένο DNA.
- 4) Τοποθέτηση των ειδικών αντλιών με tips και των αντιδραστηρίων στις κατάλληλες θέσεις.
- 5) Επιλογή προγράμματος Generic250.

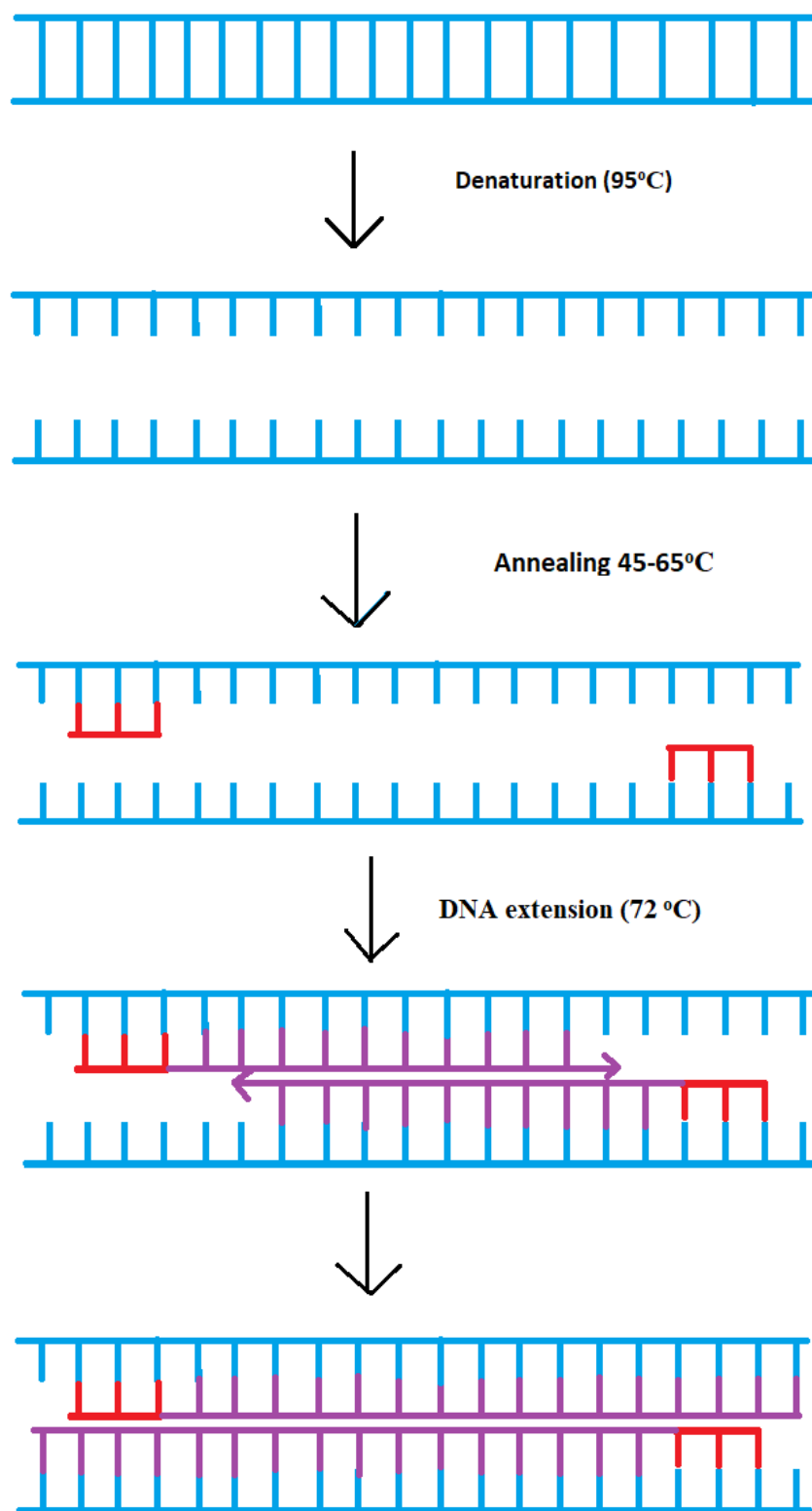
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction) είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση (πολλαπλασιασμό) συγκεκριμένων τμημάτων DNA. Η διαδικασία της PCR γίνεται *in vitro*, δηλαδή χωρίς τη μεσολάβηση

ζωντανού οργανισμού, χρησιμοποιώντας το ένζυμο της DNA πολυμεράσης με σκοπό να συνθέσει DNA από δεοξυνουκλεοτιδικά υποστρώματα με εκμαγείο μονόκλωνο DNA. Με την αντίδραση αυτήν ένα τμήμα DNA που υπήρχε αρχικά σε πολύ μικρή μη ανιχνεύσιμη ποσότητα ενισχύεται σε μεγάλα ποσά δίκλωνου DNA και μπορεί να ανιχνευθεί εύκολα με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η PCR περιλαμβάνει πολλούς κύκλους αντιδράσεων, καθένας από τους οποίους έχει τρία χαρακτηριστικά βήματα: (Εικόνα 12)

- 1) Αποδιάταξη του DNA (Denaturation): Σε αυτό το στάδιο γίνεται αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 95°C, με σκοπό να παραμείνουν δύο μονόκλωνες αλυσίδες DNA.
- 2) Υβριδισμός των εκκινητών (Annealing): Σε αυτό το βήμα μειώνεται η θερμοκρασία περίπου στους 45-65°C, αναλόγως τους εκκινητές, με σκοπό αυτοί να υβριδίσουν στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες σε κάθε μονόκλωνη αλυσίδα DNA.
- 3) Επιμήκυνση του DNA (DNA extension): Σε αυτό το τελευταίο στάδιο του κύκλου αυξάνεται η θερμοκρασία στους 72 °C, με σκοπό η DNA πολυμεράση να επεκτείνει τους δύο εκκινητές προσθέτοντας συμπληρωματικά δεοξυνουκλεοτίδια και συνθέτοντας δίκλωνο DNA και από τις δύο αλυσίδες.

Έπειτα, το DNA υποβάλλεται και σε άλλους κύκλους αποδιάταξης και σύνθεσης DNA, χρησιμοποιώντας τους ίδιους εκκινητές, με αποτέλεσμα ύστερα από 30-40 κύκλους να προκύπτουν πολλαπλά αντίγραφα της επιθυμητής αλληλουχίας (Madigan et al, 2015).



Εικόνα 12: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (1 κύκλος)

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την πραγματοποίηση όλων των PCRs είναι το εξής:

- 1) Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιούμε από το καθένα για μια αντίδραση PCR (για ένα δείγμα) αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες σε μl (για 1 αντίδραση)
Απιονισμένο νερό	18,3
Buffer 10x	2.5
DNTPs 5 mmol	0,5
MgCl ₂	1,5
Forward Primer	0,25
Reverse Primer	0,25
DNA Polymerase	0,2
DNA	1.5
Συνολικός όγκος αντίδρασης	25

Πίνακας 2: Αντιδραστήρια της PCR

Τα παραπάνω αντιδραστήρια πολλαπλασιαζόμενα επί το πλήθος των δειγμάτων που έχουμε συν 1, αναμειγνύονται σχηματίζοντας ένα mastermix το οποίο τοποθετούμε σε ένα Eppendorf 1,5ml. Η πολυμεράση τοποθετείται τελευταία διότι είναι ευαίσθητη σε θερμοκρασία δωματίου, οπότε δεν θα πρέπει να μείνει για μεγάλο χρονικό διάστημα εκτός κατάψυξης.

- 2) Αναδεύουμε το mastermix με χρήση πιπέτας και vortex με σκοπό να αναμειχθούν ομοιόμορφα όλα τα αντιδραστήρια που περιλαμβάνει.
- 3) Τοποθετούμε ποσότητα 23,5μl από το mastermix σε σωληνάκια ειδικά για τον θερμικό κυκλοποιητή της PCR (0.2ml), ίσα με τον αριθμό των δειγμάτων που έχουμε συν ένα για τον αρνητικό μάρτυρα ή θετικό μάρτυρα.
- 4) Αφού μοιράσουμε το mastermix στα σωληνάκια, τοποθετούμε ποσότητα 1,5μl από κάθε δείγμα DNA ξεχωριστά στα αντίστοιχα σωληνάκια και στα σωληνάκια του αρνητικού και θετικού μάρτυρα τοποθετούμε 1.5μl απιονισμένο νερό. Ο τελικός όγκος σε κάθε σωληνάκι είναι 25μl (23,5μl mastermix + 1,5μl δείγμα).
- 5) Ρυθμίζουμε τον θερμικό κυκλοποιητή της PCR στο πρόγραμμα που θέλουμε αναλόγως τους εκκινητές που έχουμε χρησιμοποιήσει ώστε να υπάρξουν οι κατάλληλες θερμοκρασίες και χρόνοι για την πραγματοποίηση της αντίδρασης. Αυτό που αλλάζει κυρίως σε κάθε αντίδραση PCR είναι ο χρόνος πολυμερισμού, που εξαρτάται από το μέγεθος του προϊόντος της PCR αλλά και η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών τους, η οποία εξαρτάται από τα ζευγάρια εκκινητών που χρησιμοποιούμε και υπολογίζεται από τον εξής τύπο:

$$Tm = (4 \times C-G) + (2 \times A-T) \text{ (1)}$$

➤ PCR για ανίχνευση housekeeping genes του *E. coli*

Μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και μιας διαδικασίας πολυτοπικής νουκλεοτιδικής ανάλυσης (Multi-Locus Sequence Typing-MLST) μπορούμε να τυποποιήσουμε τα στελέχη *E. coli*. Μέσω της PCR έγινε ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων από housekeeping γονίδια τα οποία υπάρχουν σε όλα τα στελέχη *E.coli* και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση των τμημάτων αυτών. Έπειτα, με τη βοήθεια της MLST (<https://pubmlst.org/>), οι διαφορετικές αλληλουχίες των housekeeping genes που υπάρχουν σε ένα βακτηριακό είδος εκχωρούνται ως διακριτά αλληλόμορφα και παίρνουν έναν αριθμό. Ο συνδυασμός των αριθμών που αντιστοιχούν στα διαφορετικά αλληλόμορφα του κάθε housekeeping γονιδίου μπορεί να ορίσει το αλληλικό προφίλ του κάθε στελέχους. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR των γονιδίων αυτών είναι:

Γενετικός τύπος & μέγεθος	Γονίδιο	Εκκινητές	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων (5' – 3')	Βιβλιογραφία
recA (510)	ATP/GTP binding motif	recA-F	CGCATTCGCTTTACCC TGACC	Wirth, T et al. (2006)
		recA-R	TCGTCGAAATCTACG ACCGGA	Wirth, T et al. (2006)
icd (518)	isocitrate/isopropylm alate dehydrogenase	icd-F	ATGGAAAGTAAAGTA GTTGTTCCGGCACA	Wirth, T et al. (2006)
		icd-R	GGACGCAGCAGGATC TGTT	Wirth, T et al. (2006)
adk (536)	adenylate kinase	adk-F	ATTCTGCTTGCGCTC CGGG	Wirth, T et al. (2006)
		adk-R	CCGTCAACTTTCGCGT ATTT	Wirth, T et al. (2006)
fumC (469)	fumarate hydratase	fumC-F	TCACAGGTCGCCAGC GCTTC	Wirth, T et al. (2006)
		fumC-R	GTACGCAGCGAAAAA GATTC	Wirth, T et al. (2006)
gyrB (460)	DNA gyrase	gyrB-F	TCGGCGACACGGATG ACGGC	Wirth, T et al. (2006)
		gyrB-R	ATCAGGCCTTCACGC GCATC	Wirth, T et al. (2006)
mdh (452)	malate dehydrogenase	mdh-F	ATGAAAGTCGCAGTC CTCGGCGCTGCTGGC GG	Wirth, T et al. (2006)

		mdh-R	TTAACGAACTCCTGC CCCAGAGCGATATCTT TCTT	Wirth, T et al. (2006)
purA (478)	Adenylosuccinate dehydrogenase	purA-F	CGCGCTGATGAAAGA GATGA	Wirth, T et al. (2006)
		purA-R	CATACGGTAAGCCAC GCAGA	Wirth, T et al. (2006)

Πίνακας 3: εκκινητές των housekeeping γονιδίων.

Με βάση τον τύπο ⁽¹⁾ υπολογίζουμε την θερμοκρασία υβριδισμού για κάθε έναν από τους εκκινητές των γονιδίων. Επιπλέον, για την συγκεκριμένη αντίδραση χρησιμοποιούμε DreamTaq DNA Polymerase και το αντίστοιχο 10X DreamTaq Green Buffer το οποίο περιέχει 20 mM MgCl₂, οπότε δεν χρειάζεται να προσθέσουμε πρόσθετο MgCl₂ και αντ'αυτού προσθέτουμε την αντίστοιχη ποσότητα σε νερό. Έτσι, το πρωτόκολλο αναδιαμορφώνεται ως εξής:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες σε μl (για 1 αντίδραση)
Απιονισμένο νερό	19,3
10X DreamTaq Green Buffer (+ MgCl ₂)	2,5
DNTPs 5 mmol	0,5
MgCl ₂	-
Forward Primer	0,25
Reverse Primer	0,25
DreamTaq DNA Polymerase (500 U , 5 U/μL)	0,2
DNA	1.5
Συνολικός όγκος αντίδρασης	25

Πίνακας 4: Mastermix PCR για housekeeping γονίδια.

Το πρόγραμμα που ρυθμίσαμε στον κυκλοποιητή για την ενίσχυση των γονιδίων είναι το εξής (διαφέρει μόνο η Tm για το καθένα):

Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	5 min
Αποδιάταξη DNA (denaturation)	95 °C	30 sec
Υβριδισμός των εκκινητών (annealing)	56 °C (<i>recA</i>) 60 °C (<i>icd</i> , <i>adk</i> , <i>mdh</i> , <i>gyrB</i> , <i>purA</i>) 58 °C (<i>fumC</i>)	30 sec
Επιμήκυνση εκκινητών (DNA extension)	72 °C	1 min
Τελική επιμήκυνση DNA	72 °C	10 min

35
κύκλοι

Πίνακας 5: Συνθήκες PCR για housekeeping γονίδια.

Τα στάδια 2,3 και 4 επαναλαμβάνονται για 35 κύκλους.

➤ PCR για ανίχνευση γονιδίων CRISPR/Cas

Για την ανίχνευση γονιδίων των συστημάτων CRISPR/Cas χρησιμοποιήσαμε εκκινητές τόσο για τις διαφορετικές CRISPR συστοιχίες (CRISPR arrays), όσο και για γονίδια πρωτεϊνών που σχετίζονται με CRISPR (*cas*), με σκοπό να ταυτοποιήσουμε το σύστημα που φέρουν τα στελέχη *Escherichia coli* που μελετάμε. Πιο συγκεκριμένα, ανιχνεύσαμε γονίδια *cas1* και *cas2*, καθώς και συστοιχίες CRISPR1, CRISPR2, CRISPR3, CRISPR4 με σκοπό να ταυτοποιήσουμε συστήματα I-E και I-F που ξέρουμε ότι σχετίζονται με αυτές. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε είναι οι εξής:

Γενετικός τύπος	Εκκινητές	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων (5' – 3')	Βιβλιογραφία
<i>iap</i>	C1Fw	GTTATGCGGATAATGCTACC	Touchon, M et al. (2011)
<i>cas2</i>	C1Rev	CGTAYYCCGGTRGATTTGGA	Touchon, M et al. (2011)
<i>ygcE</i>	C2Fw	AAATCGTATGAAGTGATGCAT	Touchon, M et al. (2011)
<i>ygcF</i>	C2Rev	GTCGATGCAAACACATAAATA	Touchon, M et al. (2011)
<i>clpA</i>	C3Fw	GCGCTGGATAAAGAGAAAAAT	Touchon, M et al. (2011)
<i>cas1</i>	C3Rev	GCCCACCATTACCTGTA	Touchon, M et al. (2011)
<i>cys4</i>	C4Fw	CTGAACAGCGGACTGATTTA	Touchon, M et al. (2011)
<i>infA</i>	C4Rev	GTACGACCTGAGCAAAG	Touchon, M et al. (2011)
Cas1	Ec-Cas1-F	ATGTCTTCGAATTACCTTACG	-
	Ec-Cas1-R	TCATTGGTCAGCCTTAGCCA	-
Cas2	Ec-Cas2-F	ATGAGTATGGTGGTTGTGGTC	-
	Ec-Cas2-R	TTATTGATTTTCAACAGGAAGA	-

Πίνακας 6: εκκινητές για συστήματα CRISPR/Cas

Όσον αφορά την ενίσχυση των CRISPR συστοιχιών, χρησιμοποιούμε Platinum Taq DNA Polymerase και το αντίστοιχο 10x PCR Rnx buffer που δεν περιέχει $MgCl_2$ οπότε το προσθέτουμε επιπλέον. Οπότε τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες σε μl (για 1 αντίδραση)
Απιονισμένο νερό	18,3
10x PCR Rnx buffer (- $MgCl_2$)	2,5
DNTPs 5 mmol	0,5
50 mM $MgCl_2$	1,5
CRISPRFw Forward Primer	0,25
CRISPRRev Reverse Primer	0,25
Platinum Taq DNA Polymerase	0,2
DNA	1,5
Συνολικός όγκος αντίδρασης	25

Πίνακας 7: Mastermix PCR για CRISPR

Πιο συγκεκριμένα οι συνθήκες που χρησιμοποιήσαμε για το καθένα είναι οι εξής:

CRISPR συστοιχίες:

Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	5 min
Αποδιάταξη DNA (denaturation)	95 °C	30 sec
Υβριδισμός των εκκινητών (annealing)	56-58 °C	30 sec
Επιμήκυνση εκκινητών (DNA extension)	72 °C	2 min
Τελική επιμήκυνση DNA	72 °C	10 min

35
κύκλοι

Πίνακας 8: Συνθήκες PCR για CRISPR

cas:

Για τα γονίδια *cas* χρησιμοποιούμε DreamTaq DNA Polymerase και το αντίστοιχο buffer που περιέχει $MgCl_2$, οπότε δεν προστίθεται επιπλέον.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες σε μl (για 1 αντίδραση)
Απιονισμένο νερό	19,3
10X DreamTaq Green Buffer (+ MgCl_2)	2,5
DNTPs 5 mmol	0,5
MgCl_2	-
Cas Forward Primer	0,25
Cas Reverse Primer	0,25
DreamTaq DNA Polymerase (500 U, 5 U/ μL)	0,2
DNA	1.5
Συνολικός όγκος αντίδρασης	25

Πίνακας 9: Mastermix PCR για *cas*

Το πρόγραμμα που ρυθμίσαμε στον κυκλοποιητή για την ενίσχυση των γονιδίων είναι το εξής:

Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	5 min
Αποδιάταξη DNA (denaturation)	95 °C	30 sec
Υβριδισμός των εκκινητών (annealing)	56-58 °C	30 sec
Επιμήκυνση εκκινητών (DNA extension)	72 °C	1 min
Τελική επιμήκυνση DNA	72 °C	10 min

35
κύκλοι

Πίνακας 10: Συνθήκες PCR για *cas*

- PCR για ανίχνευση γονιδίων που κωδικοποιούν β-λακταμάσες CTX-M-1, CTX-M-9

Οι β-λακταμάσες είναι αυτές που προσδίδουν την ικανότητα αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε για τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις συγκεκριμένες β-λακταμάσες είναι οι εξής:

Εκκινητές	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων (5' – 3')
CTXM1F	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA
CTXM1R	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT
CTXM9F	TCAAGCCTGCCGATCTGGT
CTXM9R	TGATTCTCGCCGCTGAAG

Πίνακας 11: Εκκινητές για β-λακταμάσες CTX-M-1, CTX-M-9

Για τα γονίδια β-λακταμασών χρησιμοποιήσαμε DreamTaq πολυμεράση και το αντίστοιχο 10X DreamTaq Green Buffer. Τα αντιδραστήρια και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες σε μl (για 1 αντίδραση)
Απιονισμένο νερό	19,3
10X DreamTaq Green Buffer (+ MgCl ₂)	2.5
DNTPs 5 mmol	0,5
MgCl ₂	-
CTXM Forward Primer	0,25
CTXM Reverse Primer	0,25
DreamTaq DNA Polymerase (500 U , 5 U/μL)	0,2
DNA	1.5
Συνολικός όγκος αντίδρασης	25

Πίνακας 12: Mastermix PCR για CTX-M

Το πρόγραμμα που ρυθμίσαμε στον κυκλοποιητή για την ενίσχυση των γονιδίων είναι το εξής:

Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	5 min
Αποδιάταξη DNA (denaturation)	95 °C	1 min
Υβριδισμός των εκκινητών (annealing)	58 °C	1 min
Επιμήκυνση εκκινητών (DNA extension)	72 °C	1 min
Τελική επιμήκυνση DNA	72 °C	5 min

35
κύκλοι

Πίνακας 13: Συνθήκες PCR για CTX-M

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Έπειτα από κάθε PCR πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης ώστε να ελέγξουμε την ύπαρξη των αναμενόμενων προϊόντων. Τα βήματα της ηλεκτροφόρησης είναι τα εξής:

- 1) Τοποθετούμε σε 50ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE (X10), 0,75gr αγαρόζης σε σκόνη, για τη δημιουργία πηκτής 1,5% αγαρόζης.
- 2) Θέρμανση του διαλύματος για 2min σε μικροκύματα.
- 3) Προσθήκη 5μl βρωμιούχου αιθιδίου.
- 4) Πήξη του τζελ.
- 5) Χρησιμοποιούμε ως ladder το Invitrogen™ 100bp DNA Ladder.
- 6) Για προϊόντα PCR στα οποία δεν είχε γίνει προσθήκη του DreamTaq Green Buffer το οποίο περιέχει χρώμα, προσθέτουμε επιπλέον 1,5μl 6X DNA Gel Loading Dye.
- 7) Πραγματοποιούμε ηλεκτροφόρηση για 30min στα 100Volt.
- 8) Βλέπουμε τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης με χρήση UV ακτινοβολίας.

Καθαρισμός προϊόντων PCR

Τα προϊόντα που ήταν θετικά στην ηλεκτροφόρηση καθαρίστηκαν με τη χρήση του kit Invitrogen PureLink™ Quick PCR Purification, με σκοπό την απομόνωση του DNA από άλλες ουσίες που εμπεριέχονται στο mastermix ή ακόμα και από διμερή εκκινητών που σχηματίστηκαν κατά την PCR. Από το συγκεκριμένο kit χρησιμοποιούμε τα διαλύματα B2 (Binding buffer) και W1 (Wash buffer) και E1 (Elution buffer). Στο B2 προσθέτουμε 10ml ισοπροπανόλης και στο W1 64ml αιθανόλης, πριν χρησιμοποιηθούν. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- 1) Προσθέτουμε το B2 διάλυμα στα προϊόντα της PCR σε αναλογία 4:1 και αναδεύουμε. Επειδή η ποσότητα των προϊόντων είναι ίση με 20μl προσθέτουμε 80μl από το B2.
- 2) Τοποθετούμε το δείγμα στην στήλη απομόνωσης (spin column) η οποία βρίσκεται μέσα σε έναν σωλήνα συλλογής (collection tube).
- 3) Πραγματοποιούμε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 12.000 στροφές και στο τέλος πετάμε το υγρό που έχει μείνει στον σωλήνα συλλογής.
- 4) Προσθέτουμε 650μl από το W1 διάλυμα στην στήλη και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις 12.000 στροφές. Έπειτα, απορρίπτουμε το υγρό που έμεινε στον σωλήνα.
- 5) Φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά στις 12.000 στροφές και στη συνέχεια τοποθετούμε τη στήλη σε αποστειρωμένους σωλήνες έκλουσης.
- 6) Προσθέτουμε 30μl από το διάλυμα E1 και αφήνουμε για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- 7) Φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στις 12.000 στροφές και στο τέλος πετάμε τη στήλη και κρατάμε τον σωλήνα έκλουσης στον οποίο περιέχεται το καθαρισμένο DNA. Αποθηκεύουμε στο ψυγείο στους 4°C αν πρόκειται για άμεση χρήση ή στην κατάψυξη στους -20 °C αν πρόκειται για μακροπρόθεσμη χρήση.
- 8) Πραγματοποιούμε ηλεκτροφόρηση ώστε να ελέγξουμε ότι τα δείγματα έχουν καθαριστεί.

Αλληλούχηση Sanger

Η αλληλούχηση Sanger αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους αλληλούχησης, η οποία αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τον Frederick Sanger το 1977 και αποτελεί πλέον τη βάση για νεότερες και πιο αυτοματοποιημένες προσεγγίσεις. Στην μέθοδο αυτή ένας ολιγονουκλεοτιδικός εκκινητής υβριδίζει στο ενισχυμένο DNA και στη συνέχεια επεκτείνεται από το ένζυμο της DNA πολυμεράσης που ενσωματώνει ένα μείγμα των 4 τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP, dTTP) αλλά και τριφωσφορικά διδεοξυνουκλεοτίδια που τερματίζουν την αλυσίδα (ddNTPs: ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP). Η αντίδραση αυτή παράγει ένα μείγμα θραυσμάτων διαφορετικού μήκους, τα οποία διαχωρίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης, δίνοντας την αλληλουχία του DNA. Η τρέχουσα αυτοματοποιημένη μέθοδος αλληλούχησης Sanger υποστηρίζει γενικά τη δημιουργία αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων έως 800–1.000 bp (Crossley B. et al, 2020).

Αφού καθαρίσουμε τα προϊόντα της PCR, τα προετοιμάζουμε για αλληλούχηση. Αρχικά πραγματοποιούμε αραίωση των εκκινητών που χρησιμοποιήσαμε σε κάθε PCR με απιονισμένο νερό 1:20. Στη συνέχεια,

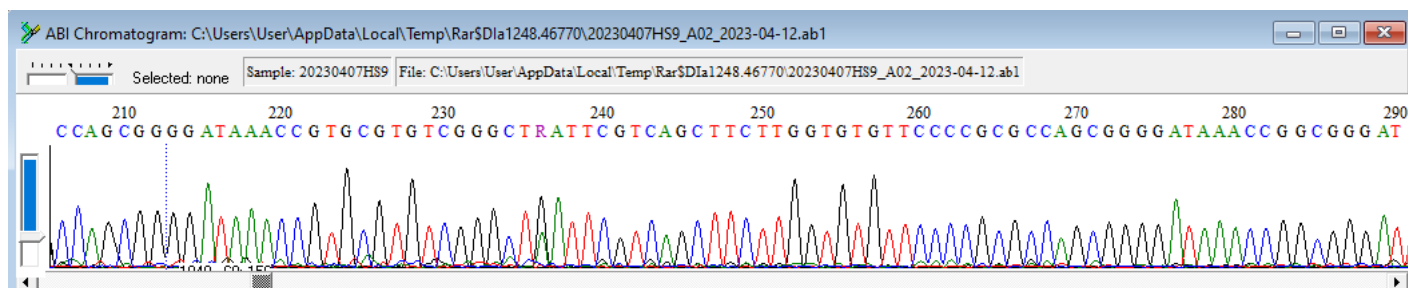
χρησιμοποιώντας ειδικά πιάτα 96 θέσεων, τοποθετούμε 9,5μl από κάθε δείγμα σε 2 διαφορετικές θέσεις και έπειτα προσθέτουμε 2,5μl από τον αραιωμένο Forward εκκινητή στη μία θέση και 2,5μl από τον αραιωμένο Reverse εκκινητή στην άλλη θέση. Ο τελικός όγκος σε κάθε θέση είναι 12μl. Τέλος στέλνουμε το πιάτο για αλληλούχηση στην εταιρεία CeMIA SA.

Βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Για την διεξαγωγή των αποτελεσμάτων είναι απαραίτητη η χρήση διάφορων βιοπληροφορικών συστημάτων και βάσεων δεδομένων.

➤ Πρόγραμμα BioEdit

Το BioEdit είναι ένας επεξεργαστής βιολογικών ακολουθιών που χρησιμοποιούμε για την επεξεργασία των δεδομένων της αλληλούχησης. Μέσω του προγράμματος αυτού μπορούμε να ανοίξουμε και να μελετήσουμε τα αρχεία των αποτελεσμάτων που στέλνονται από την εταιρεία CeMIA SA, βλέποντας τις κορυφές (peaks) των νουκλεοτιδίων σε ένα χρωματογράφημα (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Απεικόνιση χρωματογραφήματος αλληλούχησης στο πρόγραμμα BioEdit

Το πρόγραμμα παρέχει πολλές δυνατότητες επεξεργασίας της αλληλουχίας, καθώς επίσης μας δίνει την ικανότητα να δούμε τις αλληλοεπικαλύψεις των κορυφών που υπάρχουν και να προβούμε σε διορθώσεις.

➤ PubMLST

Το pubMLST είναι μια συλλογή από βάσεις δεδομένων ανοιχτής πρόσβασης, που περιέχουν δεδομένα αλληλουχιών με πληροφορίες για πάνω από 1000 διαφορετικά είδη μικροοργανισμών. Επιπλέον, μας δίνει την δυνατότητα άμα τοποθετήσουμε την επιθυμητή αλληλουχία να βρούμε τον αριθμό του αλληλομόρφου για κάθε housekeeping γονίδιο αλλά και να προσδιορίσουμε τον τύπο αλληλουχίας (sequence type-ST) του κάθε στελέχους. Η διαδικασία που ακολουθούμε είναι η εξής:

- 1) Μπαίνουμε στην ιστοσελίδα <https://pubmlst.org/> και επιλέγουμε τον οργανισμό που μας ενδιαφέρει, δηλαδή *Escherichia coli spp.* και επιλέγουμε typing single sequence.
- 2) Βάζουμε την αλληλουχία που μας ενδιαφέρει, την οποία έχουμε πάρει από το πρόγραμμα BioEdit και πατάμε υποβολή.
- 3) Έπειτα, μας εμφανίζει το γονίδιο που έχουμε ενισχύσει και τον αριθμό του συγκεκριμένου αλληλομόρφου.

- 4) Στη συνέχεια μέσω του MLST allelic profile, τοποθετούμε τον αριθμό των αλληλομόρφων που βρήκαμε από τα housekeeping γονίδια και βρίσκουμε τον τύπο της αλληλουχίας του στελέχους, άρα σε ποιον κλώνο ανήκει.

➤ CRISPR-Cas Finder

Το CRISPR-Cas Finder επιτρέπει την ανίχνευση συστοιχιών CRISPR (direct repeats & spacers) και *cas* γονιδίων. Για να ελέγξουμε ποιες επαναλήψεις και ποιοι διαχωριστές υπάρχουν σε κάθε συστοιχία ακολουθούμε τα εξής βήματα:

- 1) Μπαίνουμε στην ιστοσελίδα <https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder/Index> και επιλέγουμε στο Choose input method το Paste your sequence, βάζοντας την αλληλουχία μας και πριν από αυτήν ένα όνομα (πχ.>Crispr1).
- 2) Στην επιλογή Size of Flanking regions in base pairs (bp) for each analyzed CRISPR array βάζουμε 10 και έπειτα πατάμε Run CRISPRCasFINDER.
- 3) Το πρόγραμμα μας εμφανίζει ποια είναι η επαναλαμβανόμενη ακολουθία και ποια spacers εμπεριέχονται ανάμεσα σε αυτές τις επαναλήψεις.
- 4) Έπειτα, μέσω του Blast ελέγχουμε την προέλευση αυτών των διαχωριστών.

➤ Blast

Το Blast είναι ένα εργαλείο αναζήτησης που βρίσκει περιοχές ομοιότητας μεταξύ βιολογικών αλληλουχιών, συγκρίνοντας τις με βάσεις δεδομένων αλληλουχιών. Στο Blast μπορούμε να αντιστοιχίσουμε κάποια αλληλουχία με κάποια καταχωρημένη αλληλουχία στις βάσεις δεδομένων ή και να συγκρίνουμε δύο αλληλουχίες μεταξύ τους. Για να ταυτοποιήσουμε κάποια αλληλουχία και να την αντιστοιχίσουμε με κάποια ήδη καταχωρημένη αλληλουχία στις βάσεις δεδομένων ακολουθούμε τα εξής βήματα:

- 1) Μπαίνουμε στην ιστοσελίδα <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> και επιλέγουμε nucleotide BLAST.
- 2) Βάζουμε την αλληλουχία που μας ενδιαφέρει την οποία έχουμε πάρει από το πρόγραμμα BioEdit και αφήνουμε τις παραμέτρους όπως έχουν (Standard databases-Nucleotide collection & Highly similar sequences), πατώντας BLAST.
- 3) Το πρόγραμμα, μας βγάζει αλληλουχίες οι οποίες είναι έως ένα ποσοστό όμοιες με την δική μας, δίνοντας μας πληροφορίες για το στέλεχος στο οποίο βρίσκονται και σε ποιο μέρος του γονιδιώματος εμφανίζονται. Με βάση αυτά τα δεδομένα και λαμβάνοντας υπόψιν το ποσοστό κάλυψης (query coverage), το e-value και το ποσοστό ταυτοποίησης (percentage of identity) μπορούμε να αξιολογήσουμε την ομοιότητα των δύο αλληλουχιών.

Την διαδικασία αυτήν την ακολουθούμε κυρίως για να ελέγξουμε τις αλληλουχίες των housekeeping γονιδίων αλλά και την προέλευση των spacers από τις αλληλουχίες CRISPR που βρήκαμε.

Για να συγκρίνουμε δύο αλληλουχίες μεταξύ τους ακολουθούμε τα εξής βήματα:

- 1) Μπαίνουμε στην ιστοσελίδα <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> και επιλέγουμε nucleotide BLAST.

- 2) Επιλέγουμε την επιλογή Align two or more sequences και βάζουμε τις αλληλουχίες μας στα πλαίσια.
- 3) Διατηρούμε τις παραμέτρους και πατάμε BLAST.
- 4) Το πρόγραμμα μας βγάζει το ποσοστό ταύτισης των δύο αλληλουχιών.

Την διαδικασία αυτήν την ακολουθούμε για να συγκρίνουμε κυρίως τις αλληλουχίες που έχουν προκύψει από τον Forward και τον Reverse εκκινητή αλλά και για την σύγκριση μιας αλληλουχίας μας με την αλληλουχία του αλληλομόρφου που μας έχει βγάλει το pubMLST.

Αποτελέσματα

Από τα 98 κλινικά δείγματα του ΠΓΝΛ που μελετήσαμε, 45 (45%) προέρχονταν από το Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών (Τ.Ε.Π.), 13 (13%) από παθολογικές κλινικές, 5 (5%) από ουρολογικές κλινικές, 4 (4%) από πνευμονολογικές κλινικές, 3 (3%) από νευρολογικές κλινικές και τα υπόλοιπα 28 (28%) από λοιπές κλινικές. Επιπλέον, 65 (65%) από αυτά προέρχονταν από ούρα, 29 (29%) από αίμα, 3 (3%) από πύον και 1 (1%) από πτύελα (Πίνακας 14).

Κλινική	Αριθμός στελεχών	Είδος δείγματος	Αριθμός στελεχών
Τ.Ε.Π.	45 (45%)	Ούρο	65 (65%)
Παθολογικές	13 (13%)	Αίμα	29 (29%)
Ουρολογικές	5 (5%)	Πύον	3 (3%)
Πνευμονολογικές	4 (4%)	Πτύελα	1 (1%)
Νευρολογικές	3 (3%)		
Λοιπές κλινικές	28 (28%)		

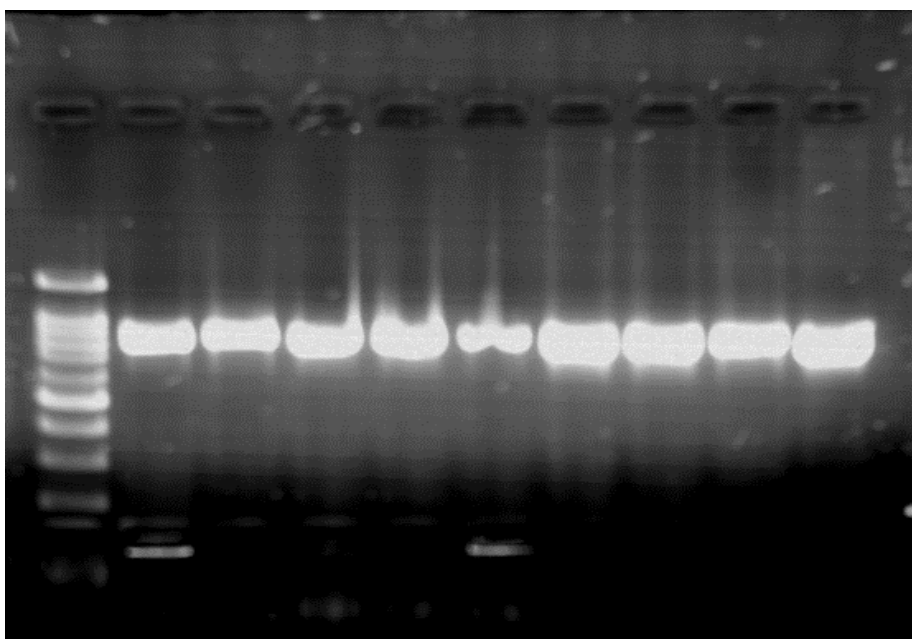
Πίνακας 14: Κατανομή στελεχών *E. coli* ανά κλινική και ανά είδος δείγματος.

Έλεγχος παρουσίας γονιδίων που κωδικοποιούν για τις β-λακταμάσες CTX-M-1 & CTX-M-9 στα στελέχη *E. coli*

Όπως ήδη αναφέραμε οι β-λακταμάσες είναι αυτές που προσδίδουν την αντοχή σε β-λακταμικά αντιβιοτικά. Από τα 98 κλινικά δείγματα, τα 20 (20%) βρέθηκαν θετικά σε *bla*_{CTX-M-1} και *bla*_{CTX-M-9} ταυτόχρονα, τα 46 (46%) βρέθηκαν θετικά σε ένα από τα δύο γονίδια (πιο συγκεκριμένα 30 σε *bla*_{CTX-M-1} και 16 σε *bla*_{CTX-M-9}) και τα υπόλοιπα 32 (32%) δεν βρέθηκαν να έχουν κανένα από τα δύο γονίδια. Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε και έλεγχος της ανθεκτικότητας των στελεχών ως προς το β-λακταμικό αντιβιοτικό κεφταζιδίμη. Από τα στελέχη που δεν παρουσίασαν γονίδιο ανθεκτικότητας για β-λακταμάσες (*bla*_{CTX-M-1} είτε *bla*_{CTX-M-9}) τα 28 (87.5%) ήταν ευαίσθητα σε κεφταζιδίμη, ενώ τα 4 (12.5%) εμφάνισαν ανθεκτικότητα. Αντίστοιχα, από αυτά που βρέθηκαν θετικά σε γονίδια β-λακταμασών, τα 46 (70%) ήταν ευαίσθητα και τα 20 (30%) ανθεκτικά στην κεφταζιδίμη.

Τυποποίηση στελεχών με MLST

Μέσω του προγράμματος PubMLST που αναφέρθηκε παραπάνω έγινε η τυποποίηση στελεχών *E. coli*. Αφού αλληλουχήθηκαν τα προϊόντα της PCR των housekeeping γονιδίων (Εικόνα 14), βρήκαμε τον αριθμό του κάθε αλληλομόρφου για αυτά και τα τοποθετήσαμε στο σύνδεσμο https://pubmlst.org/bigdb?db=pubmlst_escherichia_seqdef&page=profiles με σκοπό να βρούμε τον τύπο της αλληλουχίας, δηλαδή τον κλώνο στον οποίο ανήκουν. Τα αποτελέσματα που πήραμε συνοψίζονται στον πίνακα 15.



Εικόνα 14: Προϊόντα PCR housekeeping γονιδίων

ST	Αριθμός στελεχών	Παρουσία γονιδίων β-λακταμασών (CTXM1, CTXM9)
ST95	6	4
ST131	53	43
ST501	6	3
ST922	9	4
ST1011	3	2
ST2371	2	2
ST4888	2	2
ST5328	1	-
ST8363	6	4
ST9612	10	2

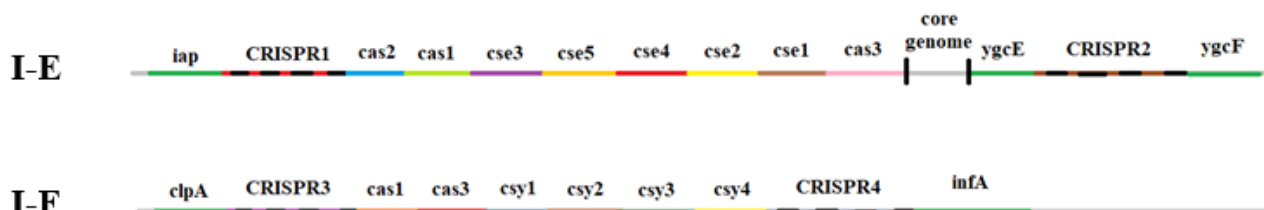
Πίνακας 15: Αποτελέσματα της τυποποίησης στελεχών μέσω MLST.

Όπως φαίνεται και από τα παραπάνω αποτελέσματα βρέθηκαν 10 διαφορετικοί κλώνοι με τα περισσότερα στελέχη να ανήκουν στο ST131 (53%) και τα υπόλοιπα στελέχη να ανήκουν στους κλώνους ST9612 (10%), ST922 (9%), ST95 (6%), ST501 (6%), ST8363 (6%), ST1011 (3%), ST2371 (2%), ST4888 (2%) και ST5328 (1%).

Έλεγχος της παρουσίας CRISPR/Cas συστημάτων στα στελέχη *E. coli*

Από τα 98 στελέχη *E. coli* θετικά για CRISPR/Cas συστήματα βγήκαν τα 15 (15%). Σε αυτά τα στελέχη βρέθηκαν τόσο συστήματα τύπου I-E όσο και I-F και πιο συγκεκριμένα 8 (8%) στελέχη βγήκαν θετικά για I-E [ST922(n=1), ST9612(n=1), ST131(n=3), ST1011 (n=1), ST8363 (n=1), ST501 (n=1)] και 7 (7%) για I-F [ST4888(n=1), ST5328(n=1), ST95(n=4), ST2371(n=1)]. Επιπλέον, 7 από τα 8

στελέχη του συστήματος I-E και 5 από τα 7 στελέχη του συστήματος I-F ήταν θετικά για τουλάχιστον ένα γονίδιο β-λακταμάσης (Πίνακας 16). Είναι γνωστό με βάση τη βιβλιογραφία (Toro et al, 2013 & Touchon et al, 2011), ότι οι CRISPR1 και CRISPR2 συστοιχίες συνδέονται άμεσα με την παρουσία του γονιδίου *cas2* σχηματίζοντας τον υπότυπο I-E, όπως και η παρουσία των CRISPR3 και CRISPR4 συστοιχιών σχετίζεται με την παρουσία του γονιδίου *cas1* σχηματίζοντας τον υπότυπο I-F (Εικόνα 15) (Touchon et al, 2011).



Εικόνα 15: Συστήματα I-E και I-F

Ωστόσο, 3 στελέχη (3%) βρέθηκαν θετικά σε CRISPR συστοιχίες και *cas* γονίδια με συνδυασμό διαφορετικό από αυτόν που εμφανίζεται στους υποτύπους I-E και I-F (ένα στέλεχος βρέθηκε θετικό για *cas1* και CRISPR1-2 και δύο στελέχη βρέθηκαν θετικά για *cas2* ενώ εμφάνιζαν συστοιχίες CRISPR3-4). Ακόμη, 8 στελέχη (8%) εμφάνισαν CRISPR συστοιχίες, χωρίς να είναι θετικά για *cas* γονίδια. Τα υπόλοιπα 72 (72%) στελέχη βρέθηκαν αρνητικά για CRISPR/Cas συστήματα και σε αυτά τα 20 δεν εμφάνισαν γονίδια ανθεκτικότητας για β-λακταμάσες ενώ τα 52 είχαν τέτοια γονίδια ανθεκτικότητας.

CRISPR/Cas συστήματα	Αριθμός στελεχών	STs	Παρουσία γονιδίων β-λακταμασών (CTXM1, CTXM9)	Ανθεκτικότητα σε κεφαζιδίμη
I-E	8	ST922, ST9612, ST131, ST1011, ST8363, ST501	7	4
I-F	7	ST4888, ST5328, ST95, ST2371	5	-

Πίνακας 16: Ταξινόμηση των CRISPR/Cas συστημάτων σε *E. coli*

Ανάλυση των CRISPR συστοιχιών

Μέσω των προγραμμάτων BioEdit και CRISPR-Cas Finder που αναφέρθηκαν παραπάνω, αναλύσαμε τις αλληλουχίες των συστοιχιών CRISPR που λάβαμε από την αλληλούχηση. Κάποιες από αυτές τις Forward και Reverse αλληλουχίες που πήραμε χρειάστηκε να συγκριθούν και να επιδιορθωθούν, παρατηρώντας τις κορυφές του χρωματογραφήματος της αλληλούχησης, με σκοπό να δώσουν το επιθυμητό αποτέλεσμα. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε και το πρόγραμμα Blastn, το οποίο επίσης μας έδωσε πληροφορίες για την προέλευση των spacers που βρίσκονται στις συστοιχίες CRISPR που αναλύσαμε.

Συνολικά στις συστοιχίες CRISPR που μελετήσαμε, βρέθηκαν 152 διαφορετικά spacers (96 σε CRISPR1-CRISPR2 συστοιχίες και 56 σε CRISPR3-CRISPR4 συστοιχίες) εκ των οποίων τα 114 (75%) ταίριαζαν με χρωμοσωμικές αλληλουχίες του *E. coli* ή ήδη χαρακτηρισμένες CRISPR συστοιχίες του και 25 (16.5%) spacers δεν εμφάνισαν κάποια ομοιότητα με αλληλουχίες που υπάρχουν στις βάσεις δεδομένων, άρα δεν έχουν χαρακτηριστεί ακόμα. Επιπλέον, 13 (8.5%) spacers βρέθηκαν να ταυριάζουν με αλληλουχίες πλασμιδίων, εκ των οποίων 3 από αυτά ταίριαζαν παράλληλα και με αλληλουχίες φάγων. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκαν να ταυριάζουν με πλασμίδια όπως το p28Eco12 (GenBank accession no. CP038506.1), pSvP1_F (GenBank accession no. MN510446.1), pSCLS1 (GenBank accession no. CP123964.1), p24C171-1 (GenBank accession no. LC501671.1), pB27_2 DNA (GenBank accession no. AP027426.1), pUSDA5905_1 (GenBank accession no. CP039843.1), pAVS0973-C (GenBank accession no. CP124474.1), pLAO87 (GenBank accession no. OP242295.1), pOXA-484_IncF (GenBank accession no. OP594535.1), pLAO63 (GenBank accession no. OP242283.1), pAVS0282-A (GenBank accession no. CP124516.1), που έχουν χαρακτηριστεί ήδη σε *E. coli* αλλά και με φάγους όπως απομονώσεις βακτηριοφάγων Sp. isolate 2015_6367 (GenBank accession no. OP076414.1), isolate 3121_76502 (GenBank accession no. OP075223.1), isolate 3509_17389, (GenBank accession no. OP075566.1) και με τον φάγο vB_EcoM-813R1 (GenBank accession no. ON470617) που έχει χαρακτηριστεί σε *E. coli*. Πολλές από αυτές τις αλληλουχίες πλασμιδίων και φάγων βρέθηκε να κωδικοποιούν και πιθανές πρωτεΐνες πρόσδεσης στο DNA, ελικάσες, N-6 DNA μεθυλάσες, SNF2 πρωτεΐνες, πρωτεΐνες για άμυνα έναντι περιοριστικών πρωτεϊνών A, DNA μεθυλοτρανσφεράσες κυτοσίνης, αντιπεριοριστικές πρωτεΐνες, RepB, RepFIB και πρωτεΐνες με δράση αναστολέα SOS του συστήματος σύζευξης (πίνακες 17 και 18). Ωστόσο, κανένα spacer δεν βρέθηκε να σχετίζεται με γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.

spacers	origin
ACATGAATGTCGGTTCAGACCGTGTTTTTACC	plasmid (DNA-binding protein CP099272.1)
GCTGGTGGCGCGGGCAAACGGAACAATCCCGC	plasmid (helicase CP038506.1) (N-6 DNA methylase CP122822.1) (DarB)

	MN510446.1) Bacteriophage (SNF2 family OP076414.1) Escherichia phage (defense against restriction protein A ON470617)
CTGTTGGCAAGCCAGGATCTGAACAATACCGT	plasmid (hypothetical protein CP123964.1) Bacteriophage (hypothetical protein OP075223.1)
TTTTTGTTAATTGCGTTTGCCACGGTTTGCAA	plasmid LC501671.1
TTTTGCTGACMCCGGCAATACTGAACGGCTGG	plasmid (DNA cytosine methyltransferase CP122665.1)
CAAAGGACACCGGGAGGCACCCGGCACCGCAG	plasmid CP039843.1, Bacteriophage (hypothetical protein OP075566.1), Escherichia phage ON470617.1
CAAGTGATgTCCATCATCGCATCCAGTGCGTC	plasmid CP089250.1
ACATGAATGTCGGTTCAGACCGTGTTTTTACC	plasmid (DNA binding protein CP074369.1)
TTACTCGCCGGGGAATACGCCCCGCGCCACGC	plasmid OL790696.1
TGCCTCGGCGGCGGCTCTGCGCAACCGCGAAA	chromosome
GTAAACCGTGATGATCAGCAAAAGCTATTTC	chromosome
GTCAATAGGCGGCGTCCCGTAGCCGTCCCTT	chromosome
TTGAAATGGTCCAGCACTGCGACCGTCGGCCC	chromosome
ACCAAGAAGCTGACGAATCAGCCCGACACGCA	chromosome
CCAGTTTCATATGAGCCGCCGCGCTGGATCAT	chromosome
TCGTCGGCGTCTTCACCCGTGCGATAACGCTG	chromosome
TGCCAGCGTGTGCGCGTGCGTTTCGCGCTGCC	chromosome
GTTGCTGCTGCGTTCGATATTATTTATACCC	chromosome
TCGATCGATAGCTGCGCGATACCTGCGGGGAT	chromosome
CTGGCCCGTGCCCTGTATTTTTTCGTCGTTACT	chromosome
CGCGGCAATTATTTCAGACCGCTGCACGGAATG	chromosome

GGACTCGCCGCAGGTGAGGAAAACGCAATAAC	chromosome
AATTTCTTCAGCCAACTTTTTTCGGACCGTCA	chromosome
ATAATTGATCGTGATTATCACGTTAGTGCCGC	chromosome
CAATTTGGCAATCGGGGCGACTATCTTTGGAT	chromosome
ACATGAATGTCGGCTCAGACCGTGTTTTTACC	chromosome
TTTTTCGCGCTGTTTCGCCCCGAGCTGTAGCG	chromosome
GTTTCATTCAGGTCTTTAATAACCCAATAGCC	chromosome
GCGGGCTGTTTCGCAGAGCTGGCGCGGCATGG	chromosome
CCTTCGGAGGGTCAGCAGGGAAAACTGAGTC	chromosome
TCTTACTGCTTGGTATGCGGAATCACACCCTGAA	chromosome
ACAATTGCGGATGCTCCCGGAATTGCGCGGGCAA	chromosome
TGAGCGTCGGCGGGCTCGCTGGATTTGCGCGG	chromosome
AATGCATCAGTTGAACACAAAAGTASCTTTTC	chromosome
ACGGATTGCGGTATATGCAGTGTCCAGATTCT	chromosome
TAAACCACCAGCCAGACCACCAATTACCACAC	chromosome
GGGGATAACGGTTATCCACTGGCCGCCGATCT	chromosome
TGTAATAGCCTGATCTCTGATCTCCCTCGCCT	chromosome
CTGTCCCAGGCCGAGGCTGTATTTCAATCCTG	chromosome
GCGATGGATCAGGGTATTACACTCGACGGCGG	chromosome
GCTGCGGGTCAATCAACTGGAGTGCAAATCCC	chromosome
GTCGCGCGCCGACGGAATAAACCGAATAAATT	chromosome
TCGTCAGGGCACAATAACTGAGGTTGCGACAA	chromosome
GTGCTGCTGCGTaCGATATTATTTATACCC	chromosome
GTTATTGCTGCCTCCGTACCTGTCCGATCGG	chromosome
CGCCCGTTTGAACAAAAACGGGTATCTAACTG	chromosome
TTCTCGTTACTGGCGACCAGTCGAGGGCGCTGG	chromosome
GGCAGCTATCGAGGCAGTTATCGAGCGTCGCG	chromosome
GGTGAGAATCTGAATTATTAATTCCAGTTCGT	chromosome
acCAGACCTGAAGTCAACTTATCCATTGTCGA	chromosome
acATATTCAACTGATGGCGTAACTTTGTTATC	chromosome
YTCATAAGCCCGGCATCAGTAGCAGCCGCGGAC	chromosome
CTCATGTAAAYGAATATTAAGCTWWACACAKAGTCCC	chromosome
MTCCSGTCAGGGGARCAAGCATAACAAYYCCGWRCC	chromosome
CTCAAAACCACCGGACCTGACCATTWGAAAYGAKC	chromosome
CTCCCCACGCATTGTAMTMYGKRCAGGYGTAACC	chromosome
CTMTCCGGRCCATCCATACACMTTCTTAACCCGGC	chromosome
AGATATCTGTTCCGGCTTCCAGCGTTTTGTG	chromosome
CGAAATTGCCGACAGTAATAAAATGGAATTTT	chromosome
CCGCATTACGCCGGGATAGTTCGCGAAAAATC	chromosome
TACCGCGAGCAACAAACGGCACGCCCGGATCG	chromosome
GCTGGATACCGATCAATTCAATATCGTTTTAC	chromosome
GAATACCGATTCTWTAACGGCGGAAATGTGGAT	chromosome
ACGAAAAACAGGCTGCAAGTCTCGCTGACCAA	chromosome
CCGGTTAATTTGTTGTACCCGTCGCGCGGTGG	chromosome
ATCGCCTCAGCATTTTTTTTACGCTCAGGGTG	chromosome
GTTAATGATGTCAGTGGCGGTTTTTCGTATCGC	chromosome
AGTGAGGCAATCWWATGACCCGCCCGCAATTA	chromosome
TAAATCCCTCGCGCATCGAGTCAWATGTCRGA	chromosome

GTCGCTGGAACGGGGCGAATAAAGAGGGCTC	chromosome
GGCGTGCCAACGGAATGCWCCCTCATTGGTGAT	chromosome
TGTGTTTGCGGCATTAACGCTCACCAGCATTTC	chromosome
GAATAGCAATAGTCCATAGATTTGCGAAAACAG	chromosome
GGAGCCTGACGAGACTACTGAGGCCGTTCTGTC	chromosome
ATATCCGGTTTTTGCTGGTGGGCGCGCCGTT	chromosome
TAATCCGATATCAGTGGGCGCCGCTTTACTGA	chromosome
ACACCGCAAGGCCTGACGAGAAATCGCCAGGC	chromosome
ATCGGGGTATTTCAGTTTCGATGCGGGATTGTAC	chromosome
TCCGGTACGCGCGGGATCGAATCCGGCCCCAGAC	chromosome
GAGCCCTGCCAGAATGGGGCCTCTTTTGTACC	chromosome
CAGATGACCCGCGTTGTTACGAACAACTCAA	chromosome
TGGTGATCCCGCAATCCACGACAAAATACTGG	chromosome
GGGGCCGCGGTGTTACATTTGCCTAATTTCC	chromosome
GATCGCCTGCTCCAGCGTCACTCCCTGCCCT	chromosome
MTCAGCCRGATKCYRATMGATACCSCGCATCACCS	No significant similarity found
CTCACCATCACCAGGCACTACCGGCACKGGYTGCT	No significant similarity found
TATTGCCCGGTACTCTCGCCATCATTTTGGGT	No significant similarity found
GCTATTCTCCTTCCAGTGCTTTTCTACGCTCC	No significant similarity found
TGCAATGGTCCSCGTGAAAACTTTGCACC	No significant similarity found
YTTTCATCMWGAGSACGGGMGACCAGACAAGTT	No significant similarity found
YTCWGTTGCAGCGGMGCACCGCWGACGGASTCKCC	No significant similarity found
MTCCGGAAGTGTCCAGCGTTCACCGGYGGCGGAT	No significant similarity found
CTCKTTGCGCTCRCCGTCGCCAGMATTTTMCAGTA	No significant similarity found
YTCWGTTGCAGCGGMGCACCGCWGACGGASTCKCC	No significant similarity found
MTCCGGAAGTGTCCAGCGTTCACCGGYGGCGGAT	No significant similarity found
TTGGTTGTTTCGGcgTTTTGAAGTGTTYTTAMa	No significant similarity found
tGtccatGGgaaGCgccGCGcaCTGtCCaGg	No significant similarity found
CYCCRCTTCKCWCGAKYACCMRMWCYWWATYC	No significant similarity found
GTCAACGATTTTGCTCCCKTAACCGTCCCCCKT	No significant similarity found

Πίνακας 17: Αλληλουχία spacers και προέλευση τους στις CRISPR1-2 συστοιχίες (I-E συστήματα).

spacers	origin
CTGAACGTTGAAGAGTGCGACCGTCTCTCCTT	plasmid (antirestriction protein CP098942.1)
TGATGGCGCAGCAGTCCTCCCTCCTGCCGCCA	plasmid CP124474.1
TGTGGCGCTGATGCGTCTGGGCGTCTTTGTAC	plasmid (RepB family plasmid replication initiator CP098932.1)(RepFIB replication protein A OP242295.1)
CAGAACAACCTATCACTTCGGAGGGAGCACGCTG	plasmid (conjugation system SOS inhibitor PsiB CP099004.1)
TACACAACAGGCCGAATATTTTAACGGCGAAAC	CRISPR3 repeat region JF495952.1
GGTAGGACTCGTTGCGCCAGCGCTTGTATTCG	CRISPR4 repeat region JF495988.1
GTCAAATAACAAAGCCCACTTACCGGGGGCGC	CRISPR4 repeat region JF495988.1
GGTTGCAACCGCCGGCGCGCCCAACCGCCCTC	CRISPR4 repeat region JF495977.1
AACACGCTGGACTCGTACCGGCTCAACTACTA	CRISPR4 repeat region JF495988.1
GGTACTGCGGTTTCTGTTGTTGCTGGCTCAGC	chromosome
GTAAACCGTTTCACACTTAACACTATGAACCG	chromosome
AGCAGCGGTGGCGAACC GCGCGTTGTTGATTT	chromosome
AGAACTCGAAATTTATCGCGGGACTTTTCAGC	chromosome
AGGCTGCTGGCGCTCTCGTTGTTAACGGCAGC	chromosome
GTTCCACGCGGATATCTGTAATTTCCAGCAAA	chromosome
AACACCATAATAAGATTCGCCGTTTATAGTAAGTT	chromosome
GCTAGGGGATGGATGTTTGAGATACGAGCAA	chromosome
AATGCGGCCAGCATAYTGCGCTGCTCGATCG	chromosome
ATGACAAAACCTGATATCTGACTCCAGATATTC	chromosome
GGTAAGTGGGTTTTGTTATTTGACGGGGGAAT	chromosome
ACGTTGTAGCAAAACACTGCCGGGCGCTGACT	chromosome
AGACTGCGGTTTCAATGCGGCGGATATTTTCGA	chromosome
GCATGAGGCACCGCCCTGCACCGGTATTTTAT	chromosome
ACATTGCAATTAACCTGATATCGCACCATCATCGG	chromosome
TACATACTCAAACGATTACTGAATCACAAAAC	chromosome
CGGCTGCACGAATTCGCGAGCGAACTGTTTCT	chromosome
AGCGAGGCTGCATACGTTGAGTGCCACACTG	chromosome
TGACGCCATATGCAGATCATTGAGGCGAAACC	chromosome
ACGTTTCGCACCGGTCAGGGTACTGCGCAGCGT	chromosome
GAAACCAGAGCGCCCGCATAAAACAGGCACAA	chromosome
ACGTTTCGCACCGGTCAGGGTACTGCGCAGCGT	chromosome
GCCAGCATAAAACCGCCTTTGATATTTTATTG	chromosome
TCAGCCGGAGGCTCTCAATTTAGCCGCGCGG	chromosome

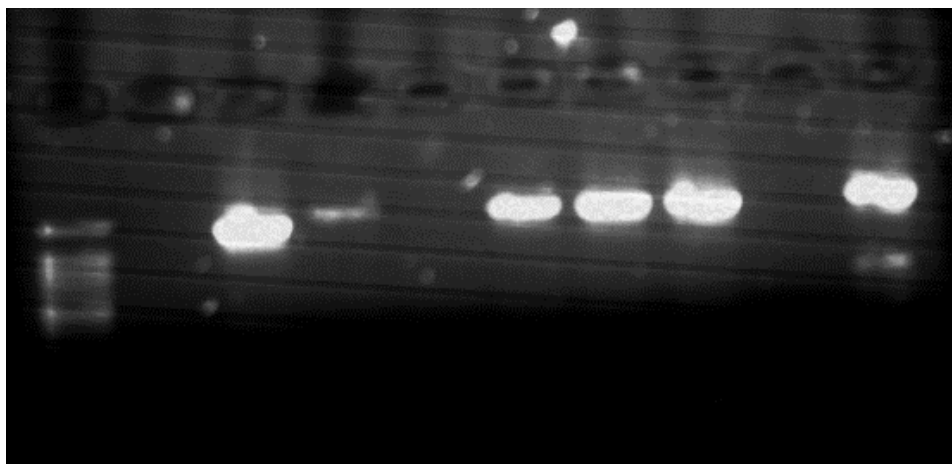
AGCACGGCTGCGGGGAATGGCTCAATCTCTGC	chromosome
GGAAAGCAGCCGAAGCCAAAGGTGATGCCGAA	chromosome
GGAAAAATTCACCCGTTTCGTTGTAAAAAATGG	chromosome
TTAGCCCTGCCTTTCCTGATTGTTTCGCGGTA	chromosome
GTCACGCAACATGCGGTTGCAAATGAATTTT	chromosome
GATACGATCGAATTTAGTCACTGAATACCCCC	chromosome
GGGTTGCGCAATGGGCTGGCCGACGAACGCGG	chromosome
GAATATTTTGGAAAAATAGCTATCAATCCGGG	chromosome
CGCCCCGGTCACATTGATTGTCTGATACACGT	chromosome
TGGATTCCAAACCGCCCCACCAACAAAAACAGGT	chromosome
GCGCGCAGTGCCTGATAATCAATTTTGCTCAT	chromosome
CGTCAGGTAGCTCTAAACAATACCAGGCCCGA	No significant similarity found
GAATTCGCGAGAAAGGCCTGAATGTAGAGGGG	No significant similarity found
TGGCGGAGTGGGGGCAGGTTTACGCAACCGTAG	No significant similarity found
AGCAATAGCATTAAGCTTTCCTGATGAGTTA	No significant similarity found
AGCCCGATTTATGCTCGCCGCCGAACGATACG	No significant similarity found
AGACAAAAAATGGTGGTGAGAAGTGGAAGGTT	No significant similarity found
AGTGCACCATTTCTTGTGAGTTAGCGATTGCAT	No significant similarity found
ATCAGAAACACGGTATCCAATCATCATCTCAG	No significant similarity found
GCAGAACCYGCAGACATAAGACCCGCTTTTGC	No significant similarity found
AATATCCGCCAGCGGGCTTACTGACGGCATCA	No significant similarity found
AAGCGGCTCCGGCCGCTTTTTTTTCGGAATTTAT	No significant similarity found
AGGTTGAGGCGACGGCAACTAAACTGYGTGGC	No significant similarity found

Πίνακας 18: Αλληλουχία spacers και προέλευση τους στις CRISPR3-4 συστοιχίες (I-F συστήματα).

➤ Τύπου I-E CRISPR/Cas συστήματα

Όπως ήδη αναφέραμε από τα 98 στελέχη *E. coli* τα 8 βρέθηκαν να φέρουν τύπου I-E CRISPR/Cas σύστημα. Τα στελέχη αυτά εμφανίζουν την ίδια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία, η οποία είναι η 5'CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACAC3', τόσο στην CRISPR1 όσο και στην CRISPR2 συστοιχία και ο αριθμός των spacers ανά στέλεχος κυμαίνεται μεταξύ 8-18 spacers για CRISPR1 και 1-7 spacers για CRISPR2. Αντίστοιχα, τα μήκη των συστοιχιών είναι περίπου 550-110bp και 600-1250bp (Εικόνα

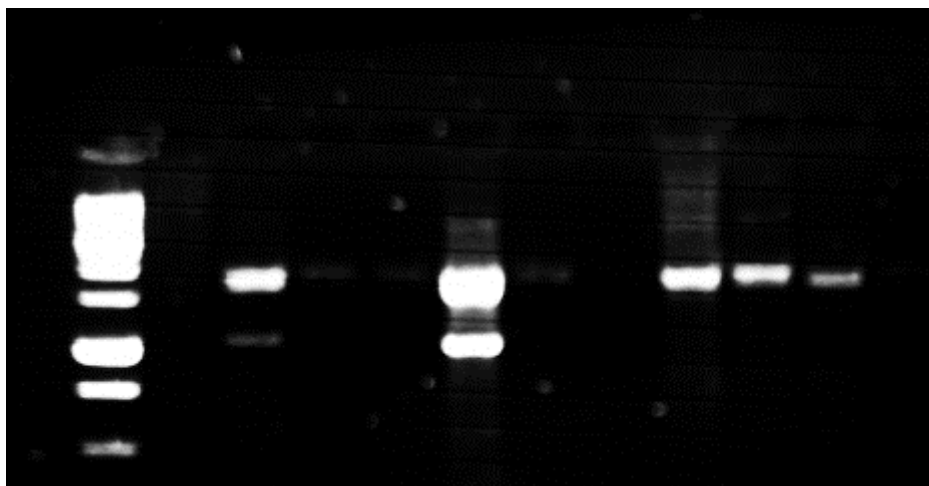
16). Αξίζει να σημειωθεί ότι ενώ τα περισσότερα στελέχη εμφάνισαν ποικιλομορφία μεταξύ τους όσον αφορά τα spacers, 6 από αυτά παρουσίαζαν κοινά spacers παρόλο που δεν ανήκουν στο ίδιο κλωνικό σύμπλοκο.



Εικόνα 16: Τύπου I-E συστοιχίες.

➤ Τύπου I-F CRISPR/Cas συστήματα

Αντίστοιχα από τα 98 στελέχη *E. coli* τα 7 βρέθηκαν να φέρουν τύπου I-F CRISPR/Cas σύστημα. Τα στελέχη αυτά εμφανίζουν την ίδια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία, η οποία είναι η 5'GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA3', στις CRISPR3 και CRISPR4 συστοιχίες και ο αριθμός των spacers ανά στέλεχος κυμαίνεται μεταξύ 5-13 spacers για CRISPR3 και 4-6 spacers για CRISPR4. Τα μήκη των συστοιχιών είναι περίπου 800-1250bp και 1050-1190bp, αντίστοιχα (Εικόνα 17).



Εικόνα 17: Τύπου I-F συστοιχίες.

Επιπλέον, τα στελέχη με ST95 (n=4) εμφανίζουν ορισμένα κοινά spacers. Πιο συγκεκριμένα, το ένα από αυτά (7686) εμφανίζει τον μικρότερο αριθμό σε spacers τόσο στην CRISPR3 όσο και στην CRISPR4 συστοιχία του, σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη (Εικόνες 18,19). Στην CRISPR3 συστοιχία απουσιάζουν spacers που βρίσκονται μεταξύ των θέσεων 1-2 και 2-3 στα υπόλοιπα στελέχη, ενώ στην CRISPR4

συστοιχία απουσιάζουν spacers που βρίσκονται πριν τη θέση 1 και μεταξύ των θέσεων 3-4 στα υπόλοιπα στέλεχη.

Regions

284 TAGTATTTGA

☒ ☐ Search DR in database

☒ ☐ Search Spacers in database

294 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

354 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

414 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

474 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

534 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGTATTTCMA

562 CTACGATAGT

☐ TGACGCCATATGCAGATCATTGAGGCGAAACC 1

☐ GAAACCAGAGCGCCCGCATAAAACAGGCACAA 2

☐ TGATGGCGCAGCAGTCCTCCCTCCTGCCGCCA 3

☐ CTGAACGTTGAAGAGTGCGACCGTCTCTCCTT 4

Εικόνα 18. CRISPR3 συστοιχία στο στέλεχος 7686

Regions

673 TATTATTCCA

☒ ☐ Search DR in database

☒ ☐ Search Spacers in database

683 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

743 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

803 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

863 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

923 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGTCTTCAAA

951 CTCAACACTC

☐ GATACGATCGAATTTAGTCACTGAATACCCCC 1

☐ GGGTTGCGCAATGGGCTGGCCGACGAACGCGG 2

☐ TGTGGCGCTGATGCGTCTGGGCGTCTTTGTAC 3

☐ GAATATTTTGAAAAATAGCTATCAATCCGGG 4

Εικόνα 19: CRISPR4 συστοιχία στέλεχους 7686

Το δεύτερο στέλεχος (3090) εμφανίζει δύο επιπλέον spacers σε σχέση με το στέλεχος 7686 στην CRISPR4 συστοιχία, πριν από το 1^ο spacer και μεταξύ του 3^{ου} και 4^{ου} spacer, ενώ φαίνεται να υπολείπεται του spacer 5' GGGTTGCGCAATGGGCTGGCCGACGAACGCGG 3' που ήταν 2^ο (Εικόνα 20). Αξίζει να σημειωθεί ότι το συγκεκριμένο στέλεχος δεν εμφανίζει CRISPR3 συστοιχία.

Regions

672 TATTATTCCA

☒ ☐ Search DR in database

☒ ☐ Search Spacers in database

682 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

☐ TGGATTCCAAACCGCCACCAACAAAAACAGGT

743 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

☐ GATACGATCGAATTTAGTCACTGAATACCCCC

803 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

☐ TGTGGCGCTGATGCGTCTGGGCGTCTTTGTAC

863 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

☐ GCGCGCAGTGCCTGATAATCAATTTTGTCAT

923 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

☐ GAATATTTTGGAAAAATAGCTATCAATCCGGG

983 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTCAAA

1011 CTCAACACTC

Εικόνα 20: CRISPR4 συστοιχία στελέχους 3090

Το τρίτο στέλεχος (7461) εμφανίζει 2 επιπλέον spacers στην CRISPR4 συστοιχία στις ίδιες θέσεις με το στέλεχος 3090 χωρίς όμως να υπολείπεται του spacer 5' GGGTTGCGCAATGGGCTGGCCGACGAACGCGG 3' το οποίο φέρει 3^ο (Εικόνα 21). Ταυτόχρονα εμφανίζει ένα επιπλέον spacer στην CRISPR3 συστοιχία σε σχέση με το 7686 μεταξύ του 1^{ου} και 2^{ου} spacer (Εικόνα 22).

Regions

653 TATTATTCCA

☒ ☐ Search DR in database

☒ ☐ Search Spacers in database

663 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGTTTAGAAA

☐ TGGATTCCAAACCGCCACCAACAAAAACAGGT

724 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

☐ GATACGATCGAATTTAGTCACTGAATACCCCC

784 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

☐ GGGTTGCGCAATGGGCTGGCCGACGAACGCGG

844 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

☐ TGTGGCGCTGATGCGTCTGGGCGTCTTTGTAC

904 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

☐ GCGCGCAGTGCCTGATAATCAATTTTGTCAT

964 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

☐ GAATATTTTGGAAAAATAGCTATCAATCCGGG

1024 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTCAAA

1052 CTCAACACTC

Εικόνα 21: CRISPR4 συστοιχία στελέχους 7461

Regions

249 TAGTATTTGA

☒ ☐ Search DR in database

☒ ☐ Search Spacers in database

259 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

☐ TGACGCCATATGCAGATCATTGAGGCGAAACC

319 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

☐ ACGTTCGCACCGGTCAGGGTACTGCGCAGCGT

379 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

☐ GAAACCAGAGCGCCCGCATAAAACAGGCACAA

439 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

☐ TGATGGCGCAGCAGTCCTCCCTCCTGCCGCCA

499 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

☐ CTGAACGTTGAAGAGTGCGACCGTCTCTCCTT

559 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGTATTCACA

587 CTACGATAGT

Εικόνα 22: CRISPR3 συστοιχία στελέχους 7461

Το τέταρτο στέλεχος (8617) εμφανίζει ακριβώς τα ίδια spacers με το στέλεχος 7461 στην CRISPR4 συστοιχία (Εικόνα 23). Ταυτόχρονα εμφανίζει 4 επιπλέον spacers σε σχέση με στέλεχος 7686 στην CRISPR3 συστοιχία, μεταξύ του 1^{ου} και 2^{ου} spacer και 2^{ου} και 3^{ου} spacer, ένα εκ των οποίων είναι κοινό με αυτό του στελέχους 7461 (Εικόνα 24).

Regions

634 TATTATTCCA

☒ ☐

Search DR in database

☒ ☐

Search Spacers in database

644 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

☐ TGGATTCCAAACCGCCACCAACAAAAACAGGT

705 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

☐ GATACGATCGAATTTAGTCACTGAATACCCCC

765 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

☐ GGGTTGCGCAATGGGCTGGCCGACGAACGCGG

825 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

☐ TGTGGCGCTGATGCGTCTGGGCGTCTTTGTAC

885 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

☐ GCGCGCAGTGCCTGATAATCAATTTTGCTCAT

945 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

☐ GAATATTTTGGAAAAATAGCTATCAATCCGGG

1005 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGTCTTCAAA

1033 CTCAACACTC

Εικόνα 23: CRISPR 4 συστοιχία στελέχους 8617

Regions

289 TAGTATTTGA

☒ ☐

Search DR in database

☒ ☐

Search Spacers in database

299 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

☐ TGACGCCATATGCAGATCATTGAGGCGAAACC

359 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

☐ ACGTTCGCACCGGTCAAGGTACTGCGCAGCGT

419 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

☐ GAAACCAGAGCGCCCGCATAAAACAGGCACAA

479 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

☐ GCCAGCATAAAACCGCCTTTGATATTTTATTG

539 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGATTAGAAA

☐ TCAGCCGGAGGCTCTCAATTTAGCCGCGCGG

599 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

☐ AGCACGGCTGCGGGGAATGGCTCAATCTCTGC

659 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

☐ TGATGGCGCAGCAGTCCCTCCCTCCTGCCGCCA

719 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAGAAA

☐ CTGAACGTTGAAGAGTGCGACCGTCTCTCCTT

779 ☐ GTTCACTGCCGTACAGGCAGTATTACAA

807 CTACGATAGT

Εικόνα 24: CRISPR3 συστοιχία στελέχους 8617

Συμπεράσματα- Συζήτηση

Τα συστήματα CRISPR/Cas αποτελούν ένα σύστημα άμυνας πολλών βακτηρίων, όπως το *E. coli*, εμφανίζοντας μεγάλη ποικιλομορφία. Ταξινομούνται σε 2 κλάσεις και 6 τύπους καθένας από τους οποίους χωρίζεται σε πολλαπλούς υπότυπους οι οποίοι ξεχωρίζουν με βάση τις CRISPR συστοιχίες και τα *cas* γονίδια που φέρουν (Makarova et al, 2015). Όπως είναι γνωστό από την βιβλιογραφία (Toro et al, 2013), το *E. coli* φέρει κυρίως δύο τύπους CRISPR/Cas συστημάτων, με διαφορετικά ζεύγη CRISPR συστοιχιών και *cas* γονιδίων, γεγονός που επιβεβαιώσαμε και από τα αποτελέσματα μας στα οποία βρέθηκαν συστήματα τύπου I-E και I-F σε κλινικά στελέχη *E. coli*. Το 15% των στελεχών *E. coli* βρέθηκε να φέρει CRISPR/Cas συστήματα, εκ των οποίων περίπου τα μισά ανήκαν στα τύπου I-E συστήματα και τα υπόλοιπα στα I-F, ενώ ταυτόχρονα εντοπίστηκαν σε 10 διαφορετικά ST. Το ποσοστό αυτό διαφέρει από αποτελέσματα παλαιότερων ερευνών στις οποίες σχεδόν όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν εμφάνιζαν συστήματα CRISPR/Cas και επιπλέον τα συστήματα I-E φαίνεται να υπερισχύουν και να εμφανίζονται σε μεγαλύτερο βαθμό στα περισσότερα από αυτά (Toro et al, 2013). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν είναι όλα κλινικά, οπότε μπορεί να έχουν δεχθεί μεγαλύτερη πίεση από τη χρήση αντιβιοτικών και να εμφανίζουν μειωμένα συστήματα άμυνας. Τα αποτελέσματα μας, ωστόσο, έδειξαν και την παρουσία CRISPR/Cas συστημάτων με συνδυασμούς *cas* γονιδίων και CRISPR συστοιχιών, διαφορετικούς από αυτούς που εμφανίζονται στη βιβλιογραφία ή ακόμη και ελλιπή συστήματα που υπολείπονται των *cas* γονιδίων. Αυτό μπορεί να υποδηλώνει ότι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν δεν είναι αρκετά εξειδικευμένοι ως προς τα γονίδια *cas1* και *cas2*, δίνοντας ψευδώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα είτε τα *cas* γονίδια έχουν εξαλειφθεί από ορισμένα συστήματα αφήνοντας πίσω τους μεμονωμένες CRISPR συστοιχίες, όπως υποδεικνύεται με την έρευνα των Shmakov S. et al. 2020. Τα συστήματα αυτά έχουν ανάγκη περαιτέρω έρευνας με μεγαλύτερο αριθμό στελεχών και μελέτη της λειτουργικότητάς τους.

Η αναγνώριση των ξένων κινητών γενετικών στοιχείων από τα συστήματα άμυνας των βακτηρίων όπως τα CRISPR/Cas μπορεί να οδηγήσει στην αποικοδόμηση και εν τέλει στη μείωση του ποσοστού γονιδίων ανθεκτικότητας στα στελέχη που φέρουν τέτοιου είδους συστήματα, όπως έχει αποδειχθεί και σε παλαιότερες έρευνες (Pursey et al., 2021). Όσον αφορά, λοιπόν, την παρουσία γονιδίων β-λακταμασών (*bla_{CTX-M-1}* & *bla_{CTX-M-9}*) που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε β-λακταμικά αντιβιοτικά, το 66% των στελεχών βρέθηκαν να φέρουν τέτοια γονίδια. Ταυτόχρονα, το 37% εμφάνιζε ανθεκτικότητα σε κεφταζιδίμη. Επιπλέον, το 80% των στελεχών στα οποία βρέθηκαν CRISPR/Cas συστήματα εμφάνιζε ταυτόχρονα γονίδια ανθεκτικότητας β-λακταμασών. Αντίστοιχα, στελέχη που δεν φέρουν CRISPR/Cas συστήματα, παρουσίασαν γονίδια ανθεκτικότητας σε β-λακταμικά αντιβιοτικά σε ποσοστό 72%. Τα ποσοστά παρουσίας γονιδίων ανθεκτικότητας σε β-λακταμικά αντιβιοτικά δεν διαφέρουν αρκετά μεταξύ στελεχών που φέρουν CRISPR/Cas συστήματα και στελεχών που δεν φέρουν τέτοια συστήματα, διότι πιθανότατα όπως φανερώθηκε και με τη μελέτη των spacers τα συγκεκριμένα γονίδια δεν σχετίζονται με τα συστήματα CRISPR/Cas των στελεχών που μελετήσαμε. Μελλοντικές έρευνες σε περισσότερα

στελέχη με έλεγχο παρουσίας μεγαλύτερου αριθμού γονιδίων ανθεκτικότητας και έλεγχο ευαισθησίας σε μεγαλύτερη ποικιλία αντιβιοτικών μπορεί να δώσει πληροφορίες για την πιθανή συσχέτιση των συστημάτων CRISPR/Cas με την ανθεκτικότητα των βακτηρίων σε αντιβιοτικά, όπως φάνηκε και με την έρευνα των Pursey et al. 2021, όπου μελετήθηκαν 11 διαφορετικά είδη κλινικών παθογόνων και βρέθηκε ότι στελέχη με CRISPR/Cas συστήματα είναι λιγότερο πιθανό να φέρουν γονίδια ABR (antibiotic resistance genes) από εκείνα που δεν εμφανίζουν τα συστήματα αυτά, υποδεικνύοντας την πιθανή συσχέτιση τους.

Η ανάλυση των CRISPR/Cas συστοιχιών στο πείραμα μας οδήγησε στην εύρεση 152 διαφορετικών spacers μεταξύ των στελεχών. Πιο συγκεκριμένα, 96 (63%) από αυτά προέρχονται από CRISPR1-CRISPR2 συστοιχίες και τα 56 (37%) από CRISPR3-CRISPR4 συστοιχίες, γεγονός που συμφωνεί με τα αποτελέσματα των Touchon et al. 2011, τα οποία έδειξαν ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των spacers (86%) που βρήκαν προέρχονταν από τις CRISPR1-CRISPR2 συστοιχίες. Στο πλήθος των spacers που μελετήσαμε τα 114 ταίριαζαν με χρωμοσωμικές αλληλουχίες του *E. coli* ή ήδη χαρακτηρισμένες CRISPR συστοιχίες του. Τα spacers αυτά έχουν ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί και σε παλαιότερες μελέτες ως αυτό-στοχευόμενα, με πιθανό ρόλο στη γονιδιακή ρύθμιση και στην αυτοανοσία του μικροοργανισμού (Devi V. et al. 2021). Η περαιτέρω διερεύνηση τους σε επόμενες μελέτες μπορεί να δώσει πληροφορίες για τον ακριβή τους ρόλο και την πιθανή αξιοποίηση τους στη γενετική μηχανική. Επιπλέον, τα 25 δεν εμφάνισαν κάποια ομοιότητα με αλληλουχίες που υπάρχουν στις βάσεις δεδομένων και τα 13 από αυτά βρέθηκαν να ταιριάζουν με αλληλουχίες πλασμιδίων και φάγων. Τα spacers που δεν εμφανίζουν ομοιότητα με χαρακτηρισμένες αλληλουχίες στις βάσεις δεδομένων υποδηλώνουν ότι δεν έχουν χαρακτηριστεί ακόμα, ενώ αυτά που ταιριάζουν με αλληλουχίες πλασμιδίων και φάγων φαίνεται να εμπλέκονται στην έκφραση ποικίλων πρωτεϊνών. Μερικές από τις πιο ενδιαφέρουσες δράσεις πρωτεϊνών που βρέθηκαν να σχετίζονται τα συγκεκριμένα spacers είναι οι αντιπεριοριστικές πρωτεΐνες (antirestriction protein) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/2485353038>) οι οποίες βοηθούν στο να ξεπεραστούν οι φραγμοί περιορισμού κατά την οριζόντια μεταφορά και πιθανότατα έτσι να βοηθάνε στη μετάδοση γονιδίων αντοχής σε αντιβιοτικά (Chen et al. 2023), αλλά και πρωτεΐνες με δράση N-6 DNA μεθυλάσης που εμπλέκονται στον αμυντικό μηχανισμό του βακτηρίου. Ωστόσο, δεν βρέθηκαν spacers που να σχετίζονται με γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.

Επιπλέον, στην έρευνα μας παρουσιάστηκαν ορισμένα στελέχη που ανήκουν στον ίδιο κλώνο, εμφανίζοντας κοινά spacers. Πιο συγκεκριμένα 4 διαφορετικά στελέχη που εμφάνισαν CRISPR/Cas συστήματα τύπου I-F βρέθηκαν να ανήκουν στον ίδιο κλώνο (ST95) με το ένα από αυτά να εμφανίζει μικρότερο αριθμό κοινών spacers από τα άλλα, γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει την εξελικτική πορεία των υπόλοιπων και την απόκτηση νέων spacers μέσω κινητών γενετικών στοιχείων. Ακόμα 6 διαφορετικά στελέχη που παρουσίαζαν CRISPR/Cas συστήματα τύπου I-E εμφάνισαν κοινά spacers παρόλο που δεν ανήκουν στο ίδιο κλωνικό σύμπλοκο. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η τυποποίηση των CRISPR/Cas συστημάτων θα μπορούσε να βοηθήσει στην επιδημιολογική παρακολούθηση των στελεχών, ιδιαίτερα

στο πλαίσιο μολυσματικών ασθενειών, μέσω της άμεσης αναγνώρισης συγκεκριμένων στελεχών και αντιμετώπιση τους σε επιδημιολογικές καταστάσεις (Chabas et al. 2022).

Γενικότερα, τόσο στο συγκεκριμένο πείραμα όσο και σε μελλοντικές έρευνες η μελέτη των CRISPR/Cas συστημάτων και των spacers που περιέχουν μπορεί να δώσει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την επαφή των στελεχών με ξένα γενετικά στοιχεία και την προσαρμοστική ικανότητα του συστήματος τους. Η μελέτη συντηρημένων αλληλουχιών, όπως φανερώθηκε με την έρευνα των Mojica et al. 2009, όπου έδειξαν ότι συγκεκριμένα CRISPR/Cas συστήματα στοχεύουν ειδικά spacers μέσω αλληλουχιών PAM, μπορεί να δείξει ποιους τύπους γενετικού υλικού στοχεύει πιο συχνά το συγκεκριμένο CRISPR σύστημα αλλά και τα εξελικτικά μοτίβα μεταξύ διαφορετικών στελεχών. Επιπλέον, μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις στρατηγικές που χρησιμοποιεί το *E. coli* για την επιβίωση του, δίνοντας παράλληλα τη δυνατότητα εφαρμογής των CRISPR/Cas συστημάτων μελλοντικά στη βιοτεχνολογία και σε θεραπευτικές μεθόδους κατά παθογόνων στελεχών, όπως έχουν δείξει πολλές μελέτες στις οποίες το CRISPR/Cas χρησιμοποιείται ως εργαλείο gene-editing στοχεύοντας συγκεκριμένα γονίδια ανοχής με σκοπό την επαναευαισθητοποίηση των στελεχών στα αντιβιοτικά και την μείωση των βακτηριακών λοιμώξεων (Shuan et al. 2022, Yuye et al. 2021).

Συνοψίζοντας, με την παρούσα εργασία καταφέραμε να εντοπίσουμε κλινικά στελέχη *E.coli* που φέρουν CRISPR/Cas συστήματα και ταυτόχρονα να μελετήσουμε τη δομή και την προέλευση αυτών των CRISPR συστοιχιών. Ταυτόχρονα, συσχετίσαμε την παρουσία αυτών των συστημάτων με την ανθεκτικότητα τους σε β-λακταμικά αντιβιοτικά. Περαιτέρω μελέτη μπορεί να φανερώσει τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των στελεχών και να εξηγήσει τον ρόλο τους στην παθογένεια και στην ανθεκτικότητα που εμφανίζουν.

Βιβλιογραφία

1. Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M., & Di Ilio, C. (2013). *Escherichia coli* in Europe: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), 6235–6254, <https://doi.org/10.3390%2Fijerph10126235>
2. Amitai, G., & Sorek, R., (2016), CRISPR–Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nature Reviews Microbiology*, 14(2), 67–76. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.14>
3. Billane Kathryn, Harrison Ellie, Cameron Duncan, Brockhurst Michael A.(2022), Why do plasmids manipulate the expression of bacterial phenotypes?, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2022 Jan 17;377(1842):20200461. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0461>
4. Bhawsinghka, N., Glenn, K. F., & Schaaper, R. M. (2020). Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* BL21-AI. *Microbiology Resource Announcements*, 9(10), <https://doi.org/10.1128%2FMRA.00009-20>
5. Burton E. Tropp (2012), *Principles of Molecular Biology* (1st edition), Jones & Bartlett Publishers
6. Chabas H. et al. (2022), Epidemiological and evolutionary consequences of different types of CRISPR-Cas systems, *PLoS Comput Biol.*, 26;18(7):e1010329, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010329>
7. Chaudhuri, R. R., & Henderson, I. R. (2012). The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 214–226. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.01.005>
8. Chen, Huimin et al.(2023), Anti-restriction protein ArdA promotes clinical *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* spread and its molecular mechanism, *J Antimicrob Chemother.*, 1;78(2):521-530. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac423>
9. Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., ... Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 104063872090583. <https://doi.org/10.1177%2F1040638720905833>
10. Daubin, V., & Szöllösi, G. J. (2016). Horizontal Gene Transfer and the History of Life. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(4), a018036 <https://doi.org/10.1101%2Fcshperspect.a018036>
11. Devi V. et al. (2021), Self-targeting spacers in CRISPR-array: Accidental occurrence or evolutionarily conserved phenomenon, *J Basic Microbiol.* 62(1):4-12. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100514>
12. Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., & Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 722–732. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1235>
13. Gagaletsios L., Papagiannitsis K. et al. (2022), Prevalence and analysis of CRISPR/Cas systems in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Greece, *Mol Genet Genomics*, 297(6):1767-1776. <https://doi.org/10.1007/s00438-022-01957-4>
14. Hounkpe, Bidossessi Wilfried; Chenou, Francine; de-Lima, Franciele; De-Paula, Erich Vinicius (2020), "HRT Atlas v1.0 database: redefining human and mouse

- housekeeping genes and candidate reference transcripts by mining massive RNA-seq datasets". *Nucleic Acids Research*. 49 (D1):D947–D955, <https://doi.org/10.1093%2Fnar%2Fgkaa609>
15. Ingledew WJ, Poole RK (September 1984). "The respiratory chains of *Escherichia coli*". *Microbiological Reviews*. **48** (3): 222–71, <https://doi.org/10.1128%2FMMBR.48.3.222-271.1984>
 16. Madigan M.T. et al. (2015), *Brock Biology of Microorganisms* (14th edition), Pearson Education Inc.
 17. Mahillon Jacques and Chandler Michael (1998). Insertion Sequences, *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998 Sep; 62(3): 725–774, <https://doi.org/10.1128%2Fmmb.62.3.725-774.1998>
 18. Makarova Kira S. & Koonin Eugene V., (2015), Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems, *Methods Mol Biol*. 2015 ; 1311: 47–75, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2687-9_4
 19. Mojica et al. (2009), Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system, *Microbiology*, 155(Pt 3):733–740, <https://doi.org/10.1099/mic.0.023960-0>
 20. Nishimasu H. & Nureki O., (2017), Structures and mechanisms of CRISPR RNA-guided effector nucleases, *Current Opinion in Structural Biology* 2017, 43:68–78, <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2016.11.013>
 21. Ochman, H., Selander, R.K., 1984b. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J. Bacteriol*. 157, 690–693, <https://doi.org/10.1128%2Fjb.157.2.690-693.1984>
 22. Paitan, Y. (2018). Current Trends in Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli*. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 416:181–211, https://doi.org/10.1007/82_2018_110
 23. Pursey, Elizabeth et al. (2021) CRISPR-Cas Is Associated With Fewer Antibiotic Resistance Genes In Bacterial Pathogens. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 377(1842): 20200464, <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0464>
 24. Rodríguez-Beltrán, J., DelaFuente, J., León-Sampedro, R., MacLean, R. C., & San Millán, Á. (2021). Beyond horizontal gene transfer: the role of plasmids in bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 19(6), 347–359. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00497-1>
 25. Rossolini, G. M., D'Andrea, M. M., & Mugnaioli, C. (2008). The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 33–41. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01867.x>
 26. Shmakov S. et al (2020), CRISPR Arrays Away from cas Genes, *CRISPR J.*, 3(6): 535–549. <https://doi.org/10.1089%2Fcrispr.2020.0062>
 27. Soucy, S. M., Huang, J., & Gogarten, J. P. (2015). Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nature Reviews Genetics*, 16(8), 472–482. <https://doi.org/10.1038/nrg3962>
 28. Shuan Tao et al. (2022), The Application of the CRISPR-Cas System in Antibiotic Resistance, *Infect Drug Resist*, 15: 4155–4168, <https://doi.org/10.2147%2FIDR.S370869>
 29. Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*, *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), 207–217, <https://doi.org/10.1038/nrmicro2298>

30. Toro, M., Cao, G., Ju, W., Allard, M., Barrangou, R., Zhao, S., ... Meng, J. (2013). Association of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) Elements with Specific Serotypes and Virulence Potential of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(4), 1411–1420, <https://doi.org/10.1128/aem.03018-13>
31. Touchon, M., Charpentier, S., Clermont, O., Rocha, E. P. C., Denamur, E., & Branger, C. (2011). CRISPR Distribution within the *Escherichia coli* Species Is Not Suggestive of Immunity-Associated Diversifying Selection. *Journal of Bacteriology*, 193(10), 2460–2467, <https://doi.org/10.1128%2FJB.01307-10>
32. Whittam, T.S., Ochman, H., Selander, R.K., 1983b. Multilocus genetic structure in natural populations of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1751–1755, <https://doi.org/10.1073/pnas.80.6.1751>
33. Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L. H., Achtman, M. et al. (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular Microbiology*, 60(5), 1136–1151, <https://doi.org/10.1111%2Fj.1365-2958.2006.05172.x>
34. Xue, C., & Sashital, D. G. (2019). Mechanisms of Type I-E and I-F CRISPR-Cas Systems in Enterobacteriaceae. *EcoSal Plus*, 8(2), <https://doi.org/10.1128%2Fecosalplus.ESP-0008-2018>
35. Yuye Wu et al. (2021), Engineered CRISPR-Cas systems for the detection and control of antibiotic-resistant infections, *J Nanobiotechnology* 4;19(1):401 <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01132-8>

