



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Χαρακτηρισμός CRISPR/Cas συστημάτων από Gram-αρνητικά βακτήρια,
μελέτη της διασποράς και του ρόλου τους**

Λάζαρος Α. Γκαγκαλέτσιος

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Παπαγιαννίσης Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Μικροβιολογίας, Επιβλέπων
- Πετεινάκη Ευθυμία, Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας-Κλινικής Μικροβιολογίας
- Μπόγδανος Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην Ιατρική Μικροβιολογία

Λάρισα, Φεβρουάριος, 2024



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

**Characterization of CRISPR/Cas systems from Gram-negative bacteria, study of
their distribution and role**

By

Lazaros A. Gagaletsios

Three-member examination committee:

- Papagiannitsis Konstantinos, Assistant Professor of Medical Microbiology, Supervisor
- Peteinaki Efthymia, Professor of Medical Biopathology-Clinical Microbiology
- Bogdanos Dimitrios, Professor of Pathology and Autoimmune Diseases

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Medical Microbiology

Larissa, February, 2024

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ-ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ.....	7
ABSTRACT-KEYWORDS.....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Τι είναι CRISPR/Cas συστήματα;.....	9
1.1.1 Ιστορική ανασκόπηση των CRISPR/Cas συστημάτων.....	9
1.1.2 Δομική και λειτουργική περιγραφή των CRISPR/Cas συστημάτων	10
1.1.3 Ταξινόμηση των CRISPR/Cas συστημάτων	13
1.2 Κινητό Γενετικό Στοιχείο (Mobile Genetic Element-MGE)	16
1.2.1 Γενικές πληροφορίες.....	16
1.2.2 Μηχανισμοί οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων	19
1.3 Gram-αρνητικά βακτήρια.....	21
1.3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
1.3.2 <i>Escherichia coli</i>	24
1.3.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	25
1.4 CRISPR/Cas συστήματα σε <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> και <i>K. pneumoniae</i>	27
1.5 Αντοχή βακτηριών στα β-λακταμικά αντιβιοτικά.....	28
1.6 β-λακταμάσες	30
2. ΣΚΟΠΟΣ	32
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	33
3.1 Συλλογή κλινικών δειγμάτων από ασθενή του ΠΓΝΑ.....	33
3.2 Καλλιέργεια κλινικών δειγμάτων από τα οποία έγινε απομόνωση των στελεχών <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> και <i>K. pneumoniae</i>	34
3.3 Ταυτοποίηση των στελεχών και μελέτη της ευαισθησίας τους.....	34
3.4 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA (DNA extraction).....	34
3.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	35
3.5.1 MLST τυποποίηση βακτηρίων.....	38
3.5.2 Ανίχνευση <i>cas</i> γονιδίων.....	42

3.5.3	Ανίχνευση CRISPR/Cas συστοιχιών.....	44
3.5.4	Ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.....	47
3.6	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης.....	49
3.7	Καθαρισμός προϊόντος.....	49
3.7.1	Καθαρισμός PCR προϊόντων.....	50
3.7.2	Καθαρισμός PCR προϊόντων από πήκτωμα αгарόζης.....	51
3.8	Αλληλούχηση με τη μέθοδο Sanger.....	52
3.9	Χρήση βιοπληροφοριακών προγραμμάτων για ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	53
3.9.1	BioEdit.....	53
3.9.2	PubMLST.....	54
3.9.3	BLASTn.....	54
3.9.4	CRISPRCasFinder [online].....	55
3.9.5	Geneious 7.1.9.....	56
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	57
4.1	Έλεγχος ευαισθησίας των στελεχών.....	57
4.2	Τυποποίηση στελεχών με MLST.....	60
4.2.1	<i>P. aeruginosa</i>	60
4.2.2	<i>E. coli</i>	62
4.2.3	<i>K. pneumoniae</i>	64
4.3	Έλεγχος ύπαρξης CRISPR/Cas συστημάτων στα ενδονοσοκομειακά στελέχη.....	65
4.3.1	<i>P. aeruginosa</i>	65
4.3.2	<i>E. coli</i>	66
4.3.3	<i>K. pneumoniae</i>	67
4.4	Ανάλυση των CRISPR συστοιχιών.....	67
4.4.1	Τύπου I-C CRISPR/Cas συστήματα.....	68
4.4.2	Τύπου I-E CRISPR/Cas συστήματα.....	69
4.4.2.1	<i>P. aeruginosa</i>	69
4.4.2.2	<i>E. coli</i>	70
4.4.3	Τύπου I-F CRISPR/Cas συστήματα.....	71
4.4.3.1	<i>P. aeruginosa</i>	71
4.4.3.2	<i>E. coli</i>	72
4.4.4	Σύγκριση CRISPR συστοιχιών.....	73

4.5 CRISPR-βασιζόμενη φυλογένεση.....	75
4.5.1 <i>P. aeruginosa</i>	76
4.5.2 <i>E. coli</i>	79
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	82
6. ΠΗΓΕΣ-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	85

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με την πλειοψηφία των πειραμάτων να πραγματοποιείται το διάστημα Οκτώβριο 2023 – Φεβρουάριο 2024.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας, Επίκουρο Καθηγητή Ιατρικής Μικροβιολογίας, κ. Παπαγιαννίτη Κωνσταντίνο. Ολοκληρώνοντας αυτή την διπλωματική εργασία, για την απόκτηση του μεταπτυχιακού, μπορώ να πω με βεβαιότητα ότι ο κ. Παπαγιαννίτης αποτελεί πλέον για μένα μέντορα, που κατάφερε να μου δείξει μέσα από τα δικά του μάτια τον κόσμο της Ιατρικής Μικροβιολογίας. Μπορεί όλο αυτό το διάστημα να αντιμετωπίσαμε ορισμένες δυσκολίες στη μελέτη μας, αλλά πάντα ήταν εκεί προκειμένου να με βοηθήσει να βρούμε κάποια λύση και να ολοκληρώσω τη διπλωματική μου εργασία με επιτυχία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Πετεινάκη Ευθυμία, η οποία ως καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας-Κλινικής Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής, με τη σειρά της βοήθησε σημαντικά στην επίτευξη αυτού του project.

Θα αποτελούσε παράληψη να μην αναφερθώ και στον Πρόεδρο του ΠΜΣ κ. Δημήτριο Μπόγδανο, Καθηγητή Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων, διότι χάρη σε αυτόν το πρόγραμμα σπουδών παραμένει άκρως ενδιαφέρον.

Κλείνοντας, το μεγαλύτερο ευχαριστώ οφείλω να εκφράσω στην αγαπημένη μου οικογένεια που υποστηρίζει καθένα όνειρο, στόχο και φιλοδοξία μου και φυσικά τους φίλους μου για τη συνεχή υποστήριξη, κατανόηση και ενθάρρυνση.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ – ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ (300 Λέξεις)

Οι προκαρυώτες προκειμένου να αντιμετωπίσουν τα κινητά γενετικά στοιχεία (πλασμίδια, φάγοι), αναπτύσσουν έμφυτους μηχανισμούς άμυνας, όπως είναι τα CRISPR/Cas συστήματα. Η «πληροφορία» που φέρει το μόριο-εισβολέας, αποθηκεύεται σε μία ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία (διαχωριστή), στις CRISPR συστοιχίες. Σήμερα, τα CRISPR/Cas συστήματα ταξινομούνται σε δύο τάξεις, έξι τύπους και είκοσι τουλάχιστον υπότυπους, με κριτήριο τα crRNP σύμπλοκα.

Σκοπός της μελέτης ήταν ο χαρακτηρισμός CRISPR/Cas συστημάτων σε κλινικά στελέχη (*P. aeruginosa*, *E. coli* και *K. pneumoniae*), προκειμένου να μελετήσουμε τη διασπορά και το ρόλο τους. Ειδικότερα, μελετήθηκαν αλληλουχίες διαχωριστών, για τυχόν γενετικά στοιχεία, τα οποία κάποτε είχαν εισβάλει στα βακτήρια. Όλα τα στελέχη (100 *P. aeruginosa*, 100 *E. coli* και 60 *K. pneumoniae*), αρχικά είχαν υποστεί τυποποίηση με τη μέθοδο MLST. Μέσω PCR, εντοπίστηκαν CRISPR/Cas συστήματα, με τη χρήση ειδικών εκκινητών και πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση των PCR προϊόντων.

Τα CRISPR/Cas συστήματα που εντοπίστηκαν στα *P. aeruginosa* και *E. coli* ήταν τριάντα-έξι και δώδεκα, αντίστοιχα. Κανένα στέλεχος *K. pneumoniae*, από τα οποία το 62% έφερε γονίδια για αντοχή στις καρβαπενέμες, δεν ήταν θετικό για CRISPR/Cas συστήματα. Σε δεκαεννέα, οκτώ και εννέα στελέχη *P. aeruginosa*, εντοπίστηκαν τρεις τύποι συστημάτων, I-F, I-E και I-C, αντίστοιχα. Από αυτά, είκοσι-οκτώ CRISPR/Cas-θετικά στελέχη εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες, με τα δεκατέσσερα να φέρουν γονίδιο αντοχής (*bla_{VM}*). Σε επτά και πέντε στελέχη *E. coli*, εντοπίστηκαν δύο τύποι συστημάτων, I-F και I-E, αντίστοιχα. Από αυτά, μόνο ένα εμφάνισε ανθεκτικότητα σε κεφαλοσπορίνες και το οποίο, δεν έφερε κάποιο γονίδιο β-λακταμασών (*bla_{CTX-M-1}* ή *bla_{CTX-M-9}*). Τύποι I-F και I-E CRISPR/Cas συστημάτων, (*P. aeruginosa*, *E. coli*), έφεραν δύο CRISPR συστοιχίες με διαφορετικό αριθμό διαχωριστών ανά στέλεχος, ενώ ο τύπος I-C των *P. aeruginosa*, μία συστοιχία είκοσι διαχωριστών. Οι διαχωριστές ταιριάζουν με αλληλουχίες χρωμοσωμάτων (ίδιου είδους), αλλά και με κινητά γενετικά στοιχεία. Συνεπώς, εντοπίσαμε διαφορετικούς τύπους CRISPR/Cas συστημάτων, σε διαφορετικούς κλώνους (του ίδιου είδους) και τα οποία μας παρείχαν πληροφορίες για το ιστορικό προέλευσης των διαχωριστών που διαθέτουν.

Λέξεις κλειδιά: CRISPR/Cas συστήματα, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, κινητά γενετικά στοιχεία, β-λακταμάσες

ABSTRACT – KEYWORDS

Prokaryotes develop innate defense mechanisms, to deal with mobile genetic elements (plasmid, phages), such as CRISPR/Cas systems. This “information”, which carried by the invader molecule is stored in an oligonucleotide sequence (spacer), in the CRISPR arrays. Today, CRISPR/Cas systems are classified into two classes, six types and at least twenty subtypes, based on crRNP complexes.

The purpose of this study was to characterize CRISPR/Cas systems in clinical strains (*P. aeruginosa*, *E. coli* and *K. pneumoniae*), in order to study their distribution and role. In particular, sequences of spacers were studied, for genetic elements, that had once entered in the bacteria. All of our strains (100 *P. aeruginosa*, 100 *E. coli* and 60 *K. pneumoniae*), were initially standardized by the MLST method. Through PCR, CRISPR/Cas systems were identified, using specific primers, and their PCR products were sequenced.

Thirty-six and twelve CRISPR/Cas systems were identified in *P. aeruginosa* and *E. coli*, respectively. Noone strain of *K. pneumoniae* were positive for CRISPR/Cas system, of which 62% carried genes for carbapenem resistance. In *P. aeruginosa*, were identified three types of CRISPR/Cas systems, I-F, I-E and I-C, in nineteen, eight and nine strains, respectively. Of these, twenty-eight CRISPR/Cas-positive strains, showed resistance to carbapenems, with fourteen strains carrying a resistance gene (*bla_{VIM}*). In *E. coli*, were identified two types of CRISPR/Cas systems, I-F and I-E, in seven and five strains, respectively. Of these, only one showed resistance to cephalosporins and that carry any β -lactamase gene (*bla_{CTX-M-1}* or *bla_{CTX-M-9}*). Types I-F and I-E CRISPR/Cas systems, (*P. aeruginosa*, *E. coli*), carried two CRISPR arrays with different numbers of spacers per strain, while type I-C of *P. aeruginosa*, one array of twenty spacers. Spacers matched with chromosome sequences (of the same species), but also with some mobile genetic elements. In this study, we identified different types of CRISPR/Cas systems, in different clones (of the same species), which provided us information about the historical origin of the spacers.

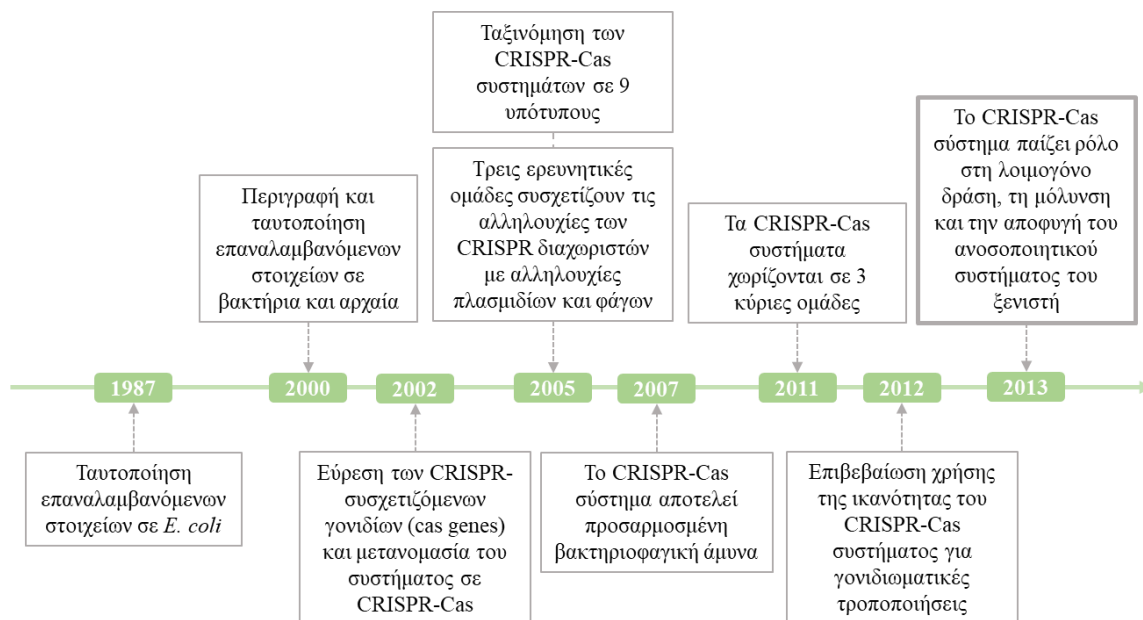
Keywords: CRISPR/Cas systems, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, mobile genetic elements, β -lactamases

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τι είναι CRISPR/Cas συστήματα;

Οι Ομαδοποιημένες Κανονικά Διασπαρμένες Βραχείες Παλινδρομικές Επαναλήψεις (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - CRISPR) καθώς και οι CRISPR-σχετιζόμενες πρωτεΐνες (CRISPR associated proteins; Cas proteins) προσφέρουν προσαρμοστική ανοσία σε βακτήρια και αρχαία. Εμποδίζουν, δηλαδή, διάφορα κινητά γενετικά στοιχεία (π.χ. πλασμίδια, ιοί) να εισβάλουν σε αυτά και πιθανότατα να τα θανατώσουν [1].

1.1.1 Ιστορική ανασκόπηση των CRISPR/Cas συστημάτων

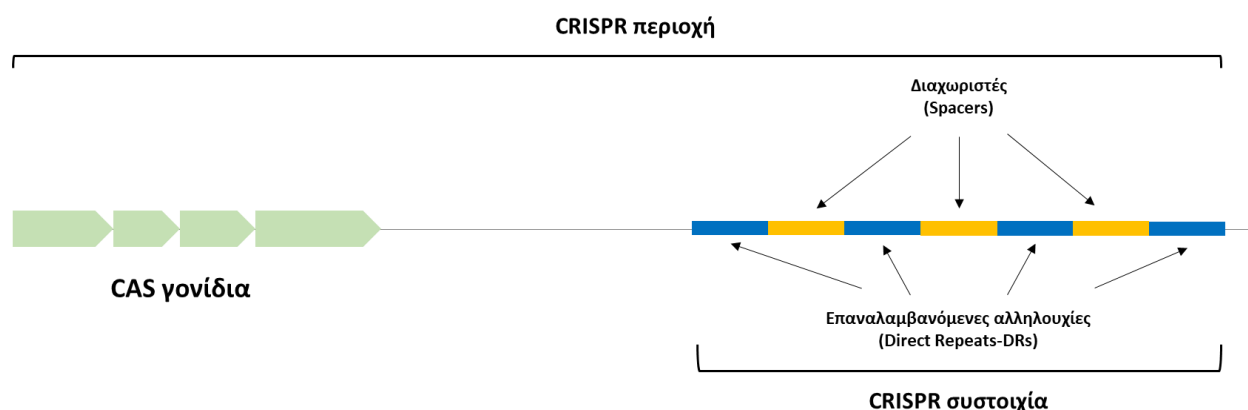


Εικόνα 1: Χρονοδιάγραμμα μελετών των CRISPR/Cas συστημάτων. (Ανατύπωση από: Louwen R, Staals RHJ, Endtz HP, Baarlen P, Oost J, The role of CRISPR-Cas systems in virulence of pathogenic bacteria, Microbiology and molecular biology reviews: MMBR,2014;78(1):74-88)

Η πρώτη αναφορά των CRISPR/Cas συστημάτων έγινε από των ερευνητή Yoshizumi Ishino και τους συνεργάτες του στην Ιαπωνία το 1987, όπου ενώ δούλευαν με τα *iap* γονίδια της *Escherichia coli*, παρατήρησαν στο γονιδίωμα της, μικρές ομόλογες επαναλήψεις οι οποίες διακόπτονταν από μικρές αλληλουχίες ίσου αριθμού βάσεων, τους διαχωριστές [2]. Σε μετέπειτα μελέτες, ανακαλύφθηκε ότι, αυτές οι ομόλογες επαναλήψεις εντοπίζονται τόσο σε αρχαία, όσο και σε χρωμοσώματα βακτηρίων, σε μεγάλα ποσοστά (90% και 40% αντίστοιχα), με λειτουργία, που τότε δεν είχε διαλευκανθεί. Σε αυτούς τους μικροοργανισμούς, αργότερα βρέθηκαν και τα CRISPR-σχετιζόμενα γονίδια (Cas genes), τα οποία κωδικοποιούν ένζυμα για την επεξεργασία νουκλεϊκών

οξέων, καθώς και άλλες δομικές αλληλουχίες του μηχανισμού αυτού, όπως είναι το protospacer adjacent motif (PAM), το CRISPR RNA (crRNA) και το trans-activating crRNA (tracrRNA) [3]. Αργότερα, το 2005, τρεις ανεξάρτητες μελέτες μεταξύ τους, ανέφεραν ότι οι αλληλουχίες των διαχωριστών προέρχονται από κινητά μεταθετά στοιχεία όπως είναι οι ιοί και τα πλασμίδια [4, 5, 6]. Μέχρι τις αρχές του 2000, οι ερευνητές θεωρούσαν ότι οι προκαρυώτες δε φέρουν συστήματα προσαρμοστικής ανοσίας παρά μόνο έμφυτα, όπως είναι οι εξωνουκλεάσες. Χρονιά ορόσημο αποτελεί το 2007, όπου και αναφέρθηκε, για πρώτη φορά, ότι προσαρμοστική ανοσία, για διάφορα κινητά γενετικά στοιχεία μπορεί να επιτευχθεί και μέσω CRISPR/Cas συστημάτων.. Εντόπισαν, δηλαδή, ότι νέοι διαχωριστές με προέλευση από γονιδιωματικές αλληλουχίες φάγου μπορούν να ενσωματωθούν σε βακτήρια , έπειτα από μία εισβολή φάγου, με αποτέλεσμα να καταφέρνουν τελικά να επιβιώσουν [7]. Παρόλο που είχαν πραγματοποιηθεί οι ανακαλύψεις αυτές, ο μηχανισμός του συστήματος CRISPR/Cas διατυπώθηκε το 2012 [8] (Εικόνα 1).

1.1.2 Δομική και λειτουργική περιγραφή των CRISPR/Cas συστημάτων



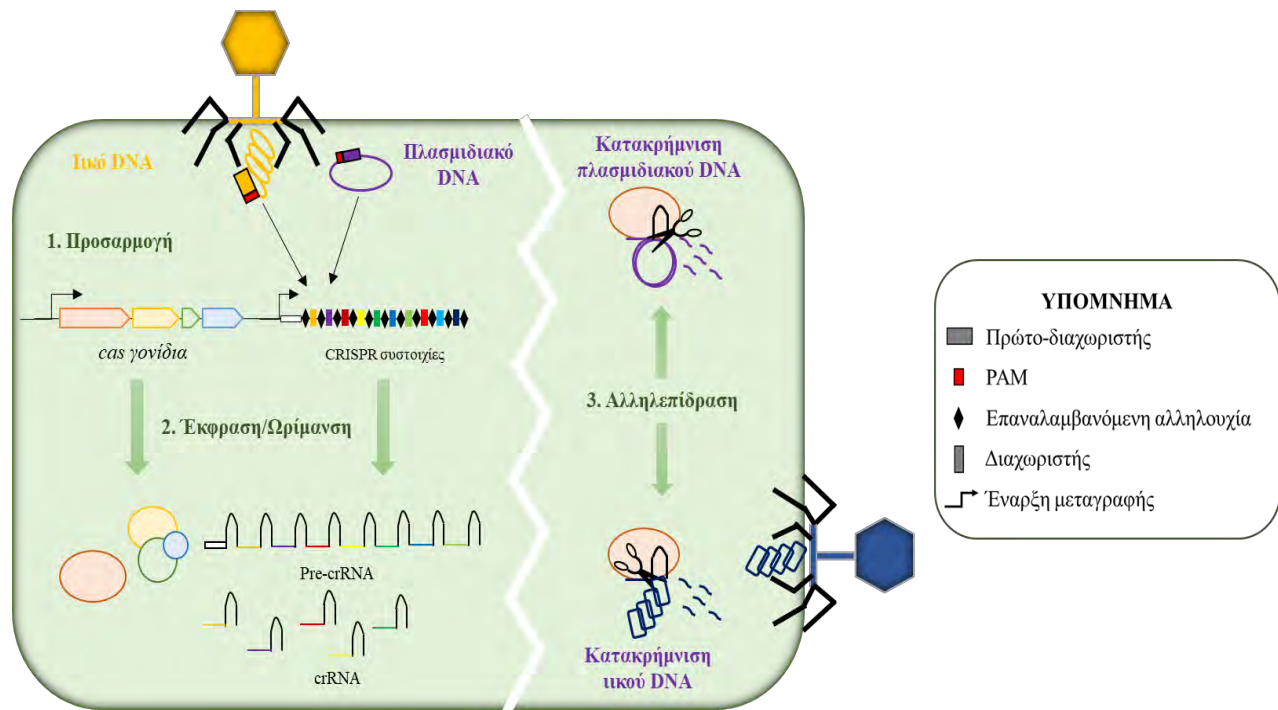
Εικόνα 2: CRISPR τύπος. (Ανατύπωση από: Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P, CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea, Nature reviews. Microbiology, 2008;6(3):181–186)

Οι συστοιχίες CRISPR (CRISPR arrays) αποτελούνται από μικρές επαναλαμβανόμενες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες (direct repeats) μήκους περίπου 21-48 ζεύγη βάσεων (bp), στις οποίες ανάμεσα παρεμβάλλονται άλλες αλληλουχίες, οι διαχωριστές (spacers), όπου κι αυτοί με τη σειρά τους μήκος 26-72 ζεύγη βάσεων (bp), και έρχονται σε πλήρη ταύτιση με ετερόλογες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, οι οποίες κάποτε είχαν εισβάλει στον ξενιστή. Σε κάθε συστοιχία CRISPR, ο αριθμός των βάσεων, τόσο των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, όσο και των αλληλουχιών των διαχωριστών, παραμένει σταθερός. Γειτονικά των συστοιχιών CRISPR, έχουν βρεθεί και 4-10 γονίδια

(εξαιρετικά συντηρημένα), που δρουν συνεργατικά με αυτές, τα CRISPR-συσχετιζόμενα γονίδια (CRISPR associated-*cas* genes), που κωδικοποιούν, με τη σειρά τους, τις πρωτεΐνες Cas. Αυτές δίνουν τη δυνατότητα προσαρμοστικής ανοσίας στους προκαρυώτες, ένα πλεονέκτημα που βασίζεται στην αξιοποίηση των «ανοσολογικών πληροφοριών» που βρίσκονται αποθηκευμένες στους διαχωριστές των CRISPR συστοιχιών [9] (Εικόνα 2).

Μετά την εισβολή ενός πλασμιδίου ή ιού σε ένα προκαρυωτικό κύτταρο, το CRISPR/Cas σύστημα μπορεί να αναγνωρίσει και να ενσωματώσει στις συστοιχίες, μεταξύ των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του, μικρά τμήματα ξένου DNA, από αυτά τα «μόρια εισβολείς». Σε μία νέα εισβολή, τα καινούργια αυτά τμήματα DNA που ενσωματώθηκαν, θα καταστρέψουν τα ίδια εξωτερικά γενετικά στοιχεία [9]. Τελευταία ερευνητικά δεδομένα αναφέρουν ότι υπάρχουν κάποιιοι παράγοντες, όπως είναι ο σίδηρος και η γλυκόζη, όπου ενεργούν ενισχυτικά ή ανασταλτικά στη λειτουργία των CRISPR/Cas συστημάτων [11].

Πιο αναλυτικά, το σύστημα CRISPR/Cas προσφέρει επίκτητη ανοσία στους προκαρυώτες, προκειμένου να αντιμετωπίσουν την είσοδο ξένων γενετικών στοιχείων, μέσω τριών διαδοχικών σταδίων: της προσαρμογής, της έκφρασης/ωρίμανσης και της αλληλεπίδρασης (Εικόνα 3).



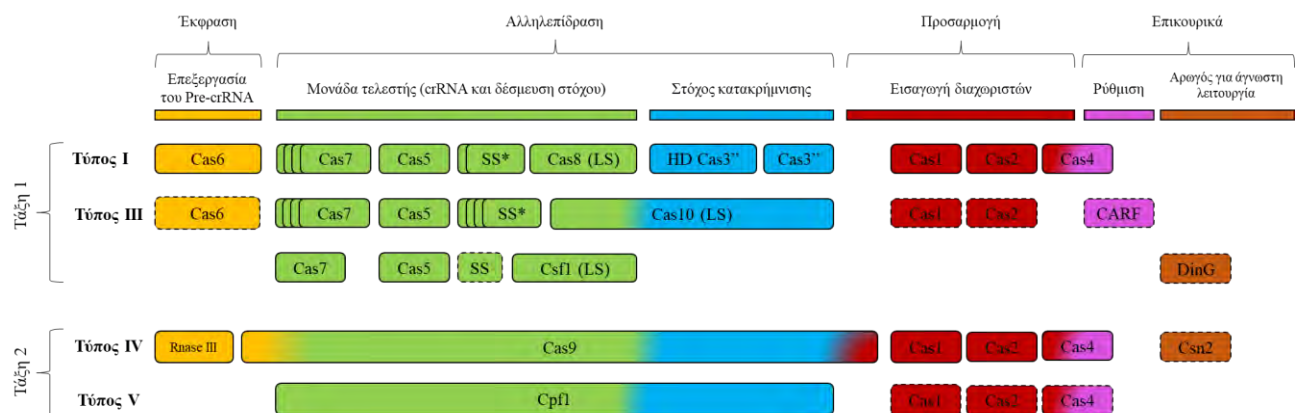
Εικόνα 3: Στάδια της CRISPR/Cas ανοσιολογικής απόκρισης: προσαρμογή, έκφραση/ωρίμανση και παρεμβολή. (Ανατύπωση από: Bhaya D, Davison M, Barrangou, R, CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation, Annual review of genetics, 2012;45:273–297)

-
- a Viral DNA**
- 5'-ACACTTTCGTACTGCATGCCAAGCAAGTTGATATATTCTCTTTCTTTATAGAAACGTCGATTACGATCGGTA-3'
 3'-TGTGAACAGCATGCCGTAACGGTTCGTTCAACATATATAAGAGAGAAGAAATATCTTTTCGACGCTAAATGCTAGCCAT-5'
- b Host DNA**
- Repeat
 Spacer
 Repeat
- 5'-GTTTTTGTACTCTCAAGATTTAAGTAACTGTACAACAAGCAAGTTGATATATTCTCTTTCTTTATGTTTTTGTACTCTCAAGATTTAAGTAACTGTACAAC-3'
 3'-CAAAAACATGAGAGTTCTAAATTTCATTGACATGTTGTTTCGTTCAACATATATAAGAGAGAAGAAATACAAAACATGAGAGTTCTAAATTCATTGACATGTTG-5'
- c Pre crRNA**
- Endo ribonucleases, e.g. Cas6e
 RNA polymerase
- 5'-GUUUUUGUAUCUCUCAAGAUUUAGUAACUGUACAACAAAGCAAGUUGAUUAUUUCUUUCUUUAUGUUUUUGUACUCUCAAGAUUUUAAGUUAACUGUACAAC-3'
- crRNA
- 5'OH
 3'P
- d 100% match**
- CASCADE + Cas3
- Host spacer AAGCAAGTTGATATATTCTCTTTCTTTAT
 Viral DNA AAGCAAGTTGATATATTCTCTTTCTTTATAGAAA
- e ≥ 1 mismatch (in or near PAM)**
- Host spacer AAGCAAGTTGATATATTCTCTTTCTTTAT
 Viral DNA AAGCAAGTTGATATATTCTCTTTATTGATTAAATAA
- Foreign DNA cleaved
 Host immune
- Foreign DNA not cleaved
 Host not immune

12

1.1.3 Ταξινόμηση των CRISPR/Cas συστημάτων

Τα CRISPR/Cas συστήματα, ταξινομούνται σε διάφορες κατηγορίες, λόγω της μεγάλης πολυπλοκότητάς τους και της ποικιλομορφίας τους. Ο διαχωρισμός των CRISPR-Cas παραλλαγών με γνώμονα γονιδιωματικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των οργανισμών, μπορεί να φανερώσει την εξελικτική πορεία αυτών. Έτσι, λοιπόν, η κατηγοριοποίηση των CRISPR/Cas συστημάτων έγινε σε 2 τάξεις, 6 τύπους και 20, τουλάχιστον, υπότυπους. Κυρίαρχο κριτήριο διαχωρισμού των CRISPR/Cas συστημάτων σε 2 τάξεις, αποτελεί η γονιδιακή σύνθεση των τελεστών των CRISPR-ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων (crRNP complexes) [12] (Εικόνα 5).

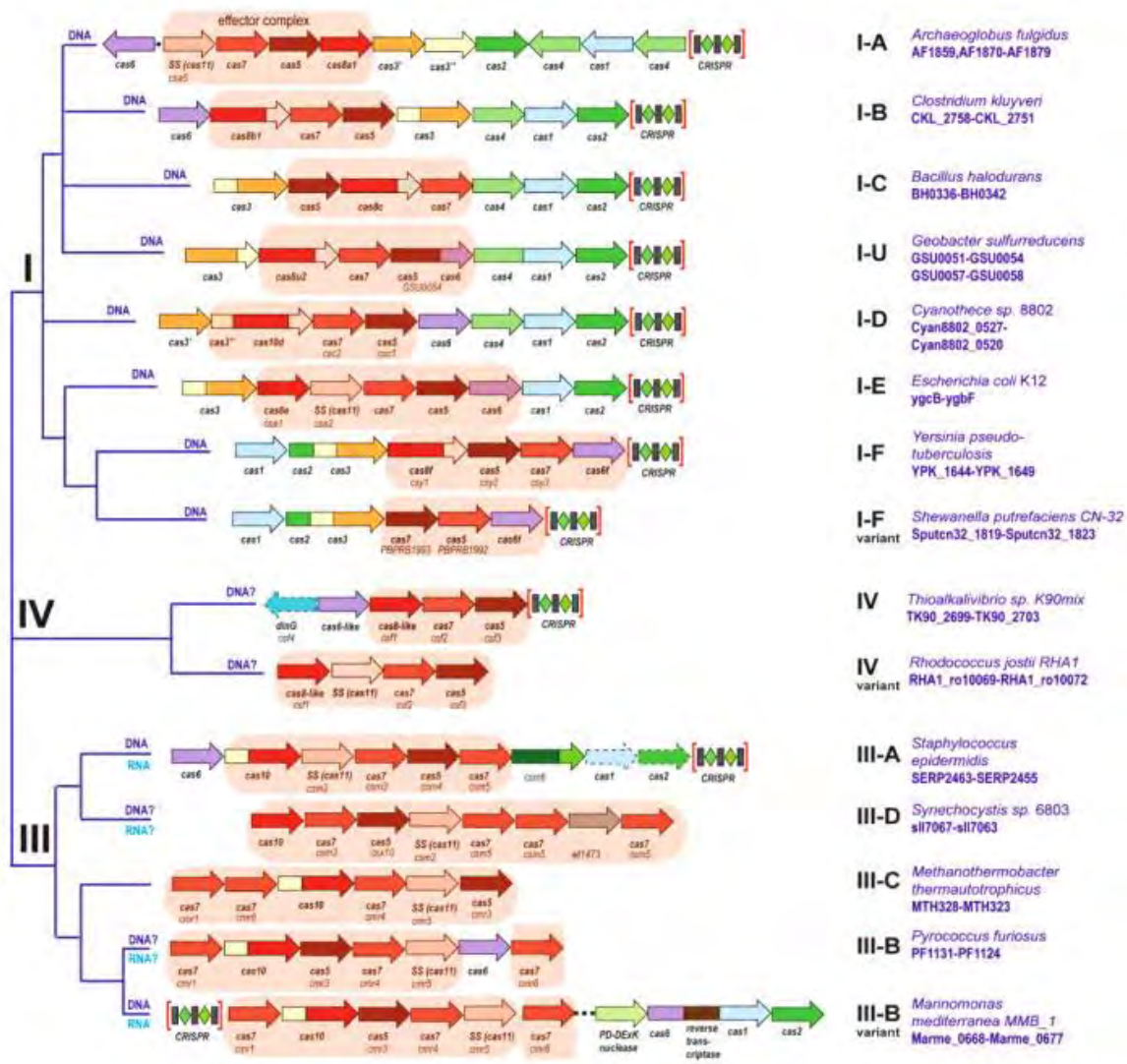


Εικόνα 5: Κατηγοριοποίηση των Cas πρωτεϊνών σύμφωνα με τη λειτουργία τους. (Ανατύπωση από: Koonin EV, Makarova KS, Zhang F, Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems, Current opinion in microbiology, 2017;37:67–78)

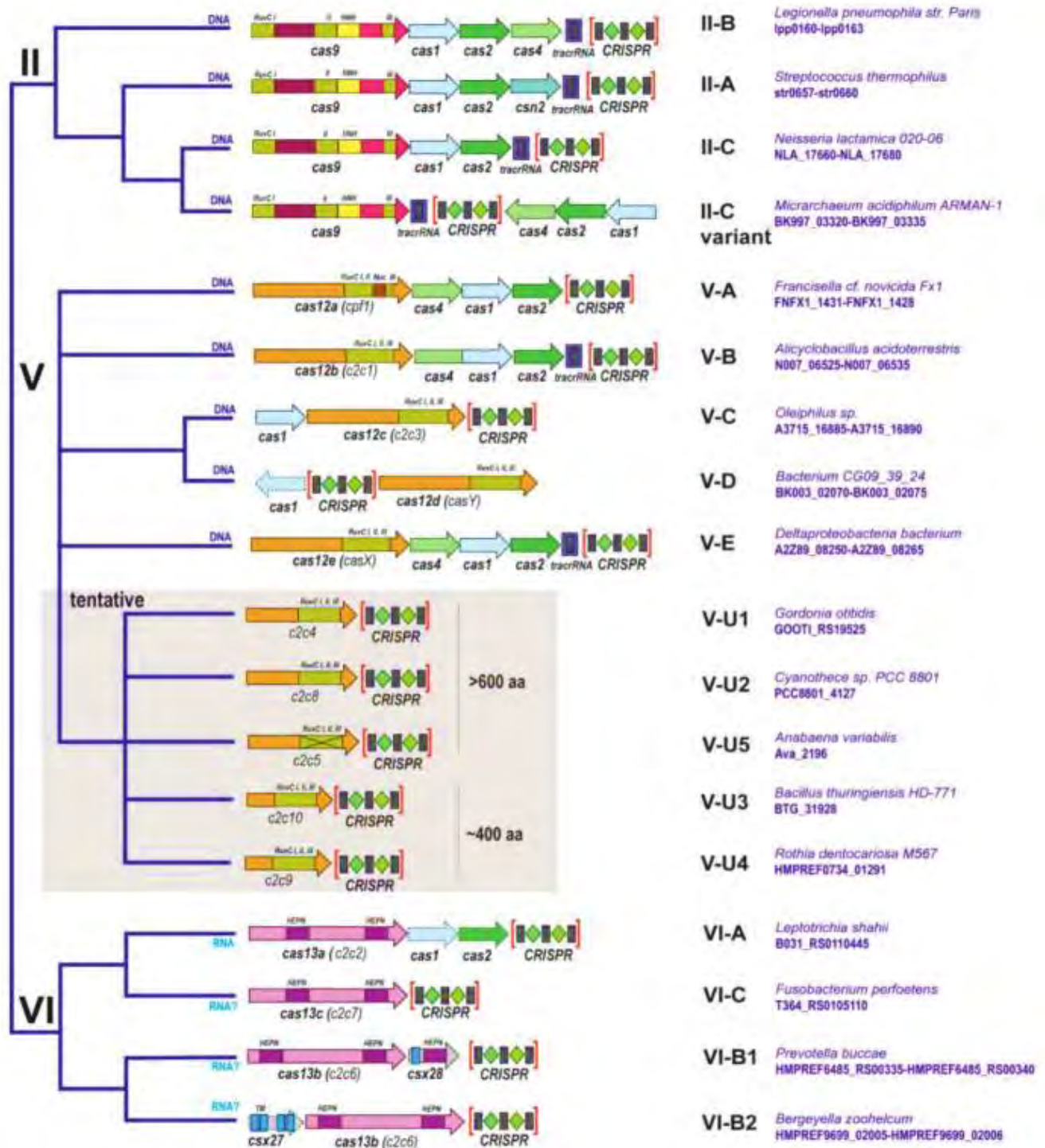
Η Τάξη 1 αποτελείται από πολλαπλά σύμπλοκα crRNP, Cas πρωτεϊνών ως υπομονάδες (Εικόνα 6). Οι πιο κοινοί και διαφοροποιημένοι τύποι, είναι οι τύποι I και II και εντοπίζονται κυρίως σε αρχαία και όχι τόσο συχνά σε βακτήρια. Υπάρχουν και κάποιες πρωτεΐνες Cas, όπως είναι για τον τύπο I η Cas3, η οποία είναι χαρακτηριστική για αυτόν τον τύπο CRISPR/Cas συστήματος. [13]. Παρόλου που κάποια είδη μικροοργανισμών μπορεί να διαθέτουν ίδια τάξη και τύπο CRISPR/Cas συστημάτων, ωστόσο διαθέτουν διαφορετικούς υποτύπους. Εν παραδείγματι, η *P. aeruginosa*, στην οποία εντοπίζονται στελέχη που φέρουν τύπου I-C, I-E και I-F CRISPR/Cas συστήματα [14].

Αντίθετα, τα crRNP σύμπλοκα που αποτελούνται από μία πολυαμινοξική ενιαία Cas πρωτεΐνη, απαρτίζουν την τάξη 2. CRISPR/Cas τόποι που δομούνται με αυτό τον τρόπο, οργανώνονται πιο απλά και ομοιόμορφα από αυτούς τους τόπους που ανήκουν στην τάξη 1 [12] (Εικόνα 7). Η πρωτεΐνη Cas9, η οποία εντοπίζεται σε τύπου II CRISPR/Cas συστήματα, τάξης 2, αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη για μελλοντικές έρευνες πρωτεΐνη. Αυτή η πρωτεΐνη έχει βρεθεί να σχετίζεται με τη διαδικασία

επιλογής του πρωτοδιαχωριστή (στάδιο προσαρμογής), καθώς από μόνη της είναι αρκετή για την crRNA καθοδηγούμενη διάσπαση του DNA στόχου. Τύπου II CRISPR/Cas συστήματα έχουν εντοπιστεί σε προκαρυώτες, όπως είναι οι *Campylobacter jejuni*, *Legionella pneumophila* και *Streptococcus pyogenes* [13]. Σήμερα στόχος πολλών ερευνητών είναι να απομονώσουν αυτό τον μηχανισμό και να τον ενσωματώσουν είτε σε αλλά προκαρυωτικά, είτε ακόμη και σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Μία τέτοια επιτυχημένη εφαρμογή της διαδικασίας, μπορεί να ικανοποιήσει τις ανάγκες γονιδιωματικής επεξεργασίας (genome editing) των οργανισμών. Εν παραδείγματι, μείζον προβλήματα της ιατρικής μικροβιολογίας, όπως είναι η ενσωμάτωση γονιδίων στα γονιδιώματα των μικροοργανισμών, που προσφέρουν ανοχή σε διάφορα αντιβιοτικά μπορεί να αντιμετωπιστεί με την εφαρμογή αυτών των μηχανισμών [15].



Εικόνα 6: Ταξινόμηση CRISPR-Cas συστημάτων Τάξης 1. (Ανατύπωση από: Koonin EV, Makarova KS, Zhang F, Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems, Current opinion in microbiology, 2017;37:67–78)

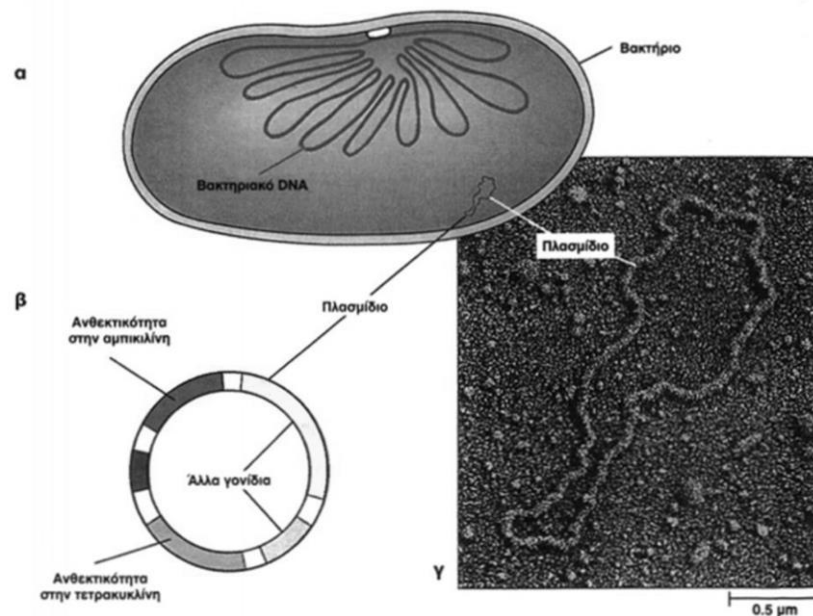


Εικόνα 7: Ταξινόμηση CRISPR-Cas συστημάτων Τάξης 2. (Ανατύπωση από: Koonin EV, Makarova KS, Zhang F, Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems, Current opinion in microbiology, 2017;37:67–78)

1.2 Κινητό Γενετικό Στοιχείο (Mobile Genetic Element - MGE)

1.2.1 Γενικές πληροφορίες

Η ακολουθία DNA η οποία μπορεί να μετακινηθεί από ένα σημείο σε ένα άλλο ή από ένα μόριο DNA σε διαφορετικό (“jumping genes”), ονομάζεται κινητό γενετικό στοιχείο (Mobile Genetic Element - MGE). Τέτοιου τύπου αλληλουχίες συμβάλλουν σημαντικά στην εξέλιξη του γονιδιώματος. Στα κινητά γενετικά στοιχεία ανήκουν δίκλωνες αλληλουχίες DNA, οι οποίες έχουν βρεθεί ότι διαφέρουν σημαντικά στη δομή, στο μέγεθος, στις βιολογικές ιδιότητες καθώς και στους τρόπους μεταφοράς. Τα πιο γνωστά απ’ αυτά είναι τα πλασμίδια (plasmids), τα μεταθετόνια ή τρανσποζόνια (transposons) και τα ενσωματόνια ή ιντεγκρόνια (integrans) που βρέθηκαν να φέρουν κασέτες (gene cassettes) [16].



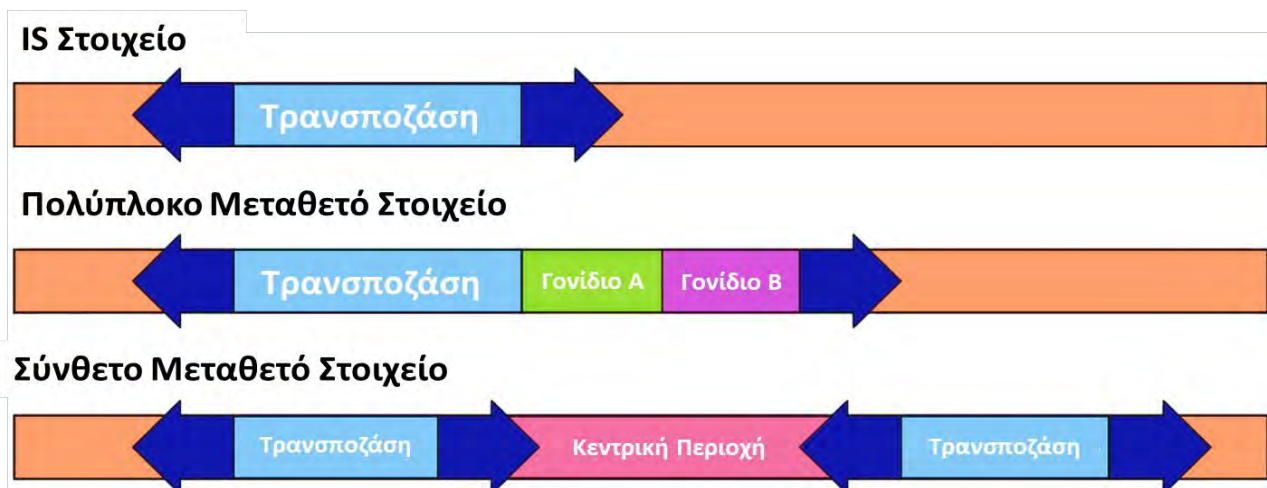
Εικόνα 8: Δομική απεικόνιση πλασμιδίου με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. (Ανατύπωση από: Madigan M, Martinko J, Bender S, Buckley D, Stahl D, Brock Βιολογία των Μικροοργανισμών (14η αμερικανική έκδοση), Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης 2015)

Πλασμίδια: χαρακτηρίζονται ως ρεπλικόνια, ευδιάκριτου μεγέθους που καταφέρνουν να υπάρχουν φυσικά ως εξωχρωμοσωμικό γενετικό υλικό σε διάφορους προκαρυώτες, καθώς και να αντιγράφονται ανεξάρτητα από το χρωμόσωμα. Στην πλειοψηφία τους τα πλασμίδια είναι κυκλικά, υπερελικομένα, δίκλιωνα μόρια DNA (έχουν εντοπιστεί και κάποια γραμμικά) και το μέγεθός τους είναι μεταξύ από

5 kbp έως 2 Mbp. Επιπλέον, έχουν βρεθεί πλασμίδια που σχετίζονται με τη διασπορά νέων γονιδίων, όπως είναι αυτά που προσφέρουν ανθεκτικότητα σε βακτήρια, έναντι αντιβιοτικών (Εικόνα 8).

Η κατηγοριοποίηση των πλασμιδίων έγινε, με κριτήριο τη δυνατότητα μεταφοράς τους, στα συζευκτικά (<10 kb) και στα μη-συζευκτικά (>30 kb). Όσο αφορά τα συζευκτικά πλασμίδια, πολλαπλασιάζονται αυτόνομα, ρυθμίζουν τον αριθμό των αντιγράφων τους μέσα σε κάθε κύτταρο και παραμένουν σταθερά κατά την κυτταρική διαίρεση. Επίσης, σημαντικό χαρακτηριστικό των συζευκτικών βακτηρίων είναι η δυνατότητα μεταφοράς τους μεταξύ των βακτηρίων ίδιου ή διαφορετικού γένους, με το μηχανισμό της σύζευξης (Ενότητα 1.2.2). Από την άλλη, τα μη-συζευκτικά πλασμίδια δεν διαθέτουν γονίδια τα οποία σχετίζονται με την αυτόνομη μεταφορά τους μεταξύ των κυττάρων και για το λόγω αυτό κρίνεται απαραίτητη η συνύπαρξη τους με συζευκτικά πλασμίδια που στις περισσότερες περιπτώσεις υπάρχουν ήδη μέσα στο ίδιο κύτταρο [17].

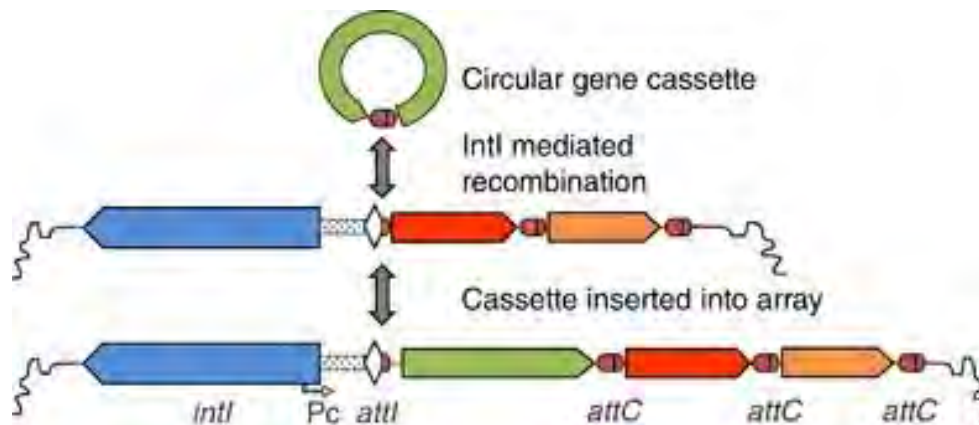
Μεταθετόνια ή Τρανσποζόνια: είναι αλληλουχίες γραμμικού DNA, μήκους 2.5-23 Kb, όπου διαθέτουν μηχανισμούς μετακίνησής τους είτε σε διαφορετικά σημεία του χρωμοσωμικού DNA, είτε σε πλασμίδια και είτε δρουν επικουρικά στη μετακίνηση άλλων αλληλουχιών DNA. Η δομή των τρανσποζονίων περιέχει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame-ORF) που περιέχει το γονίδιο της τρανσποζάσης (μεταθετάσης), μίας πρωτεΐνης, όπου ο ρόλος της σχετίζεται με τη διαδικασία της μεταφοράς. Στα άκρα κάθε μεταθετού στοιχείου παρατηρούνται όμοιες, ανεστραμμένες επαναλήψεις (IR), όπου και σε αυτές θα συνδεθεί η τρανσποζάση [18]. Τα κινητά αυτά γενετικά στοιχεία κατηγοριοποιούνται σε 2 ομάδες:



Εικόνα 9: Είδη Τρανσποζονίων

α) αλληλουχίες εισδοχής (ISs): Κάθε αλληλουχία εισδοχής συγκροτείται από τις τερματικές IRs περιοχές και ένα ORF, που μπορεί να κωδικοποιήσει μόνο τη λειτουργία της μεταφοράς. Το μήκος της είναι περίπου 1-2 kb [19].

β) τρανσποζόνια: Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τόσο τα σύνθετα μεταθετά στοιχεία (composite transposons), όσο τα πολύπλοκα μεταθετά στοιχεία (complex transposons). Τα σύνθετα μεταθετά στοιχεία, αποτελούνται από ένα τμήμα DNA, όπου στις περισσότερες περιπτώσεις, φέρει γονίδιο αντοχής για αντιβιοτικά. Δεξιά και αριστερά αυτού του τμήματος, υπάρχουν δύο αλληλουχίες εισδοχής. Η μεταφορά του μεταθετού αυτού στοιχείου επιτυγχάνεται μέσω των αλληλουχιών εισδοχής, με τις περιοχές IRs να αποτελούν τα όρια του. Παρόλου που το IS μπορεί να αποτελέσει τμήμα από ένα σύνθετο τρανσποζόνιο, αυτό δε σημαίνει ότι θα χάσει την ιδιότητα της ανεξάρτητης λειτουργίας [20]. Με τη σειρά τους, τα πολύπλοκα μεταθετά στοιχεία διαθέτουν μία πιο πολύπλοκη γενετική δομή καθώς δεν ομοιάζουν με τα σύνθετα τρανσποζόνια. Τα πολύπλοκα τρανσποζόνια οριοθετούνται με βραχείες IRs αλληλουχίες που έχουν μήκος, το οποίο εξαρτάται από το μήκος του τρανσποζονίου (15-40 bp). Τα IRs, με λίγα λόγια, οριοθετούν γονίδια όπως η τρανσποζάση, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μετάθεση, αλλά ίσως και γονίδια αντοχής σε αντιβιοτικά. Το γεγονός ότι τα πολύπλοκα μεταθετά στοιχεία διαθέτουν περίπλοκη δομή, η μετάθεσή του γίνεται με τη μεταφορά όλου του τρανσποζονίου (Εικόνα 9) [21].



Εικόνα 10: Μηχανισμός και δομή ενσωματονίου (Τάξη I). (Ανατύπωση από: Gillings MR, Gaze WH, Pruden A, Smalla K, Tiedje JM, Zhu YG, Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution, The ISME journal, 2015;9(6):1269–1279)

Ενσωματόνιο (ή ιντεγκρόνιο): είναι ευπροσάρμοστο σύστημα απόκτησης γονιδίων. Δηλαδή, επιτρέπει την αποτελεσματική ενσωμάτωση και έκφραση εξωγενών γονιδίων. Όλα τα ενσωματόνια αποτελούνται από τρία χαρακτηριστικά τμήματα: 1) την ενσωματάση (*intI* γονίδιο), υπεύθυνη για την

ενσωμάτωση του ξένου γονιδίου, 2) μία θέση ανασυνδυασμού (site *attI*) και 3) έναν εξαιρετικά αποτελεσματικό προαγωγέα (promoter *Pc*), ο οποίος είναι ενσωματωμένος στο *intI* γονίδιο, προς τη μεριά της θέσης ενσωμάτωσης των γονιδίων κασέτας [22]. Ο προαγωγέας αυτός, ρυθμίζει την ένταση της έκφρασης των γονιδίων της κασέτας. Ένα ενσωματόνιο μπορεί να περιέχει παραπάνω από μία κασέτα, δηλαδή να έχει ενσωματώσει παραπάνω από ένα εξωγενή γονίδιο. Οι συστοιχίες των κασετών είναι οι μεταβλητές αλληλουχίες και οι κινητές μονάδες ενός ενσωματόνιου. Τέλος, η επιδημιολογία των ενσωματονίων σχετίζεται με την ραγδαία αύξηση της πολλαπλής αντοχής στα αντιβιοτικά των *Enterobacteriaceae* [23].

1.2.2 Μηχανισμοί οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων

Οριζόντια μεταφορά γονιδίων είναι η απευθείας μεταφορά γονιδίων από ένα είδος (δότη) σε κύτταρα από ένα άλλο είδος (δέκτη). Στα βακτηριακά κύτταρα, η οριζόντια μεταφορά είναι ο κυριότερος μηχανισμός επιβίωσης τους από δυσμενείς καταστάσεις, μέσω της εξελικτικής πίεσης, αλλάζοντας, δηλαδή, το γονιδίωμα τους.

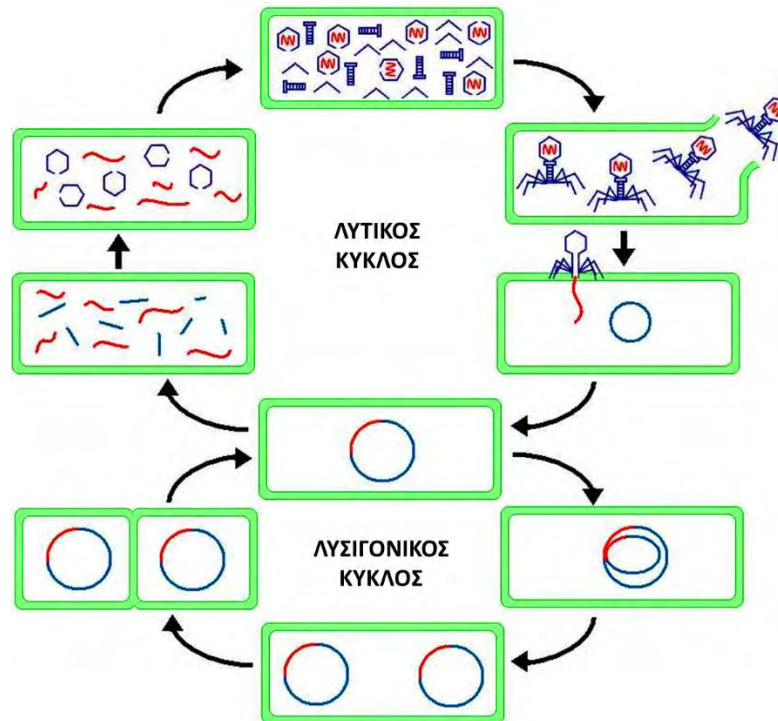
Τρεις μηχανισμοί οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων στα βακτηριακά κύτταρα έχουν παρατηρηθεί:

Σύζευξη (Conjugation): σε αυτό το μηχανισμό πραγματοποιείται αποκλειστικά μεταφορά πλασμιδίου σε μη συγγενικά κύτταρα ή ακόμη και σε κύτταρα μεταξύ διαφορετικών ειδών. Απαραίτητη προϋπόθεση της σύζευξης είναι η άμεση επαφή των κυττάρων. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως (Ενότητα 1.2.1), τα συζευκτικά πλασμίδια εκμεταλλεύονται αυτό το μηχανισμό για τη μεταφορά πλασμιδιακών αντιγράφων σε διαφορετικά κύτταρα. Στη σύζευξη παρατηρείται η παρουσία του κυττάρου-δότη, το οποίο φέρει το συζευκτικό πλασμίδιο, και ενός δεύτερου κυττάρου-δέκτη, που δεν περιέχει το συγκεκριμένο πλασμίδιο. Επιπρόσθετα, κατά τη διαδικασία της σύζευξης έχει παρατηρηθεί και η συ-μεταφορά πλασμιδίων που από μόνα τους δεν είναι ικανά να μεταφερθούν σε νέα κύτταρα [24].

Μεταγωγή (Transduction): σε αυτό το μηχανισμό μέσω βακτηριοφάγων, πραγματοποιείται μεταφορά γονιδίων από ένα βακτηριακό κύτταρο-δότη σε ένα βακτηριακό κύτταρο-δέκτη.

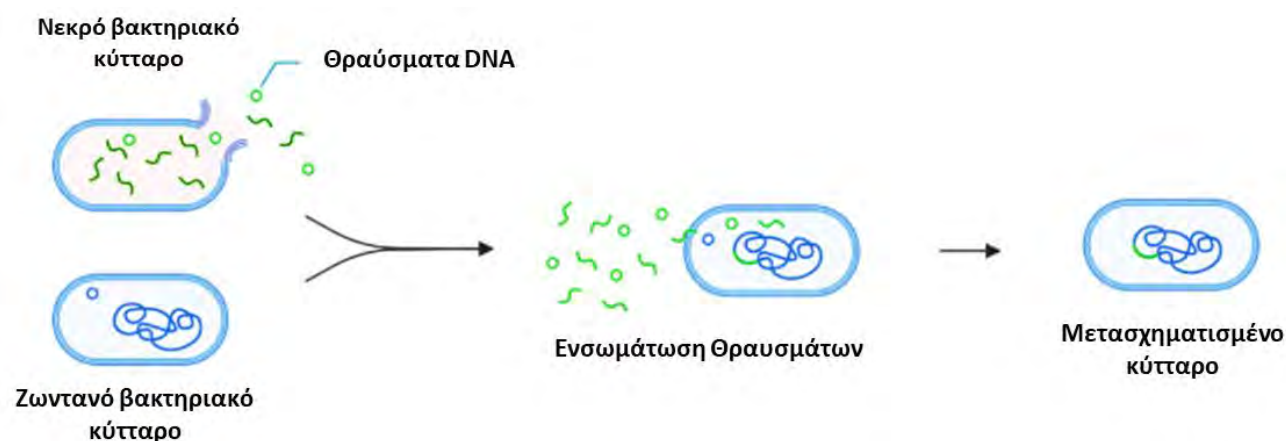
Πιο συγκεκριμένα, φάγοι (ή βακτηριοφάγοι) ορίζονται οι ιοί των βακτηρίων οι οποίοι έχουν την ικανότητα, διαθέτοντας πρωτεϊνικό περίβλημα, να επιβιώνουν εξωκυτταρικά. Το γενετικό τους υλικό μπορεί να αποτελείται από διπλή έλικα DNA (dsDNA), μονή έλικα DNA (ssDNA) ή RNA. Προκειμένου να πολλαπλασιαστούν οι φάγοι, είτε θα ενσωματώσουν το γονιδίωμά τους στο χρωμόσωμα του βακτηρίου και έτσι θα μεταβιβαστεί στα θυγατρικά του (λυσιγονικός κύκλος), είτε

θα πολλαπλασιαστούν ενδοκυττάρια και η απελευθέρωση τους θα προξενήσει λύση στο κύτταρο (λυτικός κύκλος). (Εικόνα 10). Επιπρόσθετα, μέσω της μεταγωγής μπορεί να προκύψει και μεταφορά βακτηριακού γονιδίου ή γενικότερα τμήμα βακτηριακού χρωμοσωμικού DNA από ένα βακτήριο σε ένα άλλο [25].



Εικόνα 11: Αντιγραφή φάγου – Λυτικός και Λυσιγονικός κύκλος

Μετασχηματισμός (Transformation): αποτελεί ένα μηχανισμό κατά τον οποίο, ένα τμήμα DNA ή ένα ολόκληρο πλασμίδιο που προέρχεται από ένα αποδομημένο, νεκρό βακτήριο μπορεί και εισέρχεται σε ένα άλλο βακτήριο-δέκτη. Το τμήμα DNA που καταφέρνει να μπει στο νέο βακτήριο, ή θα καταστραφεί, ή θα ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του βακτηρίου αυτού. Το πλασμίδιο με τη σειρά του, λόγω της ικανότητας του να αντιγράφεται αυτόνομα, θα επιβιώσει προσφέροντας στο δέκτη νέες ιδιότητες ή θα καταστραφεί κι αυτό. Δεν είναι όλα τα βακτήρια ικανά να δεχτούν ξένο-γυμνό DNA [24] (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Μηχανισμός μετασχηματισμού βακτηρίων.

1.3 Gram-αρνητικά βακτήρια

Τα gram-αρνητικά βακτήρια είναι βακτήρια των οποίων το όνομα προέκυψε καθώς δε καταφέρουν να διατηρήσουν τη χρωστική crystal violet, στην κυτταροπλασματική τους μεμβράνη, στη Gram χρώση (σε αντίθεση με τα gram-θετικά βακτήρια) που χρησιμοποιείται για τη βακτηριακή κατηγοριοποίηση. Τόσο τα gram-θετικά, όσο και τα gram⁻ βακτήρια, βρίσκονται σε όλα τα περιβάλλοντα στον πλανήτη, που σημαίνει, ότι ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού μπορούν και επιβιώσουν σε διάφορες συνθήκες [24].

Πιο ειδικά, όσο αφορά, τη συσχέτιση τους με τον άνθρωπο, κάποια εμφανίζουν παθογονικότητα. Τρία από τα πιο γνωστά gram-αρνητικά βακτήρια με παθογόνα δράση για τον ανθρώπινο οργανισμό, που συναντούμε συχνά, είναι τα *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* και τα *Klebsiella pneumoniae*. Τα τρία αυτά βακτηρίδια, ανήκουν στα ESKAPE παθογόνα (ESKAPE pathogens) και αποτελούν πλέον αντικείμενο εμπεριστατωμένης έρευνας, καθώς τα τελευταία χρόνια, έχουν εμφανίσει αντοχή σε διάφορα αντιβιοτικά και ευθύνονται κυρίως για ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις. Στα ESKAPE παθογόνα ανήκουν επίσης τα *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, και *Enterobacter spp* [26].

1.3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Η *Pseudomonas* (Εικόνα 13) είναι ο βασικότερος εκπρόσωπος από τα αζυμωτικά βακτήρια και η απομόνωσή του έγινε από τον Gessard, το 1882 (Πίνακας 1). Περισσότερα από εκατό-εξήντα είδη διαφορετικών ψευδομονάδων έχουν διαχωριστεί και ταυτοποιηθεί, έως σήμερα. Ωστόσο, μόνο αυτά που χαρακτηρίζονται αποικιστές για τον άνθρωπο (*P. pseudoalgaligenes*, *P. alcaligenes* *P. mendocina*,

P. stutzeri, *P. putida*, *P. fluorescens* και *P. aeruginosa*) και δρουν ως παθογόνοι παράγοντες ή ως συμπαράγοντες νόσων ενδιαφέρουν τη Κλινική Μικροβιολογία , [27]. Η *P. aeruginosa* ανήκει στους προαιρετικά αερόβιους μικροοργανισμούς και βρίσκεται κυρίως στο περιβάλλον. Ωστόσο, προσβάλλει και τον άνθρωπο προκαλώντας σοβαρές ασθένειες, κυρίως στους πνεύμονες και στο αίμα αλλά και σε σημεία του σώματος που έχει πραγματοποιηθεί πρόσφατα κάποια χειρουργική επέμβαση. Η σοβαρότητα των ασθενειών που προκαλούνται από αυτό το βακτήριο οφείλεται κυρίως στην αυξημένη αντοχή του σε αντιβιοτικά [28]. Η καταστροφή του *P. aeruginosa* επιτυγχάνεται σε θερμοκρασία 55°C μέσα σε μία ώρα. Στο περιβάλλον καταφέρνει και ζει στο νερό για αρκετούς μήνες. Η επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός του επιτυγχάνεται σε μικρές υγρές συλλογές και σε υγρές επιφάνειες, σε διάφορα θεραπευτικά υγρά, ακόμη και σε συνθήκες όπου υπάρχουν αντισηπτικά διαλύματα. Μπορεί να διατηρηθεί και σε θερμοκρασία κοινού ψυγείου [29].

Ορισμένες χαρακτηριστικές ιδιότητες του *P. aeruginosa* είναι οι παρακάτω [27, 29]:

1. Η παραγωγή οξειδάσης
2. Η παραγωγή καταλάσης
3. Η μη ζύμωση της γλυκόζης
4. Η απουσία παραγωγής θειικού οξέος
5. Η μη διάσπαση της λακτόζης
6. Η διάσπαση της γλυκόζης, χωρίς την παραγωγή κάποιου αερίου και μέσω οξείδωσης
7. Η διάσπαση του γλυκονικού καλίου μέσω της οξείδωσης
8. Υδρόλυση της αργινίνης (96-98% των στελεχών)

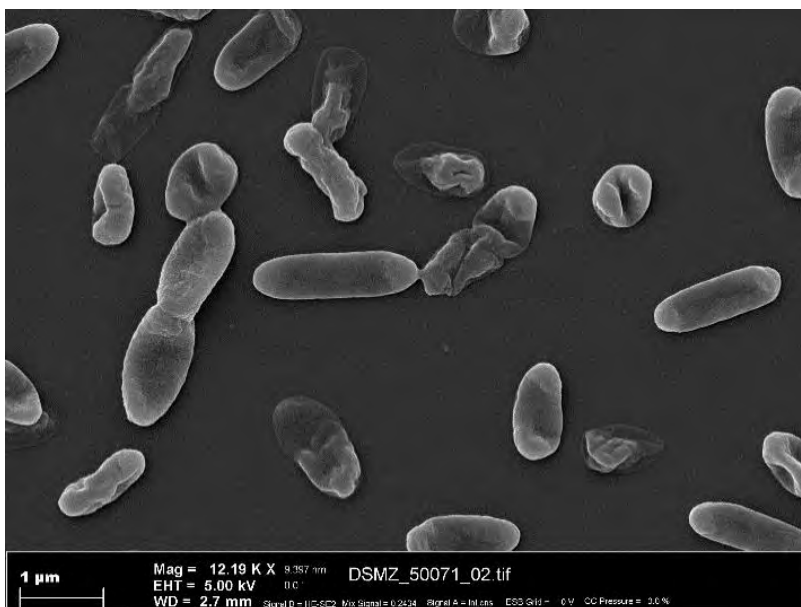


Εικόνα 13: Ύπαρξη αποικιών *Pseudomonas aeruginosa* σε θρεπτικό άγαρ MacConkey.

Επιστημονική ταξινόμηση <i>P. aeruginosa</i>	
Domain	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Pseudomonadota</i>
Class	<i>Gammaproteobacteria</i>
Order	<i>Pseudomonadales</i>
Family	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genus	<i>Pseudomonas</i>
Species	<i>P. aeruginosa</i>

Πίνακας 1: Επιστημονική ταξινόμηση του *P. aeruginosa*.

Τα στελέχη *P. aeruginosa*, όσο αφορά τη μορφολογία τους ανήκουν στα Gram-αρνητικά βακτήρια, και έχουν σώμα ραβδοειδές ελαφρώς κεκαμμένο, με μήκος 0,2-0,6μm και διατεταγμένα στο χώρο είτε το καθένα χωριστά είτε σε ζεύγη (Εικόνα 14). Η κίνηση τους πραγματοποιείται με τη χρησιμοποίηση των πολικών βλεφαρίδων που φέρουν [30]. Όσο αφορά το γονιδίωμα του *P. aeruginosa* έχει μήκος 5,5–7 Mbp (65-67% G-C) και απαρτίζεται από μία ποικιλία πλασμιδίων και από ένα κυκλικό χρωμόσωμα [31].



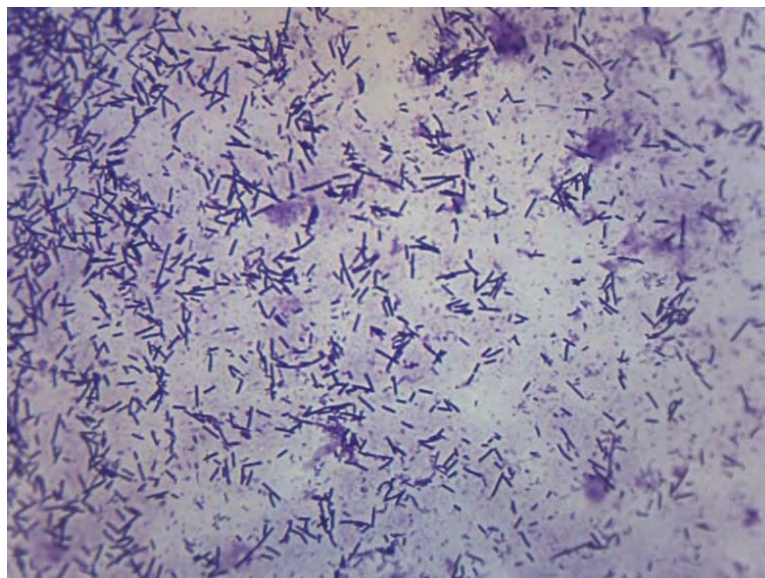
Εικόνα 14: *Pseudomonas aeruginosa* – εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Ανατύπωση από: Reimer LC, Vetscininova A, Carbasse JS, Söhnngen C, Gleim D, Ebeling C, Overmann J, BacDive in 2019: bacterial phenotypic data for High-throughput biodiversity analysis, Nucleic acids research, 2019;47(D1):D631–D636)

Η καλλιέργεια του βακτηρίου αυτού, στο εργαστήριο, μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ποικίλα θρεπτικά μέσα όπως είναι το Αιματούχο (Blood) agar, Mueller-Hinton (MH) agar και MacConkey agar. Η θερμοκρασία όπου εμφανίζεται ανάπτυξη της καλλιέργειας είναι από τους 7°C (minimum) έως και τους 44°C (maximum), με την ιδανική θερμοκρασία να σημειώνεται στους 37°C, ενώ το εύρος του pH είναι 5-9 [31].

1.3.2 *Escherichia coli*

Η *Escherichia coli* είναι ένα gram⁻ βακτήριο (Εικόνα 15), προαιρετικά αναερόβιο, με ραβδοειδή μορφή και ανήκει στην οικογένεια των εντεροβακτηριοειδών (Πίνακας 2). Έχει μήκος περίπου 2,0 μm και διάμετρο 0,25-1,0 μm. Στην πλειοψηφία τους τα περισσότερα είδη *E. coli* είναι αβλαβή και επωφελή για τον οργανισμό. Αρκετά από αυτά τα βακτήρια βρίσκονται στο στομάχι θερμόαιμων ζώων, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, και παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου [32].

Οι ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης της *E. coli*, σε αερόβια ή αναερόβια καλλιέργεια, στο εργαστήριο είναι 37°C (23-40°C). Το μέσο ανάπτυξης μπορεί να είναι είτε υγρή, είτε στερεή καλλιέργεια αρκεί να περιέχονται γλυκόζη, φωσφορικό αμμώνιο, χλωριούχο νάτριο, θειικό μαγνήσιο, φωσφορικό κάλιο και νερό. Θρεπτικά μέσα όπως MacConkey agar, Mueller-Hinton (MH) agar και Αιματούχο (Blood) agar, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη [33].



Εικόνα 15: Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο *E. coli*

Όσο αφορά το γονιδίωμα της *E. coli*, το μέγεθός του ποικίλει από 4,5-5,5 Mb και κάθε κύτταρο αυτού του μικροοργανισμού παράγει πάνω από 4.200 πρωτεΐνες. Επιπλέον, συχνά τα στελέχη *E. coli* φέρουν και πλασμίδια [34]. Το γονιδίωμα, επίσης, περιέχει σημαντικό αριθμό μεταθετών γενετικών στοιχείων, αλληλουχίες εισδοχής (insertion sequence; IS) και υπολείμματα βακτηριοφάγων [35].

Χαρακτηριστικές ιδιότητες της *E. coli* είναι οι εξής [24, 36]:

1. Παράγει γαλακτικό, αιθανόλη, οξικό και διοξείδιο του άνθρακα.
2. Συμβιώνουν συχνά με μεθανογόνα βακτήρια ή βακτήρια που μειώνουν τα θειικά.
3. Μεταβολίζει γλυκόζη και λακτόζη.
4. Δε μεταβολίζει τα σάκχαρα αραβινόζη, ξυλόζη, σορβιτόλη, ραμνόζη και ριβόζη.

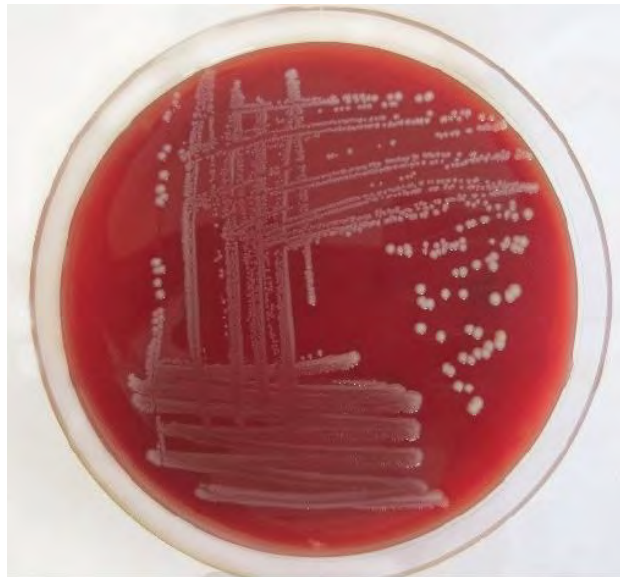
Επιστημονική ταξινόμηση <i>E. coli</i>	
Domain	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Pseudomonadota</i>
Class	<i>Gammaproteobacteria</i>
Order	<i>Enterobacterales</i>
Family	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genus	<i>Escherichia</i>
Species	<i>E. coli</i>

Πίνακας 2: Η επιστημονική ταξινόμηση της *E. coli*.

1.3.3 *Klebsiella pneumoniae*

Η *Klebsiella pneumoniae* (Εικόνα 16), όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ανήκει στα gram⁻ βακτήρια και πρώτη φορά βρέθηκε στους πνεύμονες ατόμων που πέθαναν από πνευμονία, από τον Carl Friedlander το 1882 (Πίνακας 3). Είναι ραβδόμορφα βακτήρια, συνήθως μη κινητά και περιβάλλονται από πολυσακχαριδική κάψουλα. Το μέγεθος τους κυμαίνεται από 0,3-1 μm (διάμετρος) και 0,6-6 μm (μήκος) και εντοπίζονται μονήρη, σε ζεύγη ή σχηματίζουν μικρές αλυσίδες [37]. Η *K. pneumoniae* βρίσκεται σε αφθονία στο περιβάλλον τόσο στο έδαφος όσο και σε υδάτινα

ενδαιτήματα. Στον άνθρωπο εντοπίζονται φυσιολογικά στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα και στο γαστρεντερικό σωλήνα, ωστόσο η διείσδυση τους σε άλλα όργανα τα καθιστά δυνητικά παθογόνα [38].



Εικόνα 16: Αποικίες *Klebsiella pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό αιματούχο άγαρ

Όσο αφορά τις συνθήκες καλλιέργειάς της, αναπτύσσεται στους 37°C, χωρίς την ανάγκη ύπαρξης αυξητικού παράγοντα, με εξαίρεση συγκεκριμένα υποείδη, όπως το *K. rhinoscleromatis* που απαιτεί αργινίνη και ουρακίλη. Τα διάφορα θρεπτικά μέσα στα οποία μπορεί να αναπτυχθεί είναι το MacConkey agar, το Mueller-Hinton (MH) agar και το Αιματούχο (Blood) agar. Αμμωνιακά ή νιτρικά ιόντα και γλυκόζη παρέχονται ως πηγή αζώτου και άνθρακα, αντίστοιχα. Η συντήρησή τους γίνεται στους -80°C σε ζωμό με γλυκερόλη περιεκτικότητας 10-50% v/v ή σε θερμοκρασία δωματίου σε ημιστερεό άγαρ [39].

Συμπληρωματικά, σχετικά με το γονιδίωμα της *K. pneumoniae* είναι περίπου 5-6 Mbp, σε μέγεθος, (περίπου 58% GC) και κωδικοποιούνται περίπου 5.000-6.000 γονίδια. Επίσης, πέραν του χρωμοσώματος έχει βρεθεί να φέρει και πλασμίδια [40].

Χαρακτηριστικές ιδιότητες του *K. pneumoniae* είναι οι εξής [37, 39]:

1. Παράγει οξειδάση
2. Παράγει καταλάση
3. Μεταβολίζει τη γλυκόζη
4. Υδρολύει την ουρία και όχι την αργινίνη

5. Αποκαρβοξυλιώνει τη λυσίνη και όχι την ορνιθίνη
6. Ζυμώνει D-μαννιτόλη, σουκρόζη, λακτόζη και D-σορβιτόλη

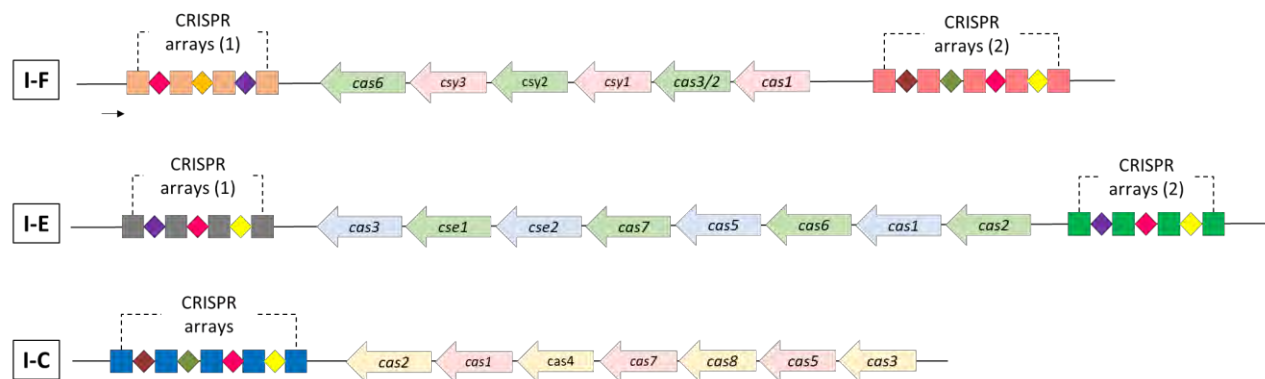
Επιστημονική ταξινόμηση <i>K. pneumoniae</i>	
Domain	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Pseudomonadota</i>
Class	<i>Gammaproteobacteria</i>
Order	<i>Enterobacterales</i>
Family	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genus	<i>Klebsiella</i>
Species	<i>K. pneumoniae</i>

Πίνακας 3: Η επιστημονική ταξινόμηση της *K. pneumoniae*

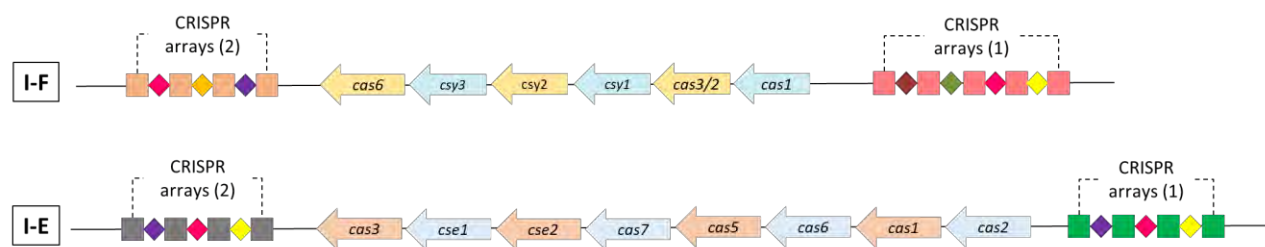
1.4 CRISPR/Cas συστήματα σε *P. aeruginosa*, *E. coli* και *K. pneumoniae*

Τα τελευταία χρόνια έχουν βρεθεί και ταξινομηθεί διάφορα CRISPR/Cas συστήματα τα οποία αναφέρθηκαν και προηγουμένως. Στην Εικόνα 17 παρουσιάζονται τα συστήματα αυτά όπως έχουν προκύψει από τη βιβλιογραφία. Ειδικότερα, στο *P. aeruginosa* έχουν εντοπιστεί 3 διαφορετικά μεταξύ τους CRISPR/Cas συστήματα τύπου I-C, I-E και I-F [14], ενώ στην *E. coli* τα συστήματα που βρέθηκαν είναι τύπου I-E και I-F [41]. Όσο αφορά την *K. pneumoniae*, έχει βρεθεί να φέρει τύπου I-E και I-E* CRISPR/Cas συστήματα [42]. Αν και κάποια είδη βακτηρίων φαίνεται να φέρουν ίδιου τύπου συστήματα (I-E και I-F CRISPR/Cas συστήματα), ωστόσο μεταξύ των ειδών αυτών εμφανίζονται σημαντικές διαφορές [13].

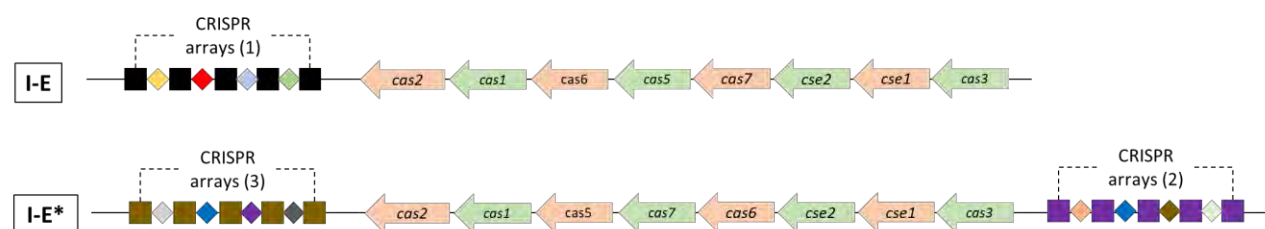
Pseudomonas aeruginosa



Escherichia coli



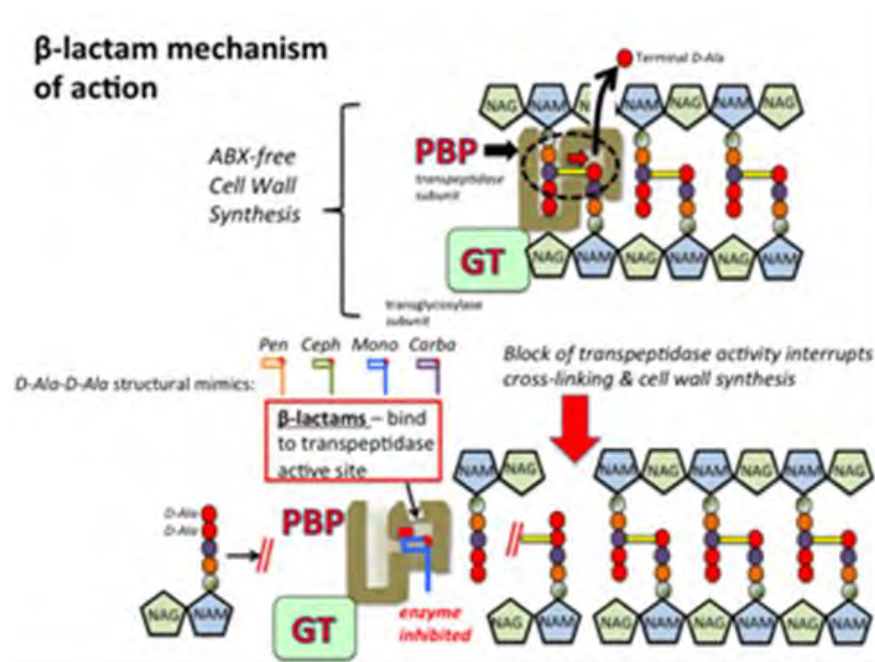
Klebsiella pneumoniae



Εικόνα 17: CRISPR/Cas συστήματα των υπό μελέτη μικροβίων

1.5 Αντοχή βακτηρίων στα β-λακταμικά αντιβιοτικά

Η αντιμετώπιση των παθογόνων βακτηρίων, γίνεται εδώ και πάρα πολλά χρόνια αξιοποιώντας τη δράση που έχουν τα αντιβιοτικά σε αυτά. Ωστόσο, η θεραπεία των λοιμώξεων από αυτά τα βακτήρια, με τη χρήση διαφόρων αντιβιοτικών που είναι διαθέσιμα στην αγορά, όπως τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, αποτελεί σήμερα μία μεγάλη πρόκληση. Πολλά βακτήρια έχουν αναπτύξει αντοχή σε πληθώρα αντιβιοτικών.

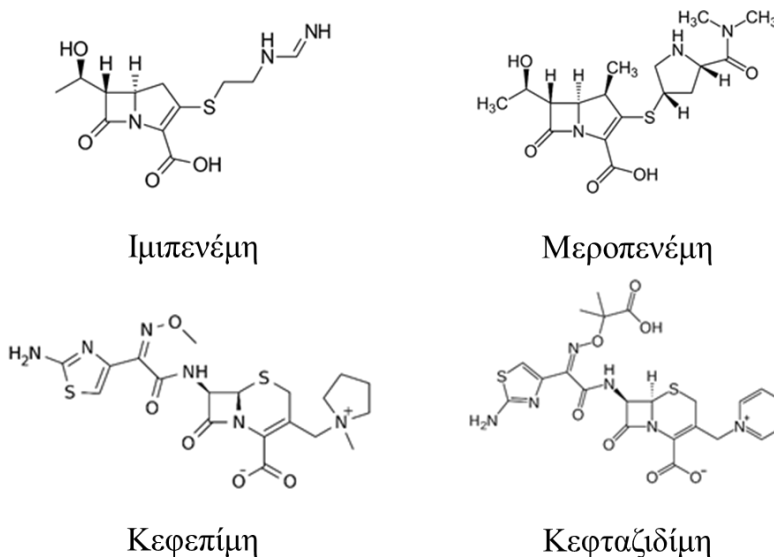


Εικόνα 18: Τρόπος δράσης των β-λακταμικών αντιβιοτικών και β-λακταμάσες. (Ανατύπωση από: Zango UU, Ibrahim M, Shawai SAA, Shamsuddin IM, A review on β-lactam antibiotic drug resistance, MOJ Drug Design Development & Therapy, 2019;3(2):52-58)

Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά δυσκολεύουν τη δράση των πενικιλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών (Penicillin Binding proteins-PBPs) μέσω ενός δακτυλίου β-λακτάμης που περιέχει άζωτο. Οι PBPs λειτουργούν ως τρανσπεπτιδάσες και καταλύουν την τρανσπεπτιδίωση της πεπτιδογλυκάνης καθώς σχετίζονται με τη σύνθεση των πεπτιδογλυκάνων. Για αυτό το λόγο λοιπόν, τα β-λακταμικά αντιβιοτικά ωθούν σε θανάτωση τα βακτήρια καθώς επιτυγχάνουν τελικά τη λύση τους (Εικόνα 18). Παγκοσμίως, τα αντιβιοτικά που παράγονται και χρησιμοποιούνται σε ποσοστό πάνω από 50% του συνόλου των αντιβιοτικών, είναι τα β-λακταμικά αντιβιοτικά [43].

Οι κεφαλοσπορίνες και οι καρβαπενέμες αποτελούν τις πιο γνωστές κατηγορίες β-λακταμικών αντιβιοτικών στα οποία εμφανίζονται όλο και περισσότερα ανθεκτικά στελέχη *P. aeruginosa*, *E. coli* και *K. pneumoniae*. Από όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, οι καρβαπενέμες κατέχουν το πιο ευρύ φάσμα αντιμικροβιακής δράσης μεταξύ των β-λακταμικών αντιβιοτικών. Σε σχέση με άλλα β-λακταμικά αντιβιοτικά, τον τερματισμό της δράσης των PBP-2 και PBP-1 ή PBP-2 και PBP-3 τον επιτυγχάνουν οι καρβαπενέμες, και πιο συγκεκριμένα η ιμιπενέμη (Imipenem) και η μεροπενέμη (Meropenem), με αποτέλεσμα την γρήγορη λύση του βακτηρίου [44]. Οι κεφαλοσπορίνες, έχουν κι αυτές βακτηριοκτόνα δράση και παράγονται από το μύκητα *Cephalosporium sp.* Ο ρόλος τους ως βακτηριοκτόνο αντιβιοτικό είναι να δεσμεύεται μη αντιστρεπτά στις PBPs και να παρεμποδίζει τη

διασύνδεση της πεπτιδογλυκάνης. Πιο ανθεκτικές στις β-λακταμάσες, τα ένζυμα, δηλαδή, που καταστρέφουν το δακτύλιο των β-λακταμικών αντιβιοτικών, είναι, οι κεφαλοσπορίνες. Οι κεφαλοσπορίνες κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις γενιές. Η κεφταζιδίμη (Ceftazidime-3^{ης} γενιάς) και η κεφεπίμη (Cefepime-4^{ης} γενιάς) είναι τα πιο γνωστά αντιβιοτικά για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων [24].



Εικόνα 19: Δομικοί τύποι τεσσάρων β-λακταμικών αντιβιοτικών.

1.6 β-λακταμάσες

Η βιοσύνθεση των β-λακταμασών (Εικόνα 20) είναι ο σημαντικότερος μηχανισμός άμυνας Gram-αρνητικών βακτηριδίων, εναντίον των β-λακταμικών αντιβιοτικών. Τουλάχιστον οχτακόσιες β-λακταμάσες έχουν βρεθεί και ταυτοποιηθεί σε Gram-αρνητικά βακτήρια [45]. Η διασπορά των γονιδίων αντοχής και ειδικότερα των γονιδίων που κωδικοποιούν τις β-λακταμάσες στα βακτήρια, έχει βρεθεί ότι μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη συμβολή των κινητών γενετικών στοιχείων [46].

Οι β-λακταμάσες χωρίζονται σε τέσσερις τάξεις, A-D, με βάση την αμινοξική τους αλληλουχία. Στις β-λακταμάσες, κλάσης B, βρέθηκαν ιόντα ψευδαργύρου στο ενεργό τους κέντρο και γι' αυτό το λόγο ονομάζονται αλλιώς και ως μέταλλο-β-λακταμάσες (MBLs). Σημαντικό κρίνεται ότι, οι μέταλλο-β-λακταμάσες εξελίσσονται ραγδαία και καταφέρνουν να υδρολύουν τα περισσότερα β-λακταμικά αντιβιοτικά, όπως είναι οι καρβαπενέμες [47]. Οι μέταλλο-β-λακταμάσες, με τη σειρά τους, ομαδοποιούνται σε 8 οικογένειες: NDMs, IMPs, VIMs, SPM-1, GIM-1, AIM-1, SIM-1 και DIM-1, με τις τρεις πρώτες να εντοπίζονται πιο συχνά στα Gram-αρνητικά βακτήρια. Η ραγδαία

αύξηση της εξέλιξης και επικράτησης των MBLs, έχει ωθήσει τους ερευνητές να βρουν τρόπους με σκοπό να αντιμετωπίσουν την ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα β-λακταμικά αντιβιοτικά [45]. Θα αποτελούσε παράληψη να μη γίνει αναφορά συγκεκριμένα σε δύο ακόμα καρβαπενεμάσες, τις KPC (κλάσης A) και OXA-48-like (κλάσης D), οι οποίες παρατηρούνται ευρέως σε στελέχη εντεροβακτηριδίων (carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* - CRE), κυρίως σε χώρες της Μεσογείου, Βαλκάνια, Μέση Ανατολή και Βόρεια Αφρική [48].



Εικόνα 20: Δομή της σερίνης β-λακταμάσης από *Streptomyces albus*. (Ανατύπωση από: Interpro–Classification of protein families (Beta-lactamase) Ημερομηνία πρόσβασης 09/02/2024 από: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/pfam/PF00144/>)

2 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν ο χαρακτηρισμός CRISPR/Cas συστημάτων από κλινικά στελέχη των μικροοργανισμών *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* και *Klebsiella pneumoniae*. Ο σκοπός αυτός θα επιτευχθεί μέσω αναζήτησης της διασποράς αλλά και του ρόλου των συστημάτων αυτών. Επιπλέον, μέσω βιοπληροφοριακής ανάλυσης των διαχωριστών που θα βρούμε, θα συλλέξουμε πληροφορίες για τα γενετικά στοιχεία που έχουν έρθει σε επαφή (ή θα βρεθούν να αλληλεπιδρούν σε μία «νέα εισβολή»). Τα παραπάνω δεδομένα θα αξιοποιηθούν σε μελλοντικές μελέτες. Αφορμή για την πραγματοποίηση αυτής της μελέτης ήταν το γεγονός ότι, στα βακτήρια έχουν βρεθεί CRISPR/Cas συστήματα να λειτουργούν ως μηχανισμοί άμυνας έναντι διαφόρων κινητών γενετικών στοιχείων, αλλά και το κενό των γνώσεων που υπάρχει σχετικά με τη δράση αυτών των συστημάτων.

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Συλλογή κλινικών δειγμάτων από ασθενής του ΠΓΝΛ

Με τη συμβολή του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (ΠΓΝΛ) συλλέξαμε 260 κλινικά στελέχη Gram-αρνητικών βακτηριδίων (100 στελέχη *P. aeruginosa*, 100 στελέχη *E. coli* και 60 στελέχη *K. pneumoniae*) από ασθενής διαφόρων κλινικών, τη χρονική περίοδο 2019-2020. Η προέλευση αυτών των κλινικών στελεχών παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4).

Προέλευση Δειγμάτων	Αριθμός Δειγμάτων (<i>P. aeruginosa</i>)	Αριθμός Δειγμάτων (<i>E.coli</i>)	Αριθμός Δειγμάτων (<i>K. pneumoniae</i>)
Αίμα	29 (29%)	29 (29%)	16 (26,7%)
Ούρα	18 (18%)	65 (65%)	21 (35%)
Πλευριτικό υγρό	1 (1%)	-	-
Πτύελο	13 (13%)	1 (1%)	5 (8,3%)
Πύον	11 (11%)	3 (3%)	3 (5%)
E.N.Y.	-	-	2 (3,3%)
Ιστός	4 (4%)	-	-
Ωτικό έκκριμα	5 (5%)	-	-
Υγρό (νευροχειρουργική)	1 (5%)	-	-
Τραύμα	2 (2%)	-	2 (3,3%)
Καθετήρας	1 (1%)	-	4 (6,7%)
Βρογχικές εκκρίσεις	8 (8%)	-	1 (1,7%)
Δείγμα επιφανειών	1 (1%)	-	1 (1,7%)
Φαρυγγικό	1 (1%)	-	-
Τραχειοσωλήνας	2 (2%)	-	-
K.F.G.	1 (1%)	-	-
Οφθαλμικό έκκριμα	1 (1%)	-	-
Υγρό παροχέτευσης	1 (1%)	-	-
Κόπρανα	-	-	1 (1,7%)
Άγνωστο	-	2 (2%)	4 (6,7%)

Πίνακας 4: Διασπορά των στελεχών *P.aeruginosa*, *E. coli* και *K. pneumoniae* ανά είδος κλινικού δείγματος

3.2 Καλλιέργεια κλινικών δειγμάτων από τα οποία έγινε απομόνωση των στελεχών *P. aeruginosa*, *E.coli* και *K. pneumoniae*

Τα κλινικά δείγματα που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη ενότητα καλλιεργήθηκαν σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα, όπως σε Αιματούχο (Blood) άγαρ, Mueller-Hinton (MH) άγαρ και MacConkey άγαρ. Μετά τον εμβολιασμό, ακολούθησε, η επώαση των καλλιεργειών σε κλίβανο υπό αερόβιες συνθήκες και σε θερμοκρασία 37°C, για 18-24h. Στη συνέχεια, αφού διαπιστώσαμε την ύπαρξη ανάπτυξης αποικιών, ακολούθησε η συντήρηση όλων των στελεχών σε θρεπτικό ζωμό (tryptic soy broth), ο οποίος είχε περιεκτικότητα 20% σε γλυκερόλη. Όλα τα δείγματα διατηρήθηκαν σε βαθιά κατάψυξη στους -80°C.

3.3 Ταυτοποίηση των στελεχών και μελέτη της ευαισθησίας τους

Για την ταυτοποίηση όλων των στελεχών που μελετήθηκαν ως προς το είδος αλλά και για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας τους για διάφορα αντιβιοτικά, χρησιμοποιήθηκε το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK 2 (BioMerieux, Inc). Το σύστημα αυτό διαθέτει μία αυτοματοποιημένη πλατφόρμα όπου μας δίνει άμεσα αποτελέσματα, αρκετά αξιόπιστα, καθώς περιέχει μία αρκετά ευρεία βάση δεδομένων αναγνώρισης. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με βάσει τα MICs (Minimum Inhibitory Concentrations) δεδομένα, των δοκιμασιών ευαισθησίας σε διάφορα αντιμικροβιακά φάρμακα (EUCAST) (www.eucast.org), σύμφωνα με τα κριτήρια (έκδοση 14.0) της Ευρωπαϊκής Επιτροπής.

3.4 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA (DNA extraction)

Σε αυτό το στάδιο έγινε απομόνωση του γενωμικού υλικού ενός βιολογικού δείγματος. Προκειμένου να απομονωθεί το DNA του εκάστοτε δείγματος, πραγματοποιείται λύση κυττάρων και απομάκρυνση πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήσαμε στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν αυτοματοποιημένο. Πιο συγκεκριμένα η απομόνωση του DNA κάθε δείγματος έγινε με τη χρήση του μηχανήματος Bruker Life Science GenoXtract. Η συγκεκριμένη τεχνική επιτρέπει την αυτοματοποιημένη εξαγωγή νουκλεϊκών οξέων από διάφορα υλικά δείγματος, μέσω της τεχνολογίας μαγνητικών σφαιριδίων. Το kit που χρησιμοποιείται από το μηχάνημα αυτό και είναι κατάλληλο για την απομόνωση DNA gram-αρνητικών βακτηρίων είναι το GTX NA Extraction Kit, VER 1.0. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την απομόνωση του DNA των κλινικών δειγμάτων ήταν τα εξής:

- 1) Αρχικά, συλλέξαμε με στυλεό, ένα πλήθος αποικιών, για κάθε δείγμα, που είχαν προηγουμένως αναπτυχθεί σε τρυβλία και τα επαναδιαλύσαμε σε 220 μl απιονισμένο νερό, σε Eppendorf. Για την ομογενοποίηση του κάθε δείγματος χρησιμοποιήθηκε vortex.
- 2) Έπειτα, ακολούθησε η προσθήκη 50 μl πρωτεΐνης K σε κάθε Eppendorf και ανάδευση. Η πρωτεΐνη K είναι ένα ένζυμο το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στη μοριακή βιολογία για την πέψη πρωτεϊνών και για την αφαίρεση υπολειμμάτων που μπορεί να εμποδίσουν τον καθαρισμό των νουκλεϊκών οξέων [49].
- 3) Στο επόμενο βήμα, τοποθετήσαμε στο μηχάνημα, στις κατάλληλες θέσεις, τα Eppendorf με τα δείγματα, καινούρια Eppendorf κενά, καθώς και τις απαραίτητες κασέτες αντιδραστηρίων και tips που βρίσκονται στο kit.
- 4) Αφού βεβαιωθήκαμε ότι ασφαλίσαμε την πόρτα του μηχανήματος και ότι ευθυγραμμίσαμε τα tips με τα αντιδραστήρια/δείγματα, επιλέξαμε το πρόγραμμα που επιθυμούσαμε προκειμένου να γίνει η απομόνωση του DNA (Generic250, διάρκεια: 45 λεπτά)
- 5) Τέλος, αφού ολοκληρώθηκε το πρόγραμμα, παραλάβαμε τελικά τα tubes που έφεραν τα DNA για το κάθε δείγμα χωριστά.

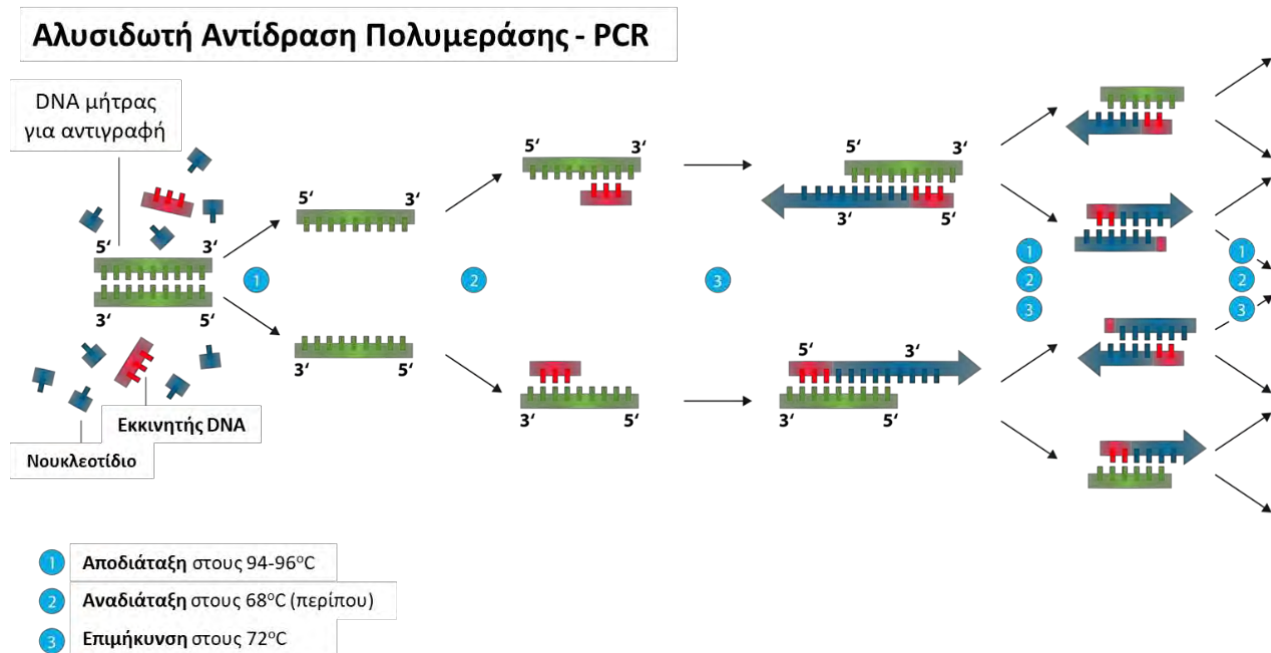
3.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR) είναι μία εργαστηριακή μέθοδος κατά την οποία πραγματοποιείται η παραγωγή πολλών αντιγράφων DNA, χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανού οργανισμού (*in vitro*). Από το 1983 που χρησιμοποιείται, μας έχει δώσει τη δυνατότητα ενίσχυσης και παραγωγής μίας επιθυμητής περιοχής του γονιδιώματος ενός οργανισμού (π.χ. αλληλουχία γονιδίου), μέσα από ένα σύνολο διαφόρων μορίων DNA που φέρει ο κάθε οργανισμός. Αναλυτικότερα, ο τρόπος λειτουργίας της PCR, περιλαμβάνει 3 στάδια σε κάθε κύκλο της τα οποία διατυπώνονται παρακάτω (Εικόνα 21):

1. Αποδιάταξη DNA (DNA denaturation): σε αυτό το στάδιο θερμαίνεται το μείγμα (που περιέχει τα απαραίτητα συστατικά για PCR) μέχρι τους 95°C και πραγματοποιείται αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, δηλαδή και του DNA-στόχου. Έτσι λοιπόν, προκύπτει μονόκλωνο DNA.
2. Αναδιάταξη ή υβριδισμός εκκινητών (primer annealing): πραγματοποιείται μείωση της θερμοκρασίας του μείγματος (40-70°C), προκειμένου να συμβεί η σύνδεση των εκκινητών με τα μονόκλωνα πλέον εκμαγεία του DNA (που έχουν προκύψει από το στάδιο 1) και πιο συγκεκριμένα με το 3' άκρο της συμπληρωματικής αλυσίδας, καθεμιάς από της αλληλουχίες αυτές.
3. Επιμήκυνση DNA (DNA extension): στο τελευταίο στάδιο σημειώνεται αύξηση της θερμοκρασίας στους 72°C, προκειμένου να δημιουργηθούν οι κατάλληλες συνθήκες για να

λειτουργήσει η πολυμεράση του DNA (Taq πολυμεράση) και να πραγματοποιηθεί η επιμήκυνση των εκκινητών, που είναι ήδη προσδεμένοι πάνω στο DNA, με την προσθήκη 5' ελεύθερων τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs).

Μετά την ολοκλήρωση του πρώτου κύκλου των τριών σταδίων, τα μόρια του DNA-στόχου έχουν υποστεί διπλασιασμό. Έπειτα θα ακολουθήσει η επανάληψη των τριών αυτών σταδίων 30 – 40 φορές, προκειμένου να δημιουργηθεί ικανοποιητικός αριθμός αντιγράφων.



Εικόνα 21: Μηχανισμός της PCR.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν στο εργαστήριο για να πραγματοποιήσουμε την τεχνική της PCR είναι τα παρακάτω:

- 1) Σε ένα κωνικό σωληνάριο 1,5ml τύπου Eppendorf προσθέσαμε τα απαραίτητα αντιδραστήρια (εκτός του DNA των δειγμάτων) με σκοπό να φτιάξουμε το Master Mix. Η προσθήκη των αντιδραστηρίων έγινε σύμφωνα με τη σειρά που αναγράφονται παρακάτω στις αντίστοιχες ποσότητες, πολλαπλασιασμένες με τον αριθμό των δειγμάτων που πρόκειται να εξετάσουμε, προσθέτοντας 1 (Πίνακας 5). [Αν θέλω να παράδειγμα να δημιουργήσω Master Mix για 20 δείγματα (λαμβάνοντας υπόψιν και τον αρνητικό μάρτυρα) , τότε πολλαπλασιάζω όλες τις ποσότητες επί 21]:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα (μl)
Απιονισμένο dH ₂ O	18,3 μl
Buffer 10x	2,5 μl
DNTPs 5 mmol	0,5 μl
MgCl ₂	1,5 μl
Primer Forward	0,25 μl
Primer Reverse	0,25 μl
Πολυμεράση Taq	0,2 μl

Πίνακας 5: Master Mix για PCR

!!! Η πολυμεράση Taq εμφανίζει ευαισθησία σε θερμοκρασία δωματίου και γι' αυτό το λόγο τη βγάλαμε από την κατάψυξη (-18°C) τη στιγμή που ήταν να την χρησιμοποιήσουμε.

- 2) Αφού δημιουργήσαμε το Master Mix, συνεχίσαμε με απαλή ανάδευση και φροντίσαμε να ομογενοποιηθεί το μείγμα μας. Έπειτα, το μοιράσαμε σε μικρά σωληνάρια (0,2ml) κατάλληλα για τον θερμικό κυκλοποιητή PCR (23,5μl στο καθένα).
- 3) Έπειτα προσθέσαμε 1,5μl DNA, των δειγμάτων μας στα αντίστοιχα σωληνάρια που είχαμε σημειώσει.

!!! Παρατηρήσαμε ότι ο τελικός όγκος σε κάθε σωληνάριο ήταν 25μl.

- 4) Στη συνέχεια, ανάλογα με το ζεύγος των εκκινητών που είχαμε προσθέσει, δημιουργήσαμε το αντίστοιχο πρόγραμμα στον θερμικό κυκλοποιητή, σε ότι έχει να κάνει με τους χρόνους, τις θερμοκρασίες, , τον αριθμό των επαναλήψεων των κύκλων αλλά και του όγκου του που περιέχει το κάθε σωληνάριο μας.

!!! Σημαντικοί παράμετροι που οφείλαμε να λάβουμε υπόψιν ήταν το μήκος της γονιδιωματικής αλληλουχίας που θέλουμε να ενισχύσουμε καθώς επίσης και το T_m των εκκινητών καθώς και. Προκειμένου να υπολογίσουμε το T_m (υπολογισμός θερμοκρασίας κατάλληλης για τον υβριδισμό των εκκινητών), χρησιμοποιήσαμε τον ακόλουθο μαθηματικό τύπο:

$$T_m = (4 \times C-G) + (2 \times A-T)$$

Η αναζήτηση του μήκους της αλληλουχίας μέσω BLAST, μας δίνει την πληροφορία για το πόσο χρόνο θα κάνει η πολυμεράση Taq προκειμένου να αντιγράψει-επιμηκύνει το κλώνο αυτό. Ωστόσο,

ο χρόνος για την επιμήκυνση θα εξαρτηθεί και από την πολυμεράση που χρησιμοποιήσαμε, δηλαδή, πόσο γρήγορα θα «τρέξει» την αλληλουχία.

- 5) Αφού ολοκληρώθηκαν οι απαιτούμενοι κύκλοι του προγράμματος και τελείωσε η διαδικασία, τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (μια διαδικασία που θα αναλυθεί στη συνέχεια). Σε διαφορετική περίπτωση, μπορούσαμε να τα αποθηκεύσουμε στην κατάψυξη στους -18°C για μετέπειτα επεξεργασία.

3.5.1 MLST τυποποίηση βακτηρίων

Η χρήση της τεχνικής της PCR έγινε, αρχικά, με σκοπό να ανιχνεύσουμε γονίδια βασικής κυτταρικής λειτουργίας, και για τα τρία αυτά είδη βακτηρίων (*P. aeruginosa*, *E. coli* και *K. pneumoniae*). Τα γονίδια αυτά είναι απαραίτητα για Πολυτοπική Νουκλεοτιδική Ανάλυση (Multilocus Sequence Typing-MLST).

Η τυποποίηση των στελεχών έγινε με τη μέθοδο MLST, δηλαδή με βάσει τις διαφορές των αλληλουχιών, που παρατηρούνται σε έναν αριθμό επιλεγμένων γενετικών τόπων. DNA αλληλουχίες από 7 διαφορετικά γονίδια (house-keeping genes) ενισχύθηκαν με PCR και στη συνέχεια αλληλουχήθηκαν. Σε κάθε μοναδική αλληλουχία (αλληλόμορφο), για κάθε γονίδιο-στόχο, αποδίδεται ένας αριθμός. Συνολικά, λοιπόν, για κάθε στέλεχος, λαμβάνοντας υπόψιν το συνδυασμό των 7 γονιδίων με τα διάφορα αλληλόμορφα που έχουν προκύψει, προσδιορίσαμε και τον τύπο της αλληλουχίας (ST) στον οποία ανήκε κάθε στέλεχος των βακτηρίων μας [50].

Πιο συγκεκριμένα, τα γονίδια τα οποία μελετήθηκαν, για τα τρία αυτά διαφορετικά βακτήρια, ήταν τα ακόλουθα (Πίνακας 6):

Μικροοργανισμός	House-keeping genes
<i>P. aeruginosa</i>	<i>acsA, aroE, guaA, mutL, nuoD, ppsA, trpE</i>
<i>E. coli</i>	<i>recA, icd, purA, adk, mdh, fumC, gurB</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>rpoB, pgi, phoE, gapA, tonB, mdh, infB</i>

Πίνακας 6: House-keeping genes *P. aeruginosa*, *E. coli* και *K. Pneumoniae*.

Χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές για την ενίσχυση των γονιδίων αυτών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7):

Μικροοργανισμός	Εκκινητές	Αλληλουχία Εκκινητών	Μέγεθος προϊόντος	Βιβλιογραφική αναφορά
<i>P. aeruginosa</i>	acsA:F	ACCTGGTGTCACGCTCGCTGAC	842 nt	[51]
	acsA:R	GACATAGATGCCCTGCCCCCTTGAT	842 nt	[51]
	aroE:F	TGGGGCTATGACTGGAAACC	1052 nt	[51]
	aroE:R	TAACCCGGTTTTGTGATTCTACA	1052 nt	[51]
	guaA:F	CGGCCTCGACGTGTGGATGA	897 nt	[51]
	guaA:R	GAACGCCTGGCTGGTCTTGTCTTA	897 nt	[51]
	mutL:F	CCAGATCGCCGCCGGTGAGGTG	898 nt	[51]
	mutL:R	CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC	898 nt	[51]
	nuoD:F	ACCGCCACCCGTACTG	1042 nt	[51]
	nuoD:R	TCTCGCCCATCTTGACCA	1042 nt	[51]
	ppsA:F	GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG	989 nt	[51]
	ppsA:R	GGGTTCTCTTCTCCGGCTCGTAG	989 nt	[51]
	trpE:F	GCGGCCAGGGTCGTGAG	811 nt	[51]
	trpE:R	CCCGGCGCTTGTGATGGTT	811 nt	[51]
<i>E. coli</i>	recA-F	CGCATTCGCTTTACCCTGACC	510 nt	[52]
	recA-R	TCGTCGAAATCTACGACCGGA	510 nt	[52]
	icd-F	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA	518 nt	[52]
	icd-R	GGACGCAGCAGGATCTGTT	518 nt	[52]
	adk-F	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	536 nt	[52]
	adk-R	CCGTCAACTTTCGCGTATTT	536 nt	[52]
	fumC-F	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	469 nt	[52]
	fumC-R	GTACGCAGCGAAAAAGATTC	469 nt	[52]
	gyrB-F	TCGGCGACACGGATGACGGC	460 nt	[52]
	gyrB-R	ATCAGGCCCTTCACGCGCATC	460 nt	[52]
	mdh-F	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG	452 nt	[52]
	mdh-R	TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT	452 nt	[52]
	purA-F	CGCGCTGATGAAAGAGATGA	478 nt	[52]
	purA-R	CATACGGTAAGCCACGCAGA	478 nt	[52]
<i>K. pneumoniae</i>	rpoB:F	GGCGAAATGGCWGAGAACCA	1075 nt	[53]
	rpoB:R	GAGTCTTCGAAGTTGTAACC	1075 nt	[53]
	pgi:F	GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC	566 nt	[53]
	pgi:R	CGCGCCACGCTTTATAGCGGTAAAT	566 nt	[53]
	phoE:F	ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG	602 nt	[53]
	phoE:R	TGATCAGAACTGGTAGGTGAT	602 nt	[53]
	gapA:F	TGAAATATGACTCCACTCACGG	662 nt	[53]
	gapA:R	CTTCAGAAAGCGCTTTGATGGCTT	662 nt	[53]
	tonB:F	CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT	539 nt	[53]
	tonB:R	ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	539 nt	[53]
	mdh:F	CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG	756 nt	[53]
	mdh:R	CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	756 nt	[53]
	infB:F	CTCGCTGCTGGACTATATTCG	462 nt	[53]
	infB:R	CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC	462 nt	[53]

Πίνακας 7: Εκκινητές για τα house-keeping genes των μικροοργανισμών *P. aeruginosa*, *E. coli* και *K. pneumoniae*.

Το Master Mix που δημιουργήθηκε για κάθε housekeeping γονίδιο ήταν το εξής (Πίνακας 8):

Master Mix	Mix για x1 αντίδραση (μl)
10X DreamTaq Green Buffer (includes 20 mM MgCl ₂)	2,5
dNTPs 5 mmol	0,5
MgCl ₂	-
Primer F	0,25
Primer R	0,25
DreamTaq DNA Polymerase (500 U, 5 U/μL)	0,2
dH ₂ O	19,8
DNA	1,5
Συνολικός όγκος αντίδρασης	25

Πίνακας 8: Master Mix για τα housekeeping γονίδια των μικροοργανισμών *P. aeruginosa*, *E. coli* και *K. pneumoniae*.

!!! Το buffer που χρησιμοποιήσαμε στη συγκεκριμένη αντίδραση περιέχει 20mM MgCl₂, και γι' αυτό το λόγο δεν προσθέσαμε χωριστά MgCl₂, αλλά προκειμένου να έχουμε τελικό όγκο σε κάθε σωληνάριο (0,2ml) 25μl, προσθέτουμε dH₂O 19,8μl αντί για 18,3μl.

Τα προγράμματα που δημιουργήσαμε για τα βακτήρια αυτά στον θερμικό κυκλοποιητή PCR ήταν το εξής (Πίνακας 9):

<i>P. aeruginosa</i>			X 35 κύκλοι
Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min	
Αποδιάταξη DNA (denaturation)	95°C	1 min	
Υβριδισμός εκκινητών (annealing)	55°C (<i>trpE</i> , <i>nuoD</i>) 60°C (<i>acsA</i> , <i>guaA</i> , <i>ppsA</i> , <i>aroE</i>) 64°C (<i>mutL</i>)	1 min	
Επιμήκυνση εκκινητών (DNA extension)	72°C	1 min	

Τελική επιμήκυνση DNA	72°C	10 min
-----------------------	------	--------

<i>E. coli</i>			X 35 κύκλοι
Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	5 min	
Αποδιάταξη DNA (denaturation)	95 °C	30 sec	
Υβριδισμός εκκινητών (annealing)	56 °C (<i>recA</i>) 58 °C (<i>fumC</i>) 60 °C (<i>icd, adk, purA</i>) 62°C (<i>mdh</i>) 64°C (<i>gurB</i>)	30 sec	
Επιμήκυνση εκκινητών (DNA extension)	72 °C	1min	
Τελική επιμήκυνση DNA	72 °C	10 min	

<i>K. pneumoniae</i>			X 35 κύκλοι
Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	5 min	
Αποδιάταξη DNA (denaturation)	95 °C	30 sec	
Υβριδισμός εκκινητών (annealing)	60°C (<i>rpoB, pgi, phoE, gapA, mdh, infB</i>) 62°C (<i>tonB</i>)	30 sec	
Επιμήκυνση εκκινητών (DNA extension)	72 °C	1min	
Τελική επιμήκυνση DNA	72 °C	10 min	

Πίνακας 9: Συνθήκες διεξαγωγής PCR, των housekeeping γονιδίων των *P. aeruginosa*, *E. coli* και *K. pneumoniae*

3.5.2 Ανίχνευση *cas* γονιδίων

Για να καταφέρουμε να βρούμε ποια από τα διαφορετικά CRISPR/Cas συστήματα υπάρχουν στα υπό μελέτη στελέχη των 3 ειδών βακτηρίων (*P. aeruginosa*, *E. coli* και *K. pneumoniae*), ελέγξαμε για τυχόν ύπαρξη συγκεκριμένων CRISPR-συσχετιζόμενων (*cas*) γονιδίων. Πιο συγκεκριμένα, για τα στελέχη *P. aeruginosa*, ασχοληθήκαμε με την εύρεση των γονιδίων *cas1*, *cse1* και *cas8* για την ταυτοποίηση των τύπων I-F, I-E και I-C, αντίστοιχα, των CRISPR/Cas συστημάτων [54]. Για τα *E. coli*, ελέγξαμε την ύπαρξη των γονιδίων *cas2* και *cas1* για τους τύπους I-E και I-F, αντίστοιχα [55]. Τέλος, για τα στελέχη *K. pneumoniae*, ελέγξαμε την ύπαρξη των γονιδίων *cse1*, *cas1* και *cas3* για τον τύπο I-E CRISPR/Cas συστήματος των στελεχών *K. pneumoniae* [56]. Οι εκκινητές, που βρήκαμε από τη βιβλιογραφία, φροντίσαμε να προσδένονται σε μία ειδική θέση μέσα στα γονίδια αυτά.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR ενίσχυση αυτών των γονιδίων είναι (Πίνακας 10):

Μικροοργανισμός	Εκκινητές	Αλληλουχία Νουκλεοτιδίων	Βιβλιογραφική Αναφορά
<i>P. aeruginosa</i>	cas1:F	GACATTTCTCCCAGCGAACTGA	[54]
	cas1:R	CTTCTTCGGTCAGTAGATGCTC	[54]
	cse1:F	ATGACTGAACACTACAACCTGC	[19]
	cse1:R	GGTCATAGGAATGGTCGAACAC	[19]
	cas8:F	ATGATCCTTTTCGGCTCTCAAT	[57]
	cas8:R	TCATTCTTGTCTTCCTTGCTC	[57]
<i>E. coli</i>	Ec-Cas2-F	ATGTCTTCGAATTACCTTACG	Από αυτή τη μελέτη
	Ec-Cas2-R	TCATTGGTCAGCCTTAGCCA	Από αυτή τη μελέτη
	Ec-Cas1-F	ATGAGTATGGTGGTTGTGGTC	Από αυτή τη μελέτη
	Ec-Cas1-R	TTATTGATTTTCAACAGGAAGA	Από αυτή τη μελέτη
<i>K. pneumoniae</i>	KpnCse1F	CAGTTTAACCGATATTTTCAGCCAGCCGG	[56]
	KpnCse1R	CATCAGTTAATTGCTGCTGTTGCTGACTTTTCG	[56]
	KpnCas1F	GCTGTTTGTCAAAGTTACCCGCGAACTC	[56]
	KpnCas1R	GGTTTGTATCGCCTCATGAGTCACAGTTG	[56]
	KpnCas3F	GGGTTTCGCTACAAATCAACATGCCATCG	[56]
	KpnCas3R	CACGAGTTTTTTACGCTCATCAAACCAGAGC	[56]

Πίνακας 10: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση *cas* γονιδίων των *P. aeruginosa*, *E. coli* και *K. pneumoniae*.

Το Master Mix που δημιουργήσαμε για κάθε *cas* γονίδιο ήταν ίδιο με αυτό στον Πίνακα 8. Όσο αφορά τον προγραμματισμό του θερμικού κυκλοποιητή PCR, τα προγράμματα που δημιουργήσαμε για τα βακτήρια αυτά ήταν το εξής (Πίνακας 11):

<i>P. aeruginosa</i>			X 35 κύκλοι
Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min	
Αποδιάταξη DNA (denaturation)	95°C	30 sec	
Υβριδισμός εκκινητών (annealing)	56°C (<i>cas8</i>) 60°C (<i>cas1</i> , <i>cse1</i>)	1 min	
Επιμήκυνση εκκινητών (DNA extension)	72°C	1 min (<i>cas1</i> , <i>cse1</i>) 2 min (<i>cas8</i>)	
Τελική επιμήκυνση DNA	72°C	10 min	

<i>E. coli</i>			X 35 κύκλοι
Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	5 min	
Αποδιάταξη DNA (denaturation)	95 °C	30 sec	
Υβριδισμός εκκινητών (annealing)	56°C (<i>cas2</i>) 58 °C (<i>cas1</i>)	30 sec	
Επιμήκυνση εκκινητών (DNA extension)	72 °C	1min	
Τελική επιμήκυνση DNA	72 °C	10 min	

<i>K. pneumoniae</i>		
Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	5 min

Αποδιάταξη DNA (denaturation)	95 °C	30 sec	X 35 κύκλοι
Υβριδισμός εκκινητών (annealing)	62°C (<i>cas1</i> , <i>cas3</i> , <i>cse1</i>)	30 sec	
Επιμήκυνση εκκινητών (DNA extension)	72 °C	1min	
Τελική επιμήκυνση DNA	72 °C	10 min	

Πίνακας 11: Συνθήκες διεξαγωγής PCR, των *cas* γονιδίων των *P. aeruginosa*, *E. coli* και *K. pneumoniae*.

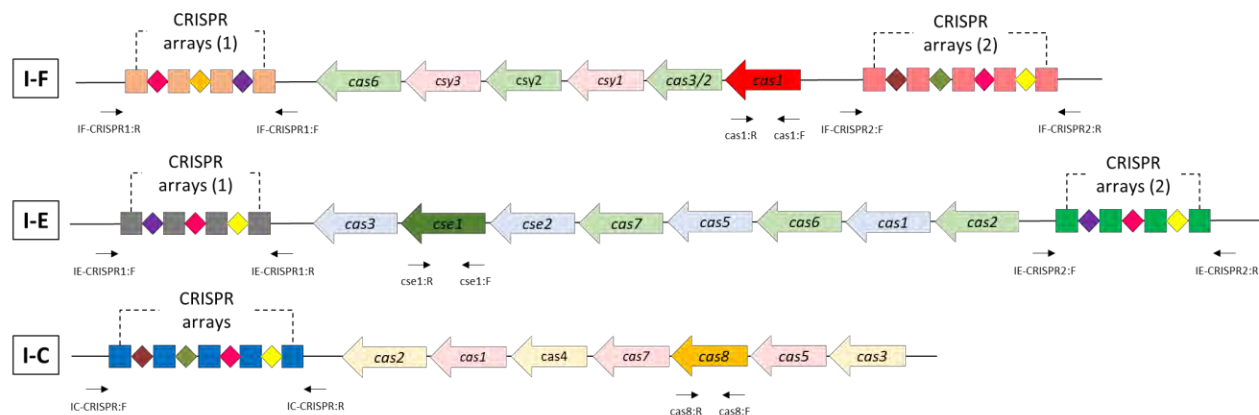
3.5.3 Ταυτοποίηση CRISPR/Cas συστοιχιών

Με βάση τα αποτελέσματα της PCR ενίσχυσης των *cas* γονιδίων, κάναμε ένα ακόμα κύκλο πειραμάτων ενίσχυσης PCR, όχι όμως αλληλουχιών γονιδίων, αλλά περιοχών του γονιδιώματος που αντιστοιχούν σε CRISPR συστοιχίες. Από μελέτες, γνωρίζαμε ότι για τις *P. aeruginosa*, δύο CRISPR συστοιχίες περιλαμβάνονται σε κάθε σύστημα τύπου I-E και I-F, ενώ τα I-C συστήματα βρέθηκαν να φέρουν μόνο μία CRISPR συστοιχία [54]. Αντίστοιχα, για τα *E. coli*, γνωρίζαμε ότι τα I-E και I-F συστήματα φέρουν δύο CRISPR συστοιχίες το καθένα [55] και ότι οι *K. pneumoniae*, στο σύστημα I-E που διαθέτουν, φέρουν τρεις CRISPR συστοιχίες [56].

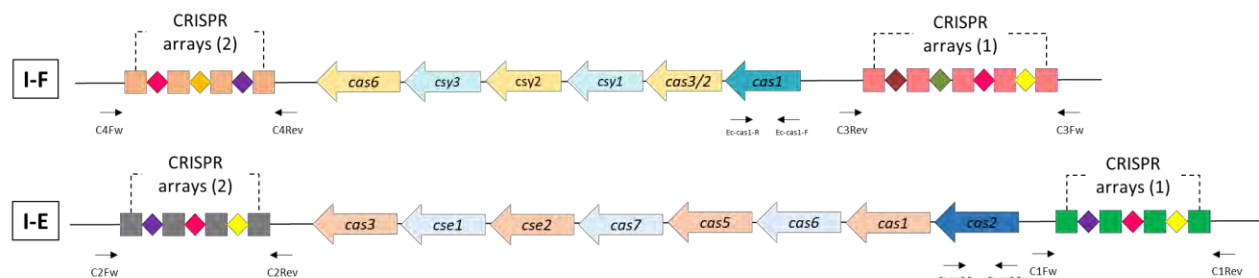
Αξίζει να σημειωθεί ότι, για τις *P. aeruginosa* που βγήκαν θετικές για την παρουσία του *cas1* γονιδίου, ενισχύσαμε τις IF CRISPR1 και CRISPR2 συστοιχίες, για τα θετικά *cse1* στελέχη ενισχύσαμε τις IE CRISPR1 και CRISPR2 συστοιχίες και για τα θετικά *cas8* στελέχη τις IC CRISPR συστοιχίες. Όσο αφορά τα στελέχη *K. pneumoniae*, για όσα από αυτά βγήκαν θετικά και για τα τρία *cas* γονίδια (*cse1*, *cas1* και *cas3*), ενισχύσαμε τις IE CRISPR1, CRISPR2 και CRISPR3 συστοιχίες. Αντίθετα, για τα *E. coli* ελέγξαμε όλα τα στελέχη για την ύπαρξη των IE CRISPR1 και CRISPR2 συστοιχιών, και των IF CRISPR1 και CRISPR2 συστοιχιών.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό και την ενίσχυση των CRISPR συστοιχιών, προσδένονται στο γονιδίωμα των στελεχών αυτών εξωτερικά και γειτονικά των συστοιχιών, σε περιοχές αλληλουχιών που συνορεύουν και είναι συντηρημένες (Εικόνα 22).

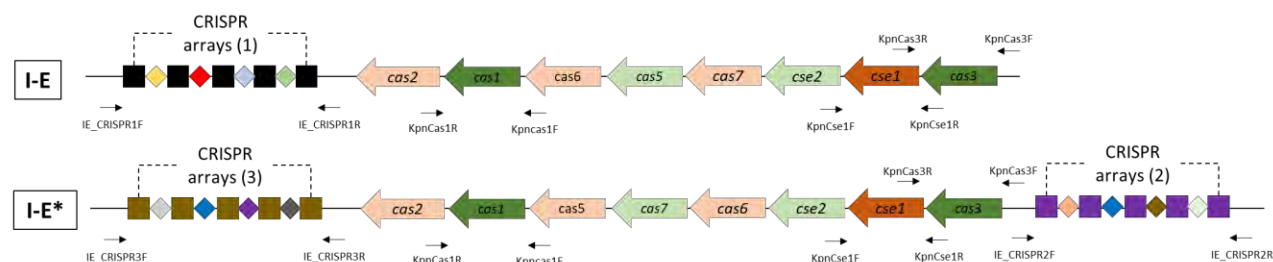
Pseudomonas aeruginosa



Escherichia coli



Klebsiella pneumoniae



Εικόνα 22: CRISPR/Cas περιοχές στα γονιδιώματα των *P. aeruginosa*, *E. coli* και *K. pneumoniae* με τους primers τους.

Οι εκκινητές, ανά μικροοργανισμό, για την ενίσχυση PCR των CRISPR περιοχών είναι οι παρακάτω (Πίνακας 12):

Μικροοργανισμός	Εκκινητές	Αλληλουχία Νουκλεοτιδίων	Βιβλιογραφική Αναφορά
<i>P. aeruginosa</i>	IF-CRISPR1F	CTTGACGACCTATGTGGCAG	[54]
	IF-CRISPR1R	GTCGCTGCAAAAAGAGGGTT	[54]
	IF-CRISPR2F	TTTTCGTCTGTGTGAGGAGC	[54]
	IF-CRISPR2R	AGCAAGTTACGAGACCTCGA	[54]
	IE-CRISPR1F	GCTGCTCTATCCATGCCAAAG	[57]
	IE-CRISPR1R	ACCGTCGACATCCAGTGTTG	[57]
	IE-CRISPR2F	CTGGTGATCACGCCACTGG	[57]

	IE-CRISPR2R	GATGCGGGTAGGTTTCGACT	[57]
	IC-CRISPRF	CTGCGTGTGCGACGAGCA	[57]
	IC-CRISPRR	GTTCGCAATTCTCTAGCTGATTG	[57]
<i>E. coli</i>	C1Fw	GTTATGCGGATAATGCTACC	[55]
	C1Rev	CGTAYYCCGGTRGATTTGGA	[55]
	C2Fw	AAATCGTATGAAGTGATGCAT	[55]
	C2Rev	GTCGATGCAAACACATAAATA	[55]
	C3Fw	GCGCTGGATAAAGAGAAAAAT	[55]
	C3Rev	GCCCACCATTACCTGTA	[55]
	C4Fw	CTGAACAGCGGACTGATTTA	[55]
	C4Rev	GTACGACCTGAGCAAAG	[55]
<i>K. pneumoniae</i>	IE_CRISPR1F	CAGTTCCTGCAACCTGGCCT	[56]
	IE_CRISPR1R	CTGGCAGCAGGTGATACAGC	[56]
	IE_CRISPR2F	GTAGCGAAACCCTGATCAAGCG	[56]
	IE_CRISPR2R	GCGCTACGTTCTGCGGATG	[56]
	IE_CRISPR3F	GACGCTGGTGCGATTCTTGAG	[56]
	IE_CRISPR3R	CGCAGTATTCCTCAACCGCCT	[56]

Πίνακας 12: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση CRISPR συστοιχιών των *P. aeruginosa*, *E. coli* και *K. pneumoniae*.

Το Master Mix που δημιουργήσαμε για κάθε CRISPR συστοιχία ήταν ίδιο με αυτό που παρουσιάζεται στον Πίνακα 8. Όσο αφορά τον προγραμματισμό του θερμικού κυκλοποιητή PCR, τα προγράμματα που δημιουργήσαμε για τα βακτήρια αυτά ήταν το εξής (Πίνακας 13):

<i>P. aeruginosa</i>			X 35 κύκλοι
Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min	
Αποδιάταξη DNA (denaturation)	95°C	30 sec	
Υβριδισμός εκκινητών (annealing)	60°C (IF-CR1, IF-CR2, IE-CR1) 64°C (IE-CR2, IC-CR)	30 sec	
Επιμήκυνση εκκινητών (DNA extension)	72°C	2 min	

Τελική επιμήκυνση DNA	72°C	10 min
-----------------------	------	--------

<i>E. coli</i>			X 35 κύκλοι
Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	5 min	
Αποδιάταξη DNA (denaturation)	95 °C	30 sec	
Υβριδισμός εκκινητών (annealing)	56°C (CR2, CR4) 58°C (CR1, CR3)	30 sec	
Επιμήκυνση εκκινητών (DNA extension)	72 °C	2 min	
Τελική επιμήκυνση DNA	72 °C	10 min	

<i>K. pneumoniae</i>			X 35 κύκλοι
Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	5 min	
Αποδιάταξη DNA (denaturation)	95 °C	30 sec	
Υβριδισμός εκκινητών (annealing)	62°C (IE-CR1, IE-CR2, IE-CR3)	30 sec	
Επιμήκυνση εκκινητών (DNA extension)	72 °C	3 min	
Τελική επιμήκυνση DNA	72 °C	10 min	

Πίνακας 13: Συνθήκες διεξαγωγής PCR CRISPR συστοιχιών των *P. aeruginosa*, *E. coli* και *K. pneumoniae*.

3.5.4 Ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά

Ο τελευταίος κύκλος PCR που πραγματοποιήσαμε ήταν για να εντοπισμός των δειγμάτων μας έφεραν ορισμένα γονίδια αντοχής σε αντιβιοτικά. Για τα στελέχη *P. aeruginosa*, *E. coli* και *K.*

pneumoniae ελέγξαμε για την ύπαρξη των γονιδίων *bla_{VIM}*, *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-9}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48-like}*.

Οι εκκινητές για τον εντοπισμό και την ενίσχυση των συγκεκριμένων γονιδίων ήταν οι παρακάτω (Πίνακας 14):

Εκκινητές	Αλληλουχία Νουκλεοτιδίων	Βιβλιογραφική Αναφορά
<i>bla_{VIM}</i> :F	GATGGTGTTCGGTCGCATA	[58]
<i>bla_{VIM}</i> :R	CGAATGCGCAGCACCAG	[58]
<i>CTXM1</i> :F	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	[59]
<i>CTXM1</i> :R	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	[59]
<i>CTXM9</i> :F	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	[59]
<i>CTXM9</i> :R	TGATTCTCGCCGCTGAAG	[59]
<i>bla_{KPC}</i> :F	ATGTCACTGTATCGCCGTCT	[46]
<i>bla_{KPC}</i> :R	TTTTCAGAGCCTTACTGCCC	[46]
<i>bla_{NDM}</i> :F	GCCCAATATTATGCACCC	[46]
<i>bla_{NDM}</i> :R	GTCGCCAGTTTCCATTTG	[46]
<i>bla_{OXA48}</i> :F	TTGGTGGCATCGATTATCGG	[46]
<i>bla_{OXA48}</i> :R	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	[46]

Πίνακας 14: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση του γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.

Το Master Mix που δημιουργήσαμε για την εύρεση καθενός από τα παραπάνω γονίδια είναι το ίδιο με αυτό που παρουσιάζεται στον Πίνακα 8. Για τον προγραμματισμό του θερμικού κυκλοποιητή PCR, τα προγράμματα που δημιουργήσαμε για τα βακτήρια αυτά ήταν το εξής (Πίνακας 15):

Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min

Αποδιάταξη DNA (denaturation)	95°C	30 sec	X 35 κύκλοι
Υβριδισμός εκκινητών (annealing)	60°C	1 min	
Επιμήκυνση εκκινητών (DNA extension)	72°C	1 min	
Τελική επιμήκυνση DNA	72°C	10 min	

Πίνακας 15: Συνθήκες διεξαγωγής PCR, των *bla* γονιδίων των *P. aeruginosa*, *E. coli* και *K. pneumoniae*.

3.6 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Για να ελέγξουμε αν όλες οι PCRs καθώς και τα καθαρισμένα προϊόντα της PCR μας έδωσαν τα επιθυμητά προϊόντα ενίσχυσης (Ενότητα 3.7), κάναμε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων μας σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%. Για ρυθμιστικό διάλυμα βάλαμε το TBE (X1) και προσθέσαμε EtBr. Για βαθμονομητής στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήσαμε το Invitrogen™ 100bp DNA Ladder. Πριν γίνει ηλεκτροφόρηση, στα προϊόντα μας, προσθέσαμε, επιπλέον, 1,5μl 6X DNA Gel Loading Dye (με εξαίρεση τις PCRs όπου χρησιμοποιούσαμε την DreamTaq polymerase με το DreamTaq Green Buffer). Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης ήταν για 35' στα 95V.

3.7 Καθαρισμός PCR προϊόντος

Σε αυτό το στάδιο καθαρίσαμε τα προϊόντα που βρήκαμε θετικά στην ηλεκτροφόρηση, δηλαδή είδαμε ότι ενισχύθηκαν τα τμήματα του γονιδιώματος που επιθυμούσαμε σε κάθε PCR. Μέσω του καθαρισμού απομονώσαμε το DNA, από διάφορες άλλες ουσίες που βρίσκονται είτε στο Master Mix είτε στο πήκτωμα της αγαρόζης (αν γίνει απομόνωση DNA από αυτό), και στείλαμε τα καθαρισμένα προϊόντα PCR για αλληλούχηση, με τη μέθοδο Sanger.

Για τον καθαρισμό PCR προϊόντων δύο διαφορετικά kit καθαρισμού. Το πρώτο kit απευθυνόταν στον καθορισμό των προϊόντων PCR (PureLink™ PCR Purification Kit), ενώ το δεύτερο, kit αφορούσε τον καθαρισμό PCR προϊόντων (ή PCR ζωνών) από το πήκτωμα αγαρόζης (PureLink™ Quick Gel Extraction Kit).

!!! Ο καθαρισμός PCR προϊόντων από πήκτωμα αγαρόζης έγινε με σκοπό την επιλογή της επιθυμητής ζώνης, γιατί υπήρχαν παραπροϊόντα στη PCR.

3.7.1 Καθαρισμός PCR προϊόντων

Για τον καθαρισμό των PCR προϊόντων, το kit που χρησιμοποιήσαμε περιείχε:

- Binding buffer-B2 (Ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης)
- Wash buffer-W1 (Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης)
- Elution buffer-E1(Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης)
- Στήλες απομόνωσης DNA με σωλήνα συλλογής
- 1,7ml σωλήνες έκλουσης

!!! Στα ρυθμιστικά διαλύματα πρόσδεσης και πλύσης, για να χρησιμοποιηθούν , βάλαμε 10ml ισοπροπανόλης και 64ml αιθανόλης, αντίστοιχα.

Τα στάδια καθαρισμού των PCR προϊόντων είναι τα παρακάτω:

1. Αρχικά, προσθέσαμε, στο κάθε PCR δείγμα μας, το διάλυμα B2 (που περιείχε ισοπροπανόλη) σε αναλογία 4 προς 1 του όγκου του PCR δείγματος και αναδεύσαμε καλά το διάλυμα μέχρι να ομογενοποιηθούν. Σε αυτή την περίπτωση, αφού είχαμε ολοκληρώσει την ηλεκτροφόρηση, ξέραμε ότι είχαν μείνει 20μl στο κάθε PCR δείγμα μας. Έτσι, λοιπόν, σε κάθε PCR δείγμα, προσθέσαμε 80μl B2.
2. Έπειτα, φορτώσαμε στη στήλη απομόνωσης, όλη την ποσότητα του δείγματος και φυγοκεντρήσαμε τη στήλη για ένα λεπτό στις >10.000 στροφές.. Αφού ολοκληρώθηκε η φυγοκέντρηση, στη συνέχεια, απορρίψαμε το υγρό από το σωλήνα συλλογής.
3. Έπειτα, επανατοποθετήσαμε τη στήλη στο σωλήνα συλλογής και προσθέσαμε ποσότητα 650μl διαλύματος W1, με αιθανόλη. Επαναφυγοκεντρήσαμε για ένα λεπτό σε >10.000 στροφές, πετάξαμε ξανά το υγρό που υπήρχε στο σωλήνα και επανατοποθετήσαμε τη στήλη στο σωλήνα συλλογής. Στη συνέχεια, πραγματοποιήσαμε φυγοκέντρηση για δύο λεπτά, με μέγιστη ταχύτητα (π.χ. 12.000 στροφές).
4. Τελευταίο στάδιο είναι η έκλυση όπου και τοποθετήσαμε τη στήλη σε αποστειρωμένους σωλήνες έκλουσης (1,7ml) που συμπεριλαμβάνονταν στο kit. Προσθέσαμε 35μl διάλυμα έκλουσης (E1) στο κέντρο της στήλης και αφήσαμε σε θερμοκρασία δωματίου, για ένα λεπτό, τη στήλη να εμποτιστεί, , και φυγοκεντρήσαμε για δύο λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα. Ως αποτέλεσμα, ο

σωλήνας έκλουσης περιείχε το PCR προϊόν καθαρισμένο. Ακολούθησε η αποθήκευση των προϊόντων στην κατάψυξη (-20°C) για μελλοντική χρήση (αλληλούχηση).

!!! Όταν πραγματοποιούμε τη δεύτερη φυγοκέντρωση στο 3^ο βήμα, πρέπει να έχουμε στο νου μας ότι θα πρέπει να έχει φύγει όλη η αιθανόλη που περιείχε το διάλυμα πλύσης καθώς αυτό θα αναστείλει περαιτέρω αναλύσεις του DNA που ενισχύσαμε με την PCR.

3.7.2 Καθαρισμός PCR προϊόντων από πήκτωμα αγαρόζης

Το kit που χρησιμοποιήθηκε περιείχε:

- Gel Solubilization Buffer-L3 (Ρυθμιστικό διάλυμα διαλυτοποίησης πηκτώματος)
- Wash buffer-W1 (Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης)
- Elution Buffer-E5 (Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης)
- Στήλες απομόνωσης με σωλήνα συλλογής
- 1,7ml σωλήνες έκλουσης

Τα βήματα που ακολουθήσαμε για τον PCR καθαρισμό προϊόντος από πήκτωμα αγαρόζης είναι τα παρακάτω:

1. Σε πρώτη φάση, σε πήκτωμα 1,5% αγαρόζης φορτώσαμε ολόκληρη την ποσότητα του PCR προϊόντος που θέλαμε να απομονώσουμε και έπειτα, «τρέξαμε» το πήκτωμα. Αφού ολοκληρώθηκε η ηλεκτροφόρηση, φωτογραφίσαμε το πήκτωμα και με κοπίδι κόψαμε το τμήμα του πηκτώματος που μας ενδιέφερε.
2. Στη συνέχεια, με ένα κοπίδι και με τη βοήθεια μίας λάμπας UV κόψαμε τη ζώνη που θέλαμε να απομονώσουμε, για το κάθε δείγμα ξεχωριστά, ζυγίσαμε τα τμήματα του τζελ που δημιουργήθηκαν και τα τοποθετήσαμε σε σωληνάρια τύπου Eppendorf με πόμα (1,5ml).
3. Προσθέσαμε ποσότητα 3:1 L3 διαλύματος σε καθένα από τα σωληνάρια και βάλαμε αυτά για heat block στους 50°C για 10 λεπτά (ανά τρία λεπτά αναδεύαμε με vortex το μείγμα μας για να σιγουρευτούμε ότι το τζέλ θα διαλυθεί τελείως).
4. Έπειτα, προχωρήσαμε στον καθαρισμό του DNA βάζοντας τα διαλυμένα κομμάτια από το τζελ, σε στήλες απομόνωσης που φέρουν σωλήνα συλλογής.
5. Φυγοκεντρήσαμε τις στήλες για ένα λεπτό σε >11.000 στροφές. Πετάξαμε το υγρό που συλλέχθηκε στους σωλήνες συλλογής και επανατοποθετήσαμε τις στήλες μέσα στους σωλήνες.
6. Έπειτα, προσθέσαμε διάλυμα W1 (500μl), με αιθανόλη, φυγοκεντρήσαμε για ένα λεπτό τις στήλες σε >12.000 στροφές και πετάξαμε το υγρό που μαζεύτηκε στο σωλήνα.

7. Επανατοποθετήσαμε τις στήλες στη φυγόκεντρο για περίπου δύο λεπτά, με μέγιστη ταχύτητα αυτή τη φορά, με σκοπό να φύγουν από τις στήλες όλα τα υπολείμματα, όπως είναι η αιθανόλη και πετάξαμε τους σωλήνες.
8. Τοποθετήσαμε τις στήλες σε σωληνάρια ανάκτησης και προσθέσαμε το διάλυμα E5 (35μl) στο κέντρο της κάθε στήλης. Έπειτα, αφήσαμε τις στήλες σε θερμοκρασία δωματίου, για ένα λεπτό.
9. Τέλος, φυγοκεντρήσαμε τους σωλήνες, για ένα λεπτό σε >11.000 στροφές. Με αυτόν τον τρόπο, λοιπόν, ο σωλήνας έκλουσης περιείχε το PCR προϊόν καθαρισμένο. Αποθηκεύσαμε τα προϊόντα μας στην κατάψυξη για μελλοντική χρήση.

3.8 Αλληλούχηση με μέθοδο Sanger

Μετά τον καθαρισμό των PCR προϊόντων πραγματοποιήσαμε ηλεκτροφόρηση για το αν όντως βρίσκεται DNA στο διάλυμα έκλουσης. Αφού ολοκληρώσαμε κι αυτή τη διαδικασία, στη συνέχεια, προχωρήσαμε σε αλληλούχηση των αλληλουχιών μας με τη μέθοδο Sanger.

I. Αρχή της μεθόδου

Θεμελιώδη τεχνολογία αποτελεί η αλληλούχηση του DNA, γιατί μας δίνει τη δυνατότητα αποκρυπτογράφησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας από ένα τμήμα DNA ή ακόμα και ολόκληρου του γονιδιώματος. Τα τελευταία χρόνια έχουν επινοηθεί πολλές διαφορετικές τεχνικές αλληλούχησης με την πιο γνωστή να είναι αυτή της μεθόδου Sanger, πάνω στην οποία βασίστηκαν όλες οι μεταγενέστερες τεχνικές. Η μεθοδολογία της βασίζεται στη χρήση διδεόξυ-τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (ddNTPs) κατά το στάδιο της αντίδρασης επέκτασης του εκκινητή. Αυτά μόλις συνδεθούν με τα υπόλοιπα νουκλεοτίδια θα σταματήσουν την επέκταση της αλληλουχίας, σε διαφορετικό σημείο. Αυτό συμβαίνει γιατί δεν φέρουν υδροξυλ-ομάδα που είναι σημαντική για την προσθήκη ενός νέου dNTP. Μονόκλωνο DNA θα χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο για τη σύνθεση ραδιοσημασμένης συμπληρωματικής αλυσίδας, σε *in vitro* περιβάλλον. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται με τη χρήση DNA πολυμεράσης και με ύπαρξη τεσσάρων διαφορετικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dATP, dTTPs, dGTPs και dCTPs), ενός εκ των οποίων είναι ραδιοσημασμένο και ενός συνθετικού ολιγονουκλεοτιδίου-εκκινητή, το οποίο είναι συμπληρωματικό του μητρικού DNA και το οποίο χρησιμοποιείται ως εκκινητής. Το ολιγονουκλεοτίδιο αυτό καταφέρνει και αυξάνει το μέγεθός του με τη διαδοχική προσθήκη νουκλεοτιδίων, όπως δηλαδή συμβαίνει, αντίστοιχα, σε μία κλασική διαδικασία PCR. Τέλος θα προκύψει ένα μείγμα με θραύσματα διαφορετικού μήκους το καθένα, και τα οποία όλα τους θα καταλήγουν σε ένα «πειραγμένο» νουκλεοτίδιο [60].

Όσο αφορά τη μέθοδο Sanger, στις μέρες μας είναι πλήρως αυτοματοποιημένη. Τα νουκλεοτίδια επισημαίνονται με φθορίζουσες χρωστικές, με διαφορετικό χρώμα το καθένα (ddNTPs), με σκοπό να μπορούν να ανιχνευτούν με φθορισμό. Ο φθορισμός χρησιμοποιείται προκειμένου να αποφευχθεί η ραδιενέργεια. Μετά από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, ένας ανιχνευτής φθορισμού, θα περάσει πάνω από το πήκτωμα πολυακριλαμίδης και θα καταγράψει ποιο διδεόξυνουκλεοτίδιο δίνει φθορισμό. Έτσι λοιπόν, μπορούν να μελετηθούν αλληλουχίες που έχουν μήκος το πολύ 500bp. Για μεγαλύτερες αλληλουχίες, έως 1000bp, χρησιμοποιούνται νέες αυτοματοποιημένες συσκευές, οι οποίες πραγματοποιούν τριχοειδή ηλεκτροφόρηση, αντί για πήκτωμα ακριλαμίδιου [51].

II. Πειραματική διαδικασία

Για να στείλουμε για αλληλούχηση τα καθαρισμένα PCR προϊόντα μας βάλουμε τα δείγματά μας σε 96-θέσεων πιάτα. Το κάθε στέλεχός μας προστέθηκε σε 2 θέσεις, μία με τον Forward primer και μία με το Reverse primer.. Κάθε θέση περιείχε 9,5μl των δειγμάτων μας και 2,5 μl (5pmol/μL) από τον εκκινητή.

3.9 Βιοπληροφορικά προγράμματα για ανάλυση αποτελεσμάτων

3.9.1 BioEdit



Εικόνα 23: Πρόγραμμα BioEdit

Το BioEdit (Εικόνα 23) μας δίνει τη δυνατότητα να μελετήσουμε την πιστότητα και την ποιότητα αλληλουχιών που έχουμε λάβει, με την αξιολόγηση νουκλεοτιδικών κορυφών. Μέσω αυτού του προγράμματος, μπορούμε να κάνουμε μικρές αλλαγές στην αλληλουχία μας (π.χ. αν υπάρχει ασάφεια σε κάποια κορυφή) ή να προβούμε σε κάποια άλλη τύπου επεξεργασία (π.χ. να κατασκευάσουμε τη συμπληρωματική της).

Οι δυνατότητες του προγράμματος τις οποίες αξιοποιήσαμε αναλύονται παρακάτω:

1. Σε πρώτη φάση ήταν να αξιολογήσουμε τις κορυφές των νουκλεοτιδίων για την εκάστοτε αλληλουχία. Φροντίσαμε λοιπόν, να ελέγξουμε αν η αλληλουχία που μας έχει σταλεί, φέρει ευδιάκριτες κορυφές, για κάθε στέλεχος. Σε διαφορετική περίπτωση, απορρίψαμε την αλληλουχία και ξαναστείλαμε PCR προϊόν προς νέα αλληλούχηση.
2. Στη συνέχεια, προσπαθήσαμε να αξιολογήσουμε ώστε να ενώσουμε τις Forward με τις Reverse αλληλουχίες DNA, μέσω σύγκρισής τους στο BLAST (Ενότητα 3.9.3).

3.9.2 PubMLST

Το PubMLST (<https://pubmlst.org/>) είναι ένας διαδικτυακός ιστότοπος, που προσφέρεται ελεύθερα στο χρήστη. Αυτός ο ιστότοπος μας βοηθάει, ανεβάζοντας μία συγκεκριμένη αλληλουχία housekeeping γονιδίου να μάθουμε τον αριθμό του συγκεκριμένου αλληλομόρφου, του συγκεκριμένου γονιδίου, για αυτό το είδος που μελετάμε. Επιπρόσθετα, μας δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού τύπου αλληλουχίας (sequence type-ST), που ανήκουν τα υπό διερεύνηση στελέχη, μέσω πολυτοπικής αλληλούχησης (MLST).

Housekeeping genes: αρχικά επιλέξαμε τους οργανισμούς οι οποίοι μας ενδιέφεραν, για τον καθένα χωριστά (*P. aeruginosa*, *E. coli* και *K. pneumoniae*) και στη συνέχεια επιλέξαμε «τυποποίηση μίας αλληλουχίας» (typing single sequence). Στο νέο παράθυρο που άνοιξε, καταθέσαμε την υπό διερεύνηση αλληλουχία και πατήσαμε «υποβολή» (submit). Στην περίπτωση που όλα έχουν γίνει καλά, θα μας βγάλει ότι η αλληλουχία μας έρχεται σε ταύτιση με το αναμενόμενο γονίδιο που ενισχύσαμε μέσω PCR, αλλά θα μας δώσει και τον αριθμό του αλληλομόρφου του γονιδίου αυτού.

Sequence Type-ST: έχοντας βρει τους αριθμούς των αλληλομόρφων για κάθε housekeeping γονίδιο, κατηγοριοποιήσαμε κάθε στέλεχος με κριτήριο το αλληλομορφικό προφίλ (MLST allelic profile). Ως αποτέλεσμα, πήραμε τον Τύπο Αλληλουχίας (Sequence Type-ST) κάθε δείγματος, δηλαδή τον κλώνο στον οποίο ανήκει.

3.9.3 BLASTn

Το βιοπληροφορικό πρόγραμμα BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για σύγκριση δύο ή περισσότερων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μεταξύ τους, αλλά και έχοντας στην κατοχή μας μία νουκλεοτιδική αλληλουχία, να μελετήσουμε κατά πόσο αυτή ταυτίζεται με αλληλουχίες που υπάρχουν ανεβασμένες στη βάση δεδομένων GenBank.

Ταυτοποίηση αλληλουχιών με βάσει τη βάση δεδομένων GenBank:

1. Σε πρώτη φάση, βάλαμε την προς διερεύνηση αλληλουχία μας στον ιστότοπο αυτό και επιλέξαμε «Highly similar sequences», προκειμένου να γίνει αυστηροποίηση των παραμέτρων για την εύρεση ομόλογης αλληλουχίας. Τέλος, πατήσαμε το «Blast» και το πρόγραμμα ξεκίνησε την αναζήτηση-σύγκριση με αλληλουχίες στη βάση δεδομένων.
2. Σε μία αναζήτηση Blastn, βρίσκαμε πολλές αλληλουχίες να έχουν συσχέτιση με τη δικιά μας, και πολλές φορές από διάφορους οργανισμούς. Για να τις διαχωρίσουμε λοιπόν και να επιλέξουμε την κατάλληλη, τις αξιολογήσαμε με βάσει το «ποσοστό ταυτοποίησης» (percentage of identity) [75-98%] και το «ποσοστό κάλυψης» (query coverage) [100%].

Σύγκριση μεταξύ δύο ή περισσότερων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών:

1. Το πρώτο βήμα είναι σχεδόν ίδιο με το βήμα 1 που αναλύθηκε προηγουμένως, με τη μόνη διαφορά ότι βάλαμε και την επιλογή προσθήκη νέας αλληλουχίας.

Έπειτα, ο ιστότοπος έφερε σε μεταξύ τους σύγκριση τις αλληλουχίες και τέλος μας έδωσε τα αποτελέσματα, αν δηλαδή υπάρχει κάποια ομολογία μεταξύ τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι, σε ορισμένες περιπτώσεις το πρόγραμμα χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να ενώσουμε κάποιες αλληλουχίες χρησιμοποιώντας παράλληλα και το BioEdit.

3.9.4 CRISPRCasFinder [online]

Το πρόγραμμα αυτό (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder/Index>), μας δίνει τη δυνατότητα εξέτασης ύπαρξης CRISPR/Cas συστημάτων στην υπό διερεύνηση νουκλεοτιδική αλληλουχία μας, καθώς και ανάλυση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που είναι θετικές για τις αλληλουχίες αυτές. Με την αξιοποίηση αυτού του προγράμματος μπορούμε να μάθουμε πληροφορίες όπως, για τον τύπο του συστήματος CRISPR/Cas που διαθέτει ο οργανισμός που μελετάμε. Πιο συγκεκριμένα, μπορούμε να μάθουμε από πόσους διαχωριστές αποτελείται και πόσοι είναι στο σύνολο, αλλά και να δούμε τον αριθμό και την αλληλουχία των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών.

Η διαδικασία που ακολουθήσαμε για την μελέτη και την εύρεση των CRISPR/Cas περιοχών είναι η παρακάτω:

1. Αρχικά, ανεβάσαμε στον ιστότοπο αυτό την κάθε αλληλουχία σε μορφή αρχείου Fasta.

2. Έπειτα, επειδή οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε, είχαν σχεδιαστεί σε μικρότερη απόσταση από εκατό βάσεις πλευρικά των CRISPR συστοιχιών, ορίσαμε στο πρόγραμμα να ψάξει να βρει αλληλουχίες, που γειτνιάζουν με τις CRISPR συστοιχίες, μεγέθους 10 βάσεων.
3. Τέλος, αποεπιλέξαμε την επιλογή για την εύρεση και *cas* γονιδίων, και πατάμε να ξεκινήσει τη διαδικασία αναζήτησης «Run».

3.9.5 Geneious 7.1.9

Το Geneious (έκδοση 7.1.9) (<https://www.geneious.com/>) είναι το βιοπληροφοριακό πρόγραμμα που μας δίνει πολλές δυνατότητες αν θελήσουμε να ευθυγραμμίσουμε, να συναρμολογήσουμε αλλά και να αναλύσουμε νουκλεοτιδικές και αμινοξικές αλληλουχίες. Πιο αναλυτικά, μία από τις δυνατότητες αυτού του προγράμματος είναι η δημιουργία φυλογενετικών δέντρων (National Cancer Institute, 2022).

Στη μελέτη μας, για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων, ακολουθήσαμε τα παρακάτω βήματα:

1. Σε πρώτη φάση, κατεβάσαμε από τη βάση δεδομένων του GenBank τις αλληλουχίες που μας ενδιέφεραν, δηλαδή αυτές που έφεραν CRISPR συστοιχίες.
2. Έπειτα, ξεχωρίσαμε τις CRISPR συστοιχίες ανάλογα με τον τύπο CRISPR/Cas συστήματος στο οποίο ανήκαν, τόσο τις δικές μας αλληλουχίες, όσο και αυτές από τη βάση δεδομένων. Για τα τύπου I-E και I-F CRISPR/Cas συστήματα, που φέρουν 2 CRISPR συστοιχίες, για κάθε στέλεχος, δημιουργήσαμε μια ενιαία αλληλουχία που αποτελούνταν από τη συνένωση αυτών των δύο.
3. Στη συγκεκριμένη περίπτωση κατασκευάσαμε τα φυλογενετικά δέντρα, για κάθε τύπου CRISPR/Cas συστήματος και κάθε βακτηρίου χωριστά, με τη μέθοδο Neighbor-Joining (NJ). Στη μέθοδο αυτή, λειτουργική ταξινομική μονάδα (operational taxonomic units-OTUs) ορίζεται ένα ζεύγος φύλλων (“leaves”) με ένα κόμβο που τα συνδέει. Η μεθοδος αυτή σχετίζεται με το να βρεθούν ζεύγη OTUs που ελαχιστοποιούν το συνολικό μήκος των κλαδιών σε κάθε στάδιο ομαδοποίησης [61].

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σε αυτή τη μελέτη, από ένα σύνολο εκατό στελεχών *P. aeruginosa*, εκατό στελεχών *E. coli* και εξήντα *K. pneumoniae*, τα πενήντα-ένα (19,61%) προερχόταν από την παθολογική κλινική, τα σαράντα (15,38%) από Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ), τα δεκαοκτώ (6,92%) από την καρδιολογική κλινική, τα δεκαοκτώ (6,92%) από τη χειρουργική, τα δεκαεπτά (6,54%) από τη πνευμονολογική, τα είκοσι-έξι (10%) από το Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών (ΤΕΠ), τα δεκατέσσερα (5,38%) από την ουρολογική και τα υπόλοιπα εβδομήντα-έξι από διάφορες άλλες κλινικές του ΠΓΝΛ (Πίνακας 16).

ΚΛΙΝΙΚΗ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ		
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ	18 (18%)	20 (20%)	13 (13%)
ΜΕΘ	15 (15%)	15 (15%)	10 (10%)
ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΕΣ	11 (11%)	6 (6%)	1 (1%)
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΕΣ	10 (10%)	4 (4%)	4 (4%)
ΠΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΕΣ	10 (10%)	6 (6%)	1 (1%)
ΤΕΠ	10 (10%)	7 (7%)	9 (9%)
ΟΥΡΟΛΟΓΙΚΕΣ	6 (6%)	7 (7%)	1 (1%)
ΛΟΙΠΕΣ	20 (20%)	35 (35%)	21 (21%)
ΣΥΝΟΛΟ	100	100	60

Πίνακας 16: Διασπορά των στελεχών *P. aeruginosa*, *E. coli* και *K. pneumoniae* από διάφορες κλινικές του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (ΠΓΝΛ)

4.1 Έλεγχος ευαισθησίας των στελεχών

Όσο αφορά την ευαισθησία τους σε αντιβιοτικά, τα αποτελέσματα ερμηνεύτηκαν με βάσει τα MICs δεδομένα, και σύμφωνα με κριτήρια της EUCAST (v_14.0_Breakpoint_Tables.xls) (Πίνακα 17).

Αντιμικροβιακός Παράγοντας	<i>P. aeruginosa</i>		<i>E. coli</i> / <i>K. pneumoniae</i>	
	MIC breakpoints (mg/L)		MIC breakpoints (mg/L)	
	S ≤	R >	S ≤	R >
Κεφαλοσπορίνες				
Κεφεπίμη (Cefepime)	0,001	8	1	4
Κεφταζιδίμη (Ceftazidime)	0,001	8	1	4

Καρβαπενέμες				
Ιμιπενέμη (Imipenem)	0,001	4	2	4
Μεροπενέμη (Meropenem)	2	8	2	8
Φθοροκινολόνες				
Σιπροφλοξασίνη (Ciprofloxacin)	0,001	0,5	0,25	0,5
Λεβοφλοξασίνη (Levofloxacin)	0,001	2	0,5	1
Κολιστίνη (Colistin)	4	4	2	2
Αμινογλυκοσίδες				
Αμικασίνη (Amikacin)	16	16	8	8
Γενταμυκίνη (Gentamicin)	IE	IE	2	2
Τομπραμυκίνη (Tobramycin)	2	2	2	2
Πενικιλίνες				
Πιπερακιλλίνη (Piperacillin)	0,001	16	8	8
Piperacillin/Tazobactam	0,001	16	8	8
Ticarcillin/Clavulanic Acid	0,001	16	8	16
Μονοβακτάμες				
Αζτρεονάμη (Aztreonam)	0,001	16	1	4

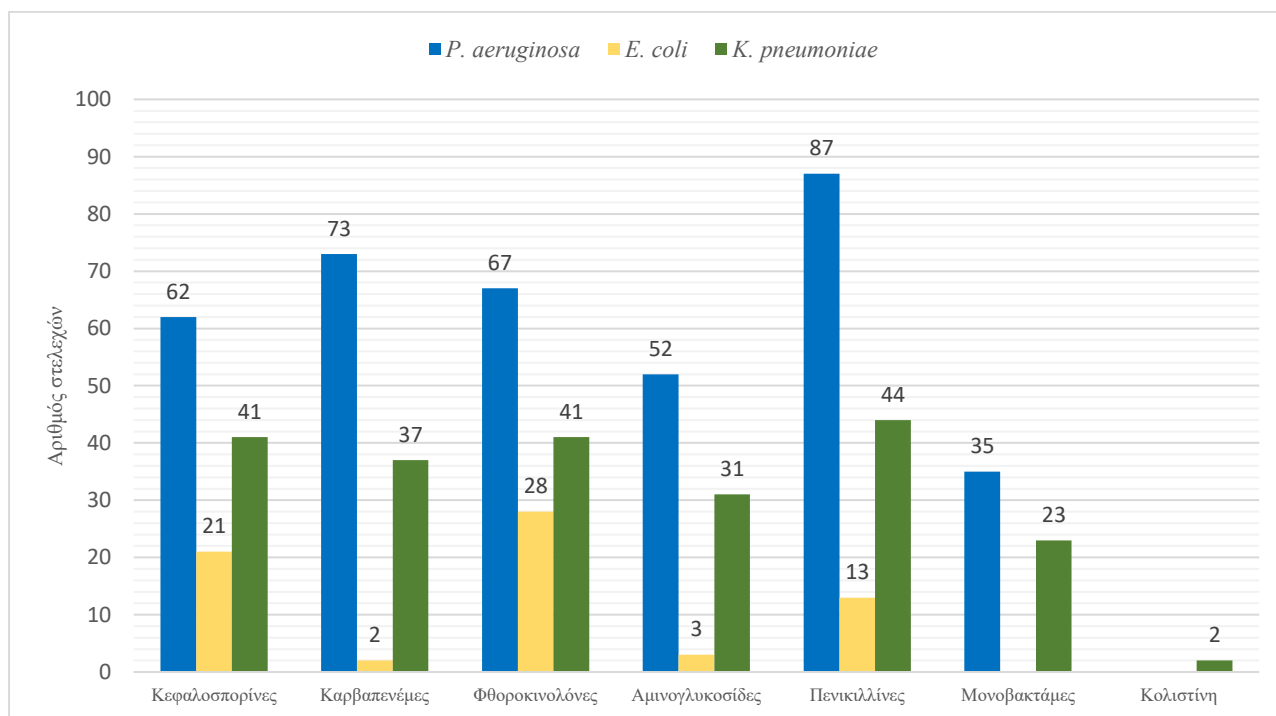
Πίνακας 17: Ευαισθησία των *P. aeruginosa*, *E. coli* και *K. pneumoniae* σε κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες και διάφορα άλλα αντιβιοτικά σύμφωνα με κριτήρια της EUCAST.

Μετά την ανάλυση των αποτελεσμάτων του αυτοματοποιημένου συστήματος Vitek-2, βρέθηκαν τα ακόλουθα αποτελέσματα (Πίνακας 18) (Γράφημα 1):

Αντιμικροβιακός Παράγοντας	<i>P. aeruginosa</i>		<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>	
	Ανθεκτικά	Ευαίσθητα	Ανθεκτικά	Ευαίσθητα	Ανθεκτικά	Ευαίσθητα
Κεφαλοσπορίνες	62	38	21	79	41	19

Καρβαπενέμες	73	27	2	98	37	23
Φθοροκινολόνες	67	33	28	72	41	19
Αμινογλυκοσίδες	52	48	3	97	31	29
Πενικιλίνες	87	13	13	87	44	16
Μονοβακτάμες	35	65	-	-	23	37
Κολιστίνη (Colistin)	0	100	-	-	2	58

Πίνακας 18: Ανθεκτικότητα των στελεχών *P. aeruginosa*, *E. coli* και *K. pneumoniae* σε κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες και διάφορα άλλα αντιβιοτικά.



Γράφημα 1: Απεικόνιση των ανθεκτικών στελεχών *P. aeruginosa*, *E. coli* και *K. pneumoniae* σε διάφορα αντιβιοτικά.

Κρίνεται σημαντικό να αναφερθεί ότι, όσο αφορά τα στελέχη της *P. aeruginosa*, τα είκοσι-τρία (23%) εξ αυτών βρέθηκαν να είναι ευαίσθητα σε καρβαπενέμες και κεφαλοσπορίνες, ενώ εβδομήντα-επτά (77%) στελέχη, παρουσίασαν ανθεκτικότητα σε μία τουλάχιστον από αυτές. Τα στελέχη *E. coli* με τη σειρά τους, εμφάνισαν σημαντική ευαισθησία στις καρβαπενέμες και αμινογλυκοσίδες, 99% και 97% αντίστοιχα, ενώ στις κεφαλοσπορίνες εμφάνισαν αντοχή είκοσι-ένα (21%) στελέχη. Τέλος, σημαντική κρίνεται και η συμπεριφορά των στελεχών *K. pneumoniae*, παρουσία αντιβιοτικών. Στα *K. pneumoniae* παρατηρήθηκε αντοχή σε σαράντα-ένα (68,3%) στελέχη, για τουλάχιστον ένα αντιβιοτικό, από τις καρβαπενέμες και τις κεφαλοσπορίνες, ενώ τα υπόλοιπα δεκαεννέα (31,6%) στελέχη, ήταν ευαίσθητα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι στα γονίδια αντοχής που βρέθηκαν στα στελέχη μας. Για τα *P. aeruginosa*, από τα εβδομήντα-επτά στελέχη που εμφάνισαν αντοχή σε καρβαπενέμες ή κεφαλοσπορίνες, τριάντα-τρία από αυτά τα στελέχη, εντοπίστηκαν να είναι θετικά για την ύπαρξη του γονιδίου *bla_{VIM}*. Επίσης, για τα *E. coli*, από τα είκοσι-ένα στελέχη που εμφάνισαν αντοχή στις κεφαλοσπορίνες, τα δεκαέξι, βρέθηκαν θετικά για την ύπαρξη του γονιδίου *bla_{CTX-M-1}* και τα δώδεκα, για το γονίδιο *bla_{CTX-M-9}*. Τέλος, για τα *K. pneumoniae*, σαράντα-ένα στελέχη ήταν ανθεκτικά για κεφαλοσπορίνες ή καρβαπενέμες, εκ των οποίων σε τέσσερα, εντοπίστηκε το γονίδιο αντοχής *bla_{VIM}*, σε οκτώ, το γονίδιο *bla_{NDM}*, σε δεκαπέντε, το γονίδιο *bla_{KPC}* και σε ένα, το γονίδιο *bla_{OXA}*.

4.2 Τυποποίηση στελεχών μέσω MLST

Τυποποίηση στελεχών και των τριών βακτηρίων, με τη χρήση της μεθόδου MLST, πραγματοποιήθηκε με το βιοπληροφοριακό ιστότυπο PubMLST όπου και κατατέθηκαν τα προφίλς από τα αλληλόμορφα των στελεχών, ξεχωριστά για το καθένα.

4.2.1 *P. aeruginosa*

Ο ιστότοπος που χρησιμοποιήσαμε είναι ο παρακάτω:

https://pubmlst.org/bigdb?db=pubmlst_paeruginosa_seqdef&page=profiles&scheme_id=1

Αποτελέσματα που πήραμε για τα στελέχη των *P. aeruginosa*, τα καταγράψαμε στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 19):

ST	Αρ. Στελεχών	Ανθεκτικά σε αντιβιοτικά			
		Κεφεπίμη (Cefepime)	Κεφταζιδίμη (Ceftazidime)	Ιμιπενέμη (Imipenem)	Μεροπενέμη (Meropenem)
10	1	0	0	0	0
16	1	0	0	1	0
17	2	2	2	2	2
110	1	0	0	0	0
111	25	19	21	22	15
112	4	3	3	4	4

155	1	1	1	1	0
235	9	7	4	6	5
242	2	2	2	2	0
244	5	0	0	2	0
253	3	1	1	1	1
274	5	2	3	4	1
277	3	3	3	3	3
304	12	5	5	8	7
309	8	2	2	4	3
317	1	1	1	1	1
323	2	2	2	2	2
351	1	0	0	0	0
395	1	1	1	1	1
554	1	1	0	0	0
650	1	0	0	0	0
774	1	0	0	0	0
932	3	1	0	0	0
1009	1	0	0	0	0
1327	1	0	0	0	0
1621	1	0	0	0	0
2293	1	0	0	0	0
3160	1	0	0	0	0
3191	2	0	0	2	0

Πίνακας 19: Η αντιστοίχιση στελεχών *P. aeruginosa* σε STs.

Συνολικά, βρήκαμε είκοσι-εννέα διαφορετικούς κλώνους (STs) με την πληθώρα των στελεχών αυτών να ανήκουν σε κλώνους όπως ο 111 (n=25), ο 304 (n=12), ο 235 (n=9) και ο 309 (n=8). Από τη βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι τα στελέχη αυτά, παρατηρούνται συχνά στην Ευρώπη (Βαλκάνια [62], Μεσογειακές χώρες[63], Αμερική[64]) και χαρακτηρίζονται από αντοχή σε διάφορα αντιβιοτικά (Multi Drug Resistance – MDR).

4.2.2 *E. coli*

Ο ιστότοπος που χρησιμοποιήσαμε είναι ο παρακάτω:

https://pubmlst.org/bigdb?db=pubmlst_escherichia_seqdef&page=profiles

Τα αποτελέσματα που πήραμε για τα στελέχη των *E. coli*, είναι στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 20):

ST	Αρ. Στελεχών	Ανθεκτικά σε αντιβιοτικά	
		Κεφταζιδίμη (Ceftazidime)	Ετραπενέμη (Etrapanem)
14	1	0	0
95	1	0	0
104	5	0	0
131	30	12	0
155	1	0	0
186	1	0	0
390	3	0	0
410	2	0	0
449	1	0	0
476	2	1	1
501	2	1	0

569	3	0	0
646	4	0	0
708	2	0	0
922	4	1	0
1011	1	0	0
1133	1	0	0
1195	1	1	1
1432	1	0	0
1538	1	0	0
2174	1	0	0
2371	1	0	0
3059	1	1	0
3387	1	0	0
3423	1	0	0
3459	1	0	0
4077	1	0	0
4560	4	1	0
7399	7	1	0
7527	5	1	0
9612	8	0	0
10605	2	0	0

Πίνακας 20: Αντιστοίχιση των στελεχών *E. coli* σε STs.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα των STs που ανήκουν τα *E. coli*, παρατηρήσαμε ότι από τριάντα-δύο διαφορετικούς κλώνους, η πληθώρα των στελεχών αυτών να ανήκουν σε κλώνους όπως ο 131 (n=30), ο 9612 (n=8) και ο 7399 (n=7). Πιο αναλυτικά, στελέχη με ST131, έχουν βρεθεί από τη βιβλιογραφία, να φέρουν γονίδια που παράγουν β-λακταμάσες, όπως η CTX-M-15, και η διασπορά αυτού του κλώνου θεωρείται παγκόσμια [65].

4.2.3 *K. pneumoniae*

Ο ιστότοπος που χρησιμοποιήσαμε είναι ο παρακάτω:

https://pubmlst.org/bigssdb?db=pubmlst_mlst_seqdef&page=profiles

Τα αποτελέσματα που πήραμε για τα στελέχη των *K. pneumoniae*, είναι στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 21):

ST	Αρ. Στελεχών	Ανθεκτικά σε αντιβιοτικά			
		Κεφεπίμη (Cefepime)	Κεφταζιδίμη (Ceftazidime)	Ιμιπενέμη (Imipenem)	Ετραπενέμη (Etrapepenem)
39	1	1	1	1	1
258	2	2	2	2	2
272	1	0	0	0	0
309	1	1	1	1	1
323	29	14	18	15	14
564	3	3	3	3	3
667	6	6	6	6	5
758	1	0	0	0	0
909	3	1	1	1	1
1401	6	5	6	6	4
2435	4	2	2	2	2

2711	1	0	0	0	0
3827	1	0	0	0	0
5103	1	0	0	0	0

Πίνακας 21: Αντιστοίχιση των στελεχών *K. pneumoniae* σε STs.

Σχετικά, λοιπόν, με τα *K. pneumoniae*, βρήκαμε δεκατέσσερα διαφορετικούς κλώνους, με την πληθώρα των στελεχών αυτών να ανήκουν σε κλώνους όπως ο 323 (n=29), ο 667 (n=6) και ο 1401 (n=6). Για τον κλώνο 323 (ST323) γνωρίζουμε ότι έχει βρεθεί σε αρκετά νοσοκομεία της Ελλάδας και τα στελέχη αυτά έχουν βρεθεί να παράγουν καρβαπενέμες [66].

4.3 Έλεγχος ύπαρξης CRISPR/Cas συστημάτων στα ενδονοσοκομειακά στελέχη

4.3.1 *P. aeruginosa*

Από ένα σύνολο εκατό στελεχών *P. aeruginosa*, εντοπίστηκαν τα τριάντα-έξι να είναι θετικά για CRISPR/Cas συστήματα. Από αυτά μόνο εννέα ήταν ευαίσθητα σε καρβαπενέμες. Αναλυτικότερα, στις *P. aeruginosa* που διαθέταμε, καταφέραμε και βρήκαμε όλα τα διαφορετικού τύπου CRISPR/Cas συστήματα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (I-C, I-E και I-F). Τα θετικά για τύπου I-C CRISPR/Cas συστήματα στελέχη, ήταν εννέα σε αριθμό [ST235 (n=5), ST304 (n=3) και ST323 (n=1)], τα οποία δεν ήταν ευαίσθητα για τις καρβαπενέμες. Τα θετικά για τύπου I-E CRISPR/Cas συστήματα που διαπιστώσαμε, ήταν οκτώ στελέχη [ST112 (n=3), ST395 (n=1), ST554 (n=1), ST1327 (n=1), ST1621 (n=1) και ST3160 (n=1)], από τα οποία τέσσερα ήταν ανθεκτικά σε καρβαπενέμες. Τέλος, τα θετικά για τύπου I-F CRISPR/Cas συστήματα, ήταν δεκαεννέα [ST244 (n=4), ST253 (n=3), ST274 (n=3), ST242 (n=2), ST3191 (n=2), ST16 (n=1), ST17 (n=1), ST309 (n=1), ST317 (n=1) και ST774 (n=1)], δηλαδή βρέθηκαν στα περισσότερα από αυτά τα στελέχη. Από αυτά, τα 14 δεν ευαίσθητα για τις καρβαπενέμες (Πίνακας 22).

<i>P. aeruginosa</i>				
CRISPR/Cas σύστημα	Αριθμός στελεχών	STs	Καρβαπενέμες	
			Ευαίσθητα	Ανθεκτικά
I-C	9	235 (n=5) 304 (n=3) 323 (n=1)	0	9
I-E	8	112 (n=3) 395 (n=1)	4	4

		554 (n=1) 1327 (n=1) 1621 (n=1) 3160 (n=1)		
I-F	19	244 (n=4) 253 (n=3) 274 (n=3) 242 (n=2) 3191 (n=2) 16 (n=1) 17 (n=1) 309 (n=1) 317 (n=1) 774 (n=1)	5	14

Πίνακας 22: CRISPR/Cas-θετικά στελέχη για τα *P. aeruginosa*

Στα υπόλοιπα εξήντα-τέσσερα στελέχη, δεν εντοπίστηκε κάποιο CRISPR/Cas σύστημα. Αυτά βρέθηκαν να ανήκουν σε δεκαεπτά διαφορετικούς κλώνους (STs), με τα τριάντα (46,9%) από αυτά τα στελέχη να ανήκουν στον κλώνο 111 (ST111). Από τα υπόλοιπα, τα τριάντα-τέσσερα στελέχη ανήκαν στους κλώνους 235 (n=2), 274 (n=2), 277 (n=3), 304 (n=7), 309 (n=6), και 932 (n=3), 10 (n=1), 17 (n=1), 110 (n=1), 112 (n=1), 155 (n=1), 244 (n=1), 323 (n=1), 351 (n=1), 650 (n=1), 1009 (n=1) και 2293 (n=1). Επιπλέον, βρήκαμε και στελέχη, τα οποία ανήκαν αν και ανήκαν στους ίδιους κλώνους, κάποια έφεραν ενώ κάποια άλλα όχι CRISPR/Cas συστήματα (ST244, ST274, ST235, ST304 και ST323).

4.3.2 *E. coli*

Για τα εκατό στελέχη *E. coli*, βρήκαμε συνολικά δώδεκα εξ' αυτών που είναι θετικά για CRISPR/Cas συστήματα και για τους δύο τύπους. Πιο συγκεκριμένα, πέντε στελέχη βρέθηκαν θετικά για τύπου I-E CRISPR/Cas συστήματα [ST501 (n=1), ST708 (n=1), ST922 (n=1), ST1011 (n=1), ST9612 (n=1)], ενώ για τύπου I-F CRISPR/Cas συστήματα, βρέθηκαν θετικά επτά στελέχη [ST95 (n=1), ST390 (n=3), ST569 (n=2), ST2371 (n=1)]. Όσο αφορά την ανθεκτικότητα τους στις καρβαπενέμες, κανένα στέλεχος από αυτά, δεν ήταν θετικό και για CRISPR/Cas συστήματα, ενώ για τις κεφαλοσπορίνες μόνο ένα στέλεχος εμφάνισε αντοχή σε αυτές (ST501) και έφερε τύπο I-E CRISPR/Cas σύστημα (Πίνακας 23).

<i>E. coli</i>				
CRISPR/Cas σύστημα	Αριθμός στελεχών	STs	Ανθεκτικά	
			Καρβαπενέμες	Κεφαλοσπορίνες
I-E	5	501 (n=1) 708 (n=1) 922 (n=1) 1011 (n=1) 9612 (n=1)	0	1
I-F	7	95 (n=1) 390 (n=3) 569 (n=2) 2371 (n=1)	0	0

Πίνακας 23: Ταξινόμηση των CRISPR/Cas-θετικών στελεχών *E. coli*.

Όσο αφορά τα υπόλοιπα ογδόντα-οκτώ στελέχη, κάποια από αυτά, βρέθηκαν να είναι αρνητικά για την ύπαρξη *cas* γονιδίων (*cas1*, *cas2*) αλλά θετικά για CRISPR συστοιχίες. Πιο συγκεκριμένα, δεκαοκτώ στελέχη για IE τύπου CRISPR συστοιχίες και οκτώ στελέχη για IF τύπου συστοιχίες. Αυτές οι συστοιχίες αν και θεωρούνται «ορφανές» (orphan CRISPR arrays), οι διαχωριστές τους συμπεριλήφθηκαν στα αποτελέσματα μας. Κάποτε οι CRISPR συστοιχίες αυτές, πιθανόν να υπήρξαν μέρος ενός ολοκληρωμένου συστήματος άμυνας των μικροοργανισμών και να μας παρέχουν την πληροφορία για το ιστορικό προέλευσης των διαχωριστών.

4.3.3 *K. pneumoniae*

Από τις πειραματικές διαδικασίες που έγιναν στα εξήντα κλινικά στελέχη *K. pneumoniae*, που μελετήσαμε για τυχόν εύρεση CRISPR/Cas συστημάτων, διαπιστώσαμε ότι κανένα από αυτά δεν βρέθηκε θετικό για τέτοιου τύπου συστήματα. Όλα, δηλαδή, τα στελέχη ήταν αρνητικά τόσο για την ύπαρξη των *cas* γονιδίων, όσο και για την ύπαρξη των CRISPR συστοιχιών.

4.4 Ανάλυση των CRISPR συστοιχιών

Σε αυτό το στάδιο, μέσω του προγράμματος BioEdit, πήραμε τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες Forward και Reverse των CRISPR συστοιχιών, των στελεχών, δηλαδή, που ήταν θετικά για CRISPR/Cas συστήματα, και τις εισαγάγαμε στη βιοπληροφορική διαδικτυακή πλατφόρμα BLASTn. Το πρόγραμμα BLASTn, μας έδωσε τη δυνατότητα δημιουργίας αλλά και επιδιόρθωσης των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των CRISPR συστοιχιών. Με λίγα λόγια, μέσω αυτού, ελέγξαμε που

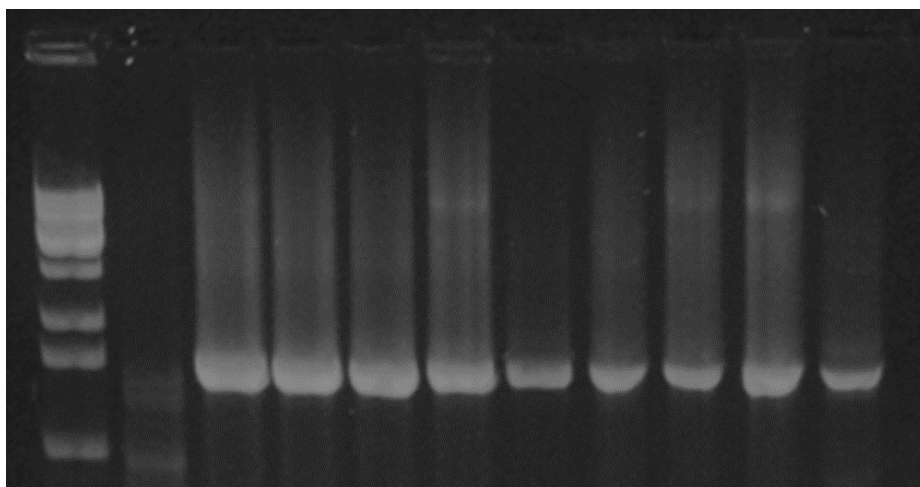
ταυτίζονται οι Forward και οι Reverse αλληλουχίες που ανήκαν στο ίδιο δείγμα και επιδιορθώσαμε κάποια νουκλεοτίδια που ήταν διαφορούμενα στην αλληλούχηση.

Έπειτα, χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα CRISPRCasFinder online, για τις διορθωμένες μας πλέον νουκλεοτιδικές αλληλουχίες. Οι πληροφορίες που συλλέξαμε είχαν να κάνουν με το μήκος αλλά και την αλληλουχία τόσο των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, όσο και των διαχωριστών.

Στη συνέχεια, μέσω του BLASTn, έγινε ανάλυση των αλληλουχιών των διαχωριστών με σκοπό να βρεθεί από που προέρχεται αυτή η πληροφορία, αν δηλαδή είναι ομόλογη με αλληλουχία από χρωμόσωμα, φάγο, πλασμίδιο κ.α. Τα αποτελέσματα μας, πέρασαν από αξιολόγηση και κρατήσαμε ως αληθή, αυτά που εμφάνισαν υψηλή πιστότητα (identity scores) με τους διαχωριστές μας [100% coverage, $\geq 90\%$ identity].

4.4.1 Τύπου I-C CRISPR/Cas συστήματα

Όπως ήδη έχει ειπωθεί, τύπου I-C CRISPR/Cas συστήματα για τα βακτήρια τα οποία μελετήσαμε εντοπίζονται μόνο στις *P. aeruginosa*. Έτσι λοιπόν, από συνολικά εκατό στελέχη *P. aeruginosa*, τα εννέα στελέχη εντοπίστηκαν θετικά για τύπου I-C CRISPR/Cas σύστημα. Τα συγκεκριμένα εννέα αυτά στελέχη, εντοπίστηκαν να ταξινομούνται σε τρεις κλώνους (ST235 (n=5), ST304 (n=3) και ST323 (n=1)). Όλοι αυτοί οι κλώνοι ανήκαν στο ίδιο κλωνικό σύμπλοκο (Clonal complex 235 - CC235) και βρέθηκαν να φέρουν ίδιες CRISPR συστοιχίες, άρα ίδιες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και διαχωριστές. Η οπτική επιβεβαίωση δόθηκε από το πήκτωμα αγαρόζης όπου είχε προηγηθεί ηλεκτροφόρηση.



Εικόνα 24: Τύπου I-C CRISPR συστοιχίες *P. aeruginosa*.

Πιο αναλυτικά, η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (DR consensus) ήταν σε όλες τις I-C συστοιχίες Η αλληλουχία 5'-GTTTCAATCCACGCGCCCGTGCGGGGCGCGAC-3' αποτελεί την επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (DR consensus) για όλες τις I-C CRISPR συστοιχίες. Είκοσι ήταν οι μοναδικοί διαχωριστές που βρέθηκαν, με τον καθένα να έχει μήκος 34-35 bp, σε μία συστοιχία που το συνολικό της μήκος ήταν περίπου 1500bp (Εικόνα 24).

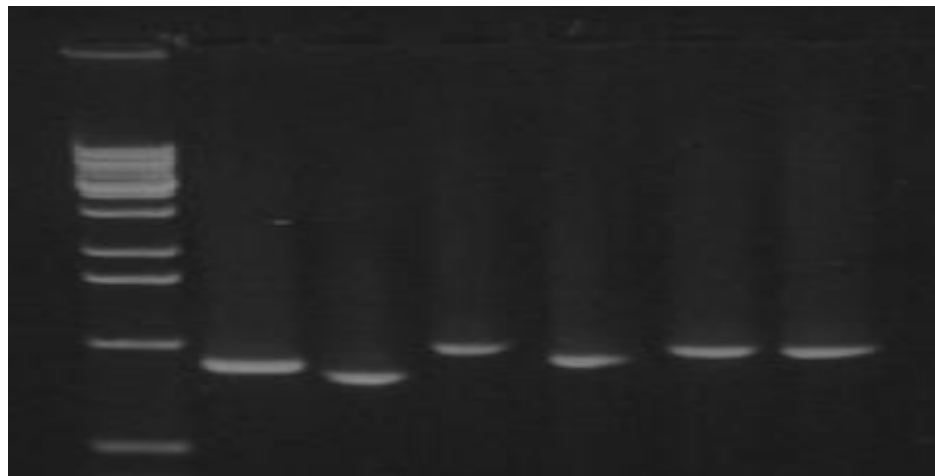
Από είκοσι μοναδικούς διαχωριστές, ταυτοποιήσαμε έξι (30%), με αλληλουχίες χρωμοσώματος *P. aeruginosa*, δώδεκα (60%) με φάγων και δύο (10%) με πλασμιδίων.

4.4.2 Τύπου I-E CRISPR/Cas συστήματα

Από τα τρία διαφορετικά είδη βακτηρίων που διαθέταμε, τύπου I-E CRISPR/Cas συστήματα διαθέτουν και τα τρία βακτήρια, ωστόσο εμείς εντοπίσαμε το σύστημα αυτό μόνο στα *P. aeruginosa* και στα *E. coli*. Όπως προαναφέρθηκε, όλα τα στελέχη *K. pneumoniae* που διαθέταμε, βρήκαν αρνητικά για την ύπαρξη I-E CRISPR/Cas συστήματος. Η ανάλυση των CRISPR συστοιχιών, για κάθε είδος, έγινε χωριστά.

4.4.2.1 *P. aeruginosa*

Θετικά για τύπου I-E CRISPR/Cas συστήματα, βρέθηκαν οκτώ στελέχη. Αυτά ταξινομήθηκαν σε έξι διαφορετικούς κλώνους. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα συστήματα τύπου I-E και I-F, φέρουν δύο CRISPR συστοιχίες το καθένα.



Εικόνα 25: Τύπου I-E CRISPR συστοιχίες *P. aeruginosa*.

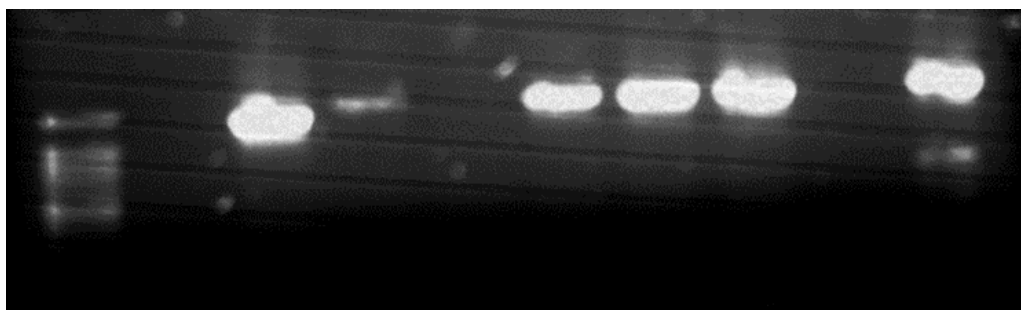
Η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (DR consensus) που βρέθηκε ήταν η 5'-CGGTTCATCCCCACGCATGTGGGGAACAC-3', και εντοπίστηκε και στις δύο συστοιχίες. Ο

αριθμός των διαχωριστών σε κάθε συστοιχία κυμαινόταν μεταξύ 9-13 για την CRISPR1 συστοιχία και μεταξύ 6-10 για τη δεύτερη (CRISPR2). Το μήκος τους κυμαίνονταν μεταξύ 750-950bp και 700-850bp, αντίστοιχα (Εικόνα 25). Επιπλέον, οι CRISPR συστοιχίες που ανήκαν σε στελέχη από το ίδιο κλωνικό σύμπλοκο (395), ήταν μεταξύ τους ίδιες, σε σχέση με τα στελέχη που ανήκαν σε διαφορετικούς κλώνους.

Από ένα σύνολο ογδόντα μοναδικών διαχωριστών, βρήκαμε ότι τα τριάντα-εννέα (49%) ταυτίζονται με αλληλουχίες χρωμοσώματος *P. aeruginosa*, τα είκοσι-τρία (29%) με φάγων και τα έξι (7%) με πλασμιδίων. Επίσης, ένα (1%) εντοπίστηκε να ταυτίζεται με αλληλουχία νησιδίου παθογονικότητας της *P. aeruginosa* (*P. aeruginosa* pathogenicity island-PAGI) και ένα (1%) αλληλουχία ενσωματούμενου συζευκτικού στοιχείου (integrative conjugative element-ICE). Θα αποτελούσε παράληψη να μη γίνει αναφορά και στις δέκα (13%) αλληλουχίες των διαχωριστών όπου δε βρέθηκαν να έχουν κάποια ταύτιση με αλληλουχίες που είναι ήδη κατατεθειμένες στη βάση δεδομένων του GenBank.

4.4.2.2 *E. coli*

Πέντε στελέχη ήταν αυτά που είχαν βρεθεί να είναι θετικά για τύπου I-E CRISPR/Cas συστήματα, το καθένα από τα οποία ανήκει σε διαφορετικό κλώνο [ST501 (n=1), ST708 (n=1), ST922 (n=1), ST1011 (n=1), ST9612 (n=1)]. Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, για τα τύπου I-E αλλά και τα τύπου I-F συστήματα των *E. coli*, έχουν παρατηρηθεί 2 CRISPR συστοιχίες στο καθένα.



Εικόνα 26: Τύπου I-E CRISPR συστοιχίες *E. coli*.

Η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία που βρέθηκε ήταν η 5'-CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACAC-3', και εντοπίστηκε και στις δύο συστοιχίες. Ο αριθμός των διαχωριστών σε κάθε συστοιχία κυμαινόταν μεταξύ 7-16 για την CRISPR1 συστοιχία και μεταξύ 4-9 για τη δεύτερη (CRISPR2). Το μήκος τους κυμαίνονταν μεταξύ 700-1000bp και 600-850bp, αντίστοιχα (Εικόνα 26).

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, από ένα σύνολο ενενήντα-οχτώ μοναδικών διαχωριστών (117 συνολικά spacers), τα εβδομήντα-οχτώ (79,6%) βρήκαμε να προέρχονται από χρωμοσωμικές αλληλουχίες *E. coli*, τέσσερα (4,08%) πιθανότατα από φάγους και τρία (3,06%) από πλασμίδια. Θα αποτελούσε παράληψη να μη γίνει αναφορά και στις δεκατρείς (13,27%) αλληλουχίες των διαχωριστών όπου δε βρέθηκαν να έχουν κάποια ταύτιση με αλληλουχίες που είναι ήδη κατατεθειμένες στη βάση δεδομένων του GenBank.

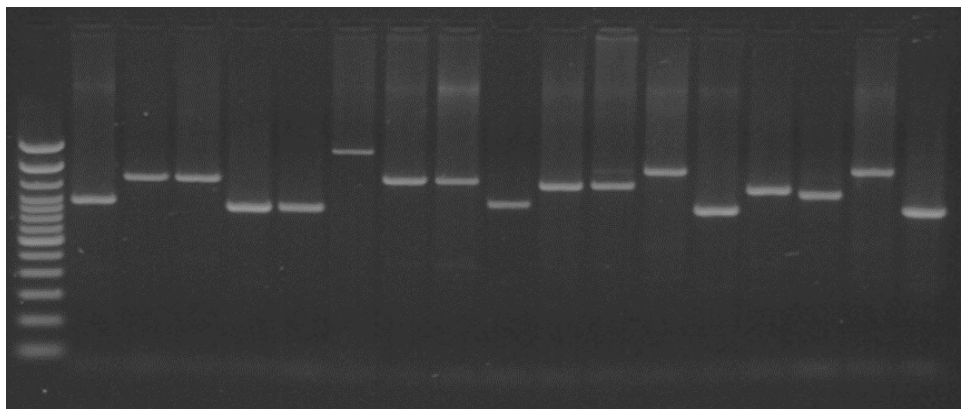
4.4.3 Τύπου I-F CRISPR/Cas συστήματα

Από τα τρία διαφορετικά είδη βακτηρίων που διαθέταμε, τύπο I-F CRISPR/Cas συστήματα διαθέτουν τα *P. aeruginosa* και τα *E. coli*. Η ανάλυση των CRISPR συστοιχιών, για κάθε είδος, έγινε χωριστά.

4.4.3.1 *P. aeruginosa*

Θετικά για τύπου I-F CRISPR/Cas συστήματα, βρέθηκαν δεκαεννέα στελέχη. Αυτά ταξινομήθηκαν σε εννέα διαφορετικούς κλώνους. Δεκαπέντε από τα δεκαεννέα στελέχη, ομαδοποιούνταν σε κλώνους με ST253 (n=4), ST244 (n=4), ST242 (n=3), ST3191 (n=2) και ST274 (n=2).

Η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία που βρέθηκε ήταν η 5'-TTTCTTAGCTGCCTATACGGCAGTGAAC-3', και εντοπίστηκε και στις δύο συστοιχίες. Το μήκος των διαχωριστών είναι περίπου 32bp και αριθμός των διαχωριστών σε κάθε συστοιχία κυμαινόταν μεταξύ 11-26 για την CRISPR1 συστοιχία και μεταξύ 4-27 για τη δεύτερη (CRISPR2). Το μήκος τους κυμαίνονταν μεταξύ 850-1950bp και 650-1950bp, αντίστοιχα (Εικόνα 27).



Εικόνα 27: Τύπου I-F CRISPR συστοιχίες *P. aeruginosa*.

Όσα στελέχη ανήκαν στο κλωνικό σύμπλοκο 242 (ST242), παρουσίασαν ίδιες CRISPR1 και CRISPR2 συστοιχίες. Τα στελέχη των κλώνων 244 και 253, εμφάνισαν παρόμοιες CRISPR1 συστοιχίες, ενώ διέφεραν ως προς τις CRISPR2 περιοχές. Επίσης, αν και δύο στελέχη (Pae2542, Pae2488) ανήκαν στον ίδιο κλώνο (ST3191), στην CRISPR1 συστοιχία εμφάνισαν διαφορά ως προς τον αριθμό των διαχωριστών που διέθεταν. Το στέλεχος Pae2542, έφερε πέντε επιπλέον διαχωριστές, γεγονός που αιτιολογεί πιθανή μεταγενέστερη απόκτηση διαχωριστών. Επιπλέον, υπήρξαν και άλλα στελέχη που αν και ανήκαν στον ίδιο κλώνο (π.χ. ST274), οι CRISPR συστοιχίες τους εμφάνισαν μικρές διαφορές. Όσο αφορά στελέχη που ανήκαν και σε διαφορετικούς κλώνους, οι CRISPR συστοιχίες τους διέφεραν και ως προς τον αριθμό αλλά και ως προς την αλληλουχία των διαχωριστών.

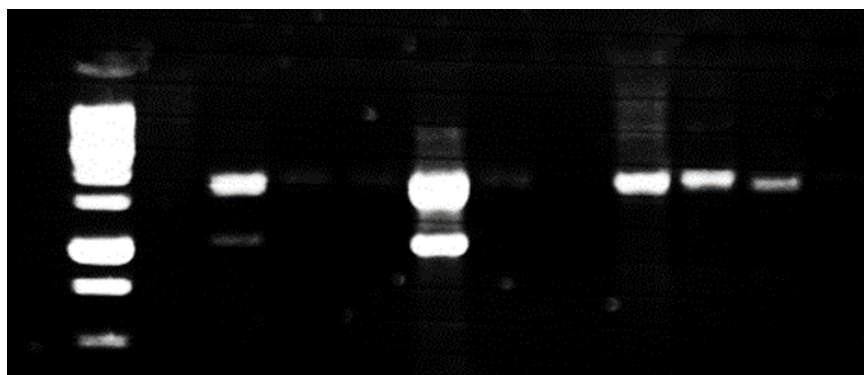
Τα αποτελέσματα αυτά μας έδειξαν την ύπαρξη της εξελικτικής πορείας στα CRISPR/Cas συστήματα, από το γεγονός ότι κάποια στελέχη ίδιου κλώνου, προσλαμβάνουν νέους διαχωριστές. δηλαδή, ότι τα συστήματα αυτά ήταν ενεργά και ότι τα στελέχη είχαν έρθει σε επαφή με κινητά γενετικά στοιχεία.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, από ένα σύνολο 325 μοναδικών διαχωριστών, τα εκατό-πενήντα-τρία (47%) βρήκαμε να προέρχονται από χρωμοσωμικές αλληλουχίες *P. aeruginosa*, εκατό-τρία (32%) πιθανότατα από φάγους, οχτώ (2%) από πλασμίδια και δύο (1%) από νησίδες παθογονικότητας της *P. aeruginosa*. Θα αποτελούσε παράληψη να μη γίνει αναφορά και στις πενήντα-εννέα (18%) αλληλουχίες των διαχωριστών όπου δε βρέθηκαν να έχουν κάποια ταύτιση με αλληλουχίες που είναι ήδη κατατεθειμένες στη βάση δεδομένων του GenBank.

4.4.3.2 *E. coli*

Όσο αφορά τα επτά θετικά στελέχη για τύπου I-F CRISPR/Cas συστήματα, ταξινομούνται σε τέσσερις διαφορετικούς κλώνους [ST95 (n=1), ST390 (n=3), ST569 (n=2), ST2371 (n=1)]. Από αυτά τα 4 ανήκουν στο ίδιο κλωνικό σύμπλοκο 95 [ST95 (n=1), ST390 (n=3)].

Η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία που βρέθηκε ήταν η 5'-GTTCAGTCCGTACAGGCAGCTTAGAAA-3', και εντοπίστηκε και στις δύο συστοιχίες. Ο αριθμός των διαχωριστών σε κάθε συστοιχία κυμαινόταν μεταξύ 4-13 για την CRISPR3 συστοιχία και μεταξύ 4-6 για τη δεύτερη (CRISPR4), με κάθε διαχωριστή να έχει μήκος 32bp. Το μήκος των συστοιχιών κυμαίνεται περίπου 500-950bp και 500-600bp, αντίστοιχα (Εικόνα 28).



Εικόνα 28: Τύπου I-F CRISPR συστοιχίες *E. coli*.

Αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα στελέχη που ανήκαν στο κλωνικό σύμπλοκο 95 εμφάνισαν πανομοιότυπες CRISPR3 και CRISPR4 περιοχές. Αντιθέτως, τα 2 στελέχη που ανήκουν στον κλώνο 569 (ST569), εμφάνισαν τελείως διαφορετικά spacers τόσο στη CRISPR3, όσο και στη CRISPR4 συστοιχία.

Τα αποτελέσματα αυτά μας έδειξαν την ύπαρξη της εξελικτικής πορείας στα CRISPR/Cas συστήματα, από το γεγονός ότι κάποια στελέχη ίδιου κλώνου, προσλαμβάνουν νέους διαχωριστές. Δηλαδή, ότι τα συστήματα αυτά ήταν ενεργά και ότι τα στελέχη είχαν έρθει σε επαφή με κινητά γενετικά στοιχεία.

Έτσι, λοιπόν, από ένα σύνολο πενήντα-πέντε μοναδικών διαχωριστών (80 συνολικά), βρήκαμε με τη χρήση του BLASTn λογισμικού, ότι οι τριάντα-εννέα (70,9%) προέρχονται από το χρωμόσωμα του *E. coli*, οι τέσσερις (4,55%) πιθανότατα από πλασμίδια και οι υπόλοιποι δώδεκα (21,82%) διαχωριστές δεν παρουσίασαν ομοιότητα με γνωστές αλληλουχίες. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι, για τα spacers αυτών των συστοιχιών δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση με φάγους.

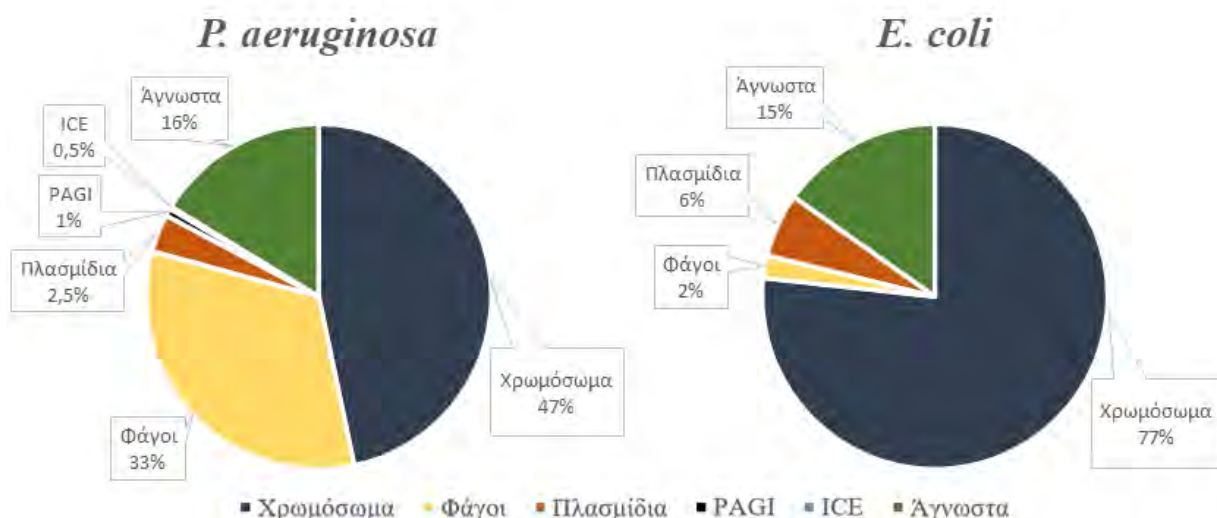
4.4.4 Σύγκριση CRISPR συστοιχιών μεταξύ των διαφορετικών ειδών βακτηρίων

Αξίζει να σημειωθεί ότι, παρόλο που τόσο τα *P. aeruginosa*, όσο και τα *E. coli*, έφεραν ίδιου τύπου CRISPR/Cas συστήματα (I-E και I-F), δεν παρατηρήσαμε ομοιότητες στις CRISPR συστοιχίες. Δηλαδή οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες των τύπου I-E CRISPR/Cas συστημάτων μεταξύ των *P. aeruginosa* και *E. coli*, διέφεραν σε μεγάλο βαθμό. Αντίστοιχα, διαφορές στις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες παρατηρήθηκαν και για τύπου I-F CRISPR/Cas συστήματα. Επιπλέον, οι διαχωριστές και των δύο αυτών βακτηρίων, διέφεραν απόλυτα, δηλαδή δεν υπήρξε κάποιος διαχωριστής που να ταυτίζεται με αλληλουχία φάγου ή πλασμιδίου.

Για τις *P. aeruginosa* που διαθέταμε, συνολικά εντοπίστηκαν τετρακόσιοι-είκοσι-πέντε μοναδικοί διαχωριστές (Γράφημα 2), εκ των οποίων οι εκατό-ενενήντα-οχτώ (47%) ήταν ομόλογες με αλληλουχίες του χρωμοσώματος του *P. aeruginosa*. Επίσης, εξήντα-εννέα (16%) αλληλουχίες των διαχωριστών, μέσω BLASTn, δε μπορούσαν να ταυτιστούν με νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που είναι ήδη στη βάση δεδομένων του GenBank. Αυτό μπορεί να συμβαίνει γιατί πολλά γενετικά στοιχεία δεν είναι χαρακτηρισμένα. Επιπλέον, βρήκαμε ότι εκατό-τριάντα-οχτώ (33%) διαχωριστές ταυτίζονται με φάγους, όπως είναι οι phiCTX [GenBank: AB008550], PP9W [GenBank: MZ773939], UMP151 [GenBank: MK934841], D3 [GenBank: AF165214], phi [GenBank: KT887558] και MD8 [GenBank: NC_031091]. Επιπλέον, έγινε ταυτοποίηση και σε άλλους δεκαπέντε διαχωριστές με πλασμίδια. Τα πλασμίδια αυτά, είτε είναι χαρακτηρισμένα ήδη από στελέχη *P. aeruginosa* (pJHX613 [GenBank: CP020602], pSE5419-1 [GenBank: CP081347] και pMS14403A [GenBank: CP049162]), είτε από άλλα βακτήρια (πλασμίδιο pL902 του στελέχους L90-1 *Proteus mirabilis* [GenBank: CP045255] και πλασμίδιο pEC743_4 του Ecol_743 της *E. coli* [GenBank: CP015073]). Έπειτα, από τους τελευταίους διαχωριστές που βρήκαμε, οι τέσσερις ταυτοποιήθηκαν με αλληλουχίες περιοχών που αφορούν την πλασμιδιακή αντιγραφή (plasmid replication), ενώ τρεις βρήκαμε ότι είναι ομόλογες με αλληλουχίες περιοχών που αφορούν στη συζευκτική μεταφορά (conjugative transfer). Αξίζει να σημειωθεί ότι, δε βρήκαμε σε κανένα από αυτά τα χαρακτηρισμένα πλασμίδια πληροφορία σχετικά με γονίδια που προσφέρουν αντοχή σε αντιβιοτικά. Τρεις διαχωριστές είναι ομόλογη με αλληλουχίες γενωμικών νησίδων του *P. aeruginosa* (*P. aeruginosa* genomic islands - PAGI), όπως είναι οι PAGI-6 και οι νησίδες παθογονικότητας της *P. aeruginosa* (PAGI-598) [GenBank: MT074675]. Τέλος, ένας διαχωριστής εντοπίστηκε να είναι ομόλογος με τμήμα του γονιδίου *traD* από ένα ενσωματούμενο συζευκτικό στοιχείο (integrative conjugative element - ICE) [GenBank: MK497171].

Όσο αφορά τα στελέχη *E. coli*, θετικά για CRISPR/Cas συστήματα, βρέθηκαν συνολικά εκατό-πενήντα-ένα μοναδικοί διαχωριστές (Γράφημα 2). Από αυτούς οι εκατό-δεκαέξι (77%) είναι ίδιοι με περιοχές χρωμοσωμικών αλληλουχιών των *E. coli* ή ήδη χαρακτηρισμένων CRISPR συστοιχιών αυτής (n=5). Είκοσι-τρεις (15%) διαχωριστές δεν ταυτοποιήθηκαν με καμία αλληλουχία που είναι ήδη κατατεθειμένη στη βάση δεδομένων GenBank, υποθέτοντας ότι ένας σημαντικός αριθμός γενετικών στοιχείων δεν έχει χαρακτηριστεί ακόμα. Εννέα από αυτούς τους διαχωριστές (6%), βρέθηκαν να ταιριάζουν με αλληλουχίες πλασμιδίων, μέσω BLASTn, όπως το pAVS0973-C [GenBank: CP124474], το pAVS0282-A [GenBank: CP124516] και το p24C171-1 [GenBank: LC501671], που έχουν χαρακτηριστεί από στελέχη *E. coli*. Ωστόσο, δεν βρέθηκε να υπάρχει κανένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, σε κανένα από αυτά τα χαρακτηρισμένα πλασμίδια. Τέλος,

ταυτοποιήσαμε με αλληλουχίες φάγων τρεις διαχωριστές (2%), όπως οι isolate 3509_17389 [GenBank: OP075566], isolate 3121_76502 [GenBank: OP075223] και vB_EcoM-813R1 [GenBank: ON470617].



Γράφημα 2: Προέλευση των μοναδικών διαχωριστών των *P. aeruginosa* και *E. coli*.

Συνοψίζοντας συνολικά τις πληροφορίες που πήραμε από την ανάλυση των διαχωριστών των *P. aeruginosa* και *E. coli* (Γράφημα 2), παρατηρήσαμε ότι τα *E. coli* έφεραν περισσότερους μοναδικούς διαχωριστές που ήταν ομόλογοι με αλληλουχίες χρωμοσώματος *E. coli* (77%), σε αντίθεση με τα *P. aeruginosa*, 47% με αλληλουχίες χρωμοσώματος *P. aeruginosa*, αντίστοιχα. Αντίθετα, για αλληλουχίες διαχωριστών που ταυτίζονται με φάγους, τα *E. coli* εμφάνισαν πολύ μικρότερο ποσοστό (2%) παρουσίας τους, σε σχέση με τα *P. aeruginosa* (33%). Όσο αφορά την ομολογία των διαχωριστών με πλασμίδια, τα *E. coli* εμφάνισαν μεγαλύτερο ποσοστό 6%, ενώ τα *P. aeruginosa* 3%. Τέλος, το ποσοστό των αχαρακτήριστων διαχωριστών ήταν παρόμοιο και στα δύο αυτά είδη βακτηρίων (16% και 15%).

4.5 CRISPR-βασισμένη φυλογένεση

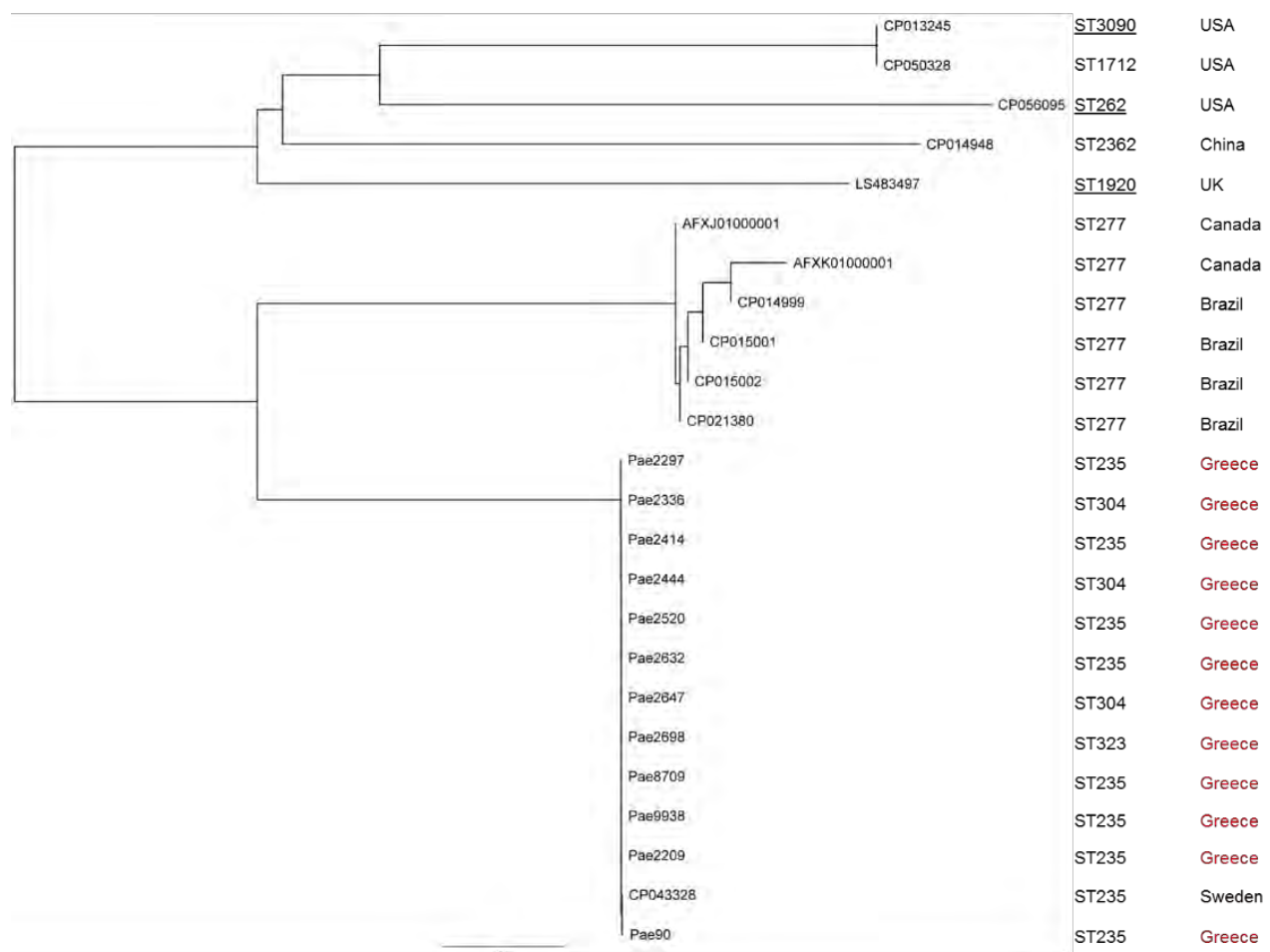
Για την πραγματοποίηση της CRISPR-βασισμένης φυλογένεσης, είχαμε κατεβάσει τις CRISPR συστοιχίες για τα στελέχη *P. aeruginosa* και *E. coli*, από την βάση δεδομένων CRISPRCasdb. Έπειτα, αφού αναλύσαμε τις αλληλουχίες των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών και των διαχωριστών από τις βιβλιογραφικές CRISPR συστοιχίες, αλλά και τις δικές μας, προχωρήσαμε στην κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων, χρησιμοποιώντας την μέθοδο Neighbor-Joining, του προγράμματος Geneious 7.1.9. Τα φυλογενετικά δέντρα που κατασκευάσαμε, τύπου I-F και I-E CRISPR/Cas

συστημάτων, τόσο για τα *P. aeruginosa* όσο και για τα *E. coli*, κάθε μας στέλεχος, αποτελούνταν από μία ενιαία αλληλουχία, δηλαδή, τη συνένωση των CRISPR1 και CRISPR2 συστοιχιών.

4.5.1 *P. aeruginosa*

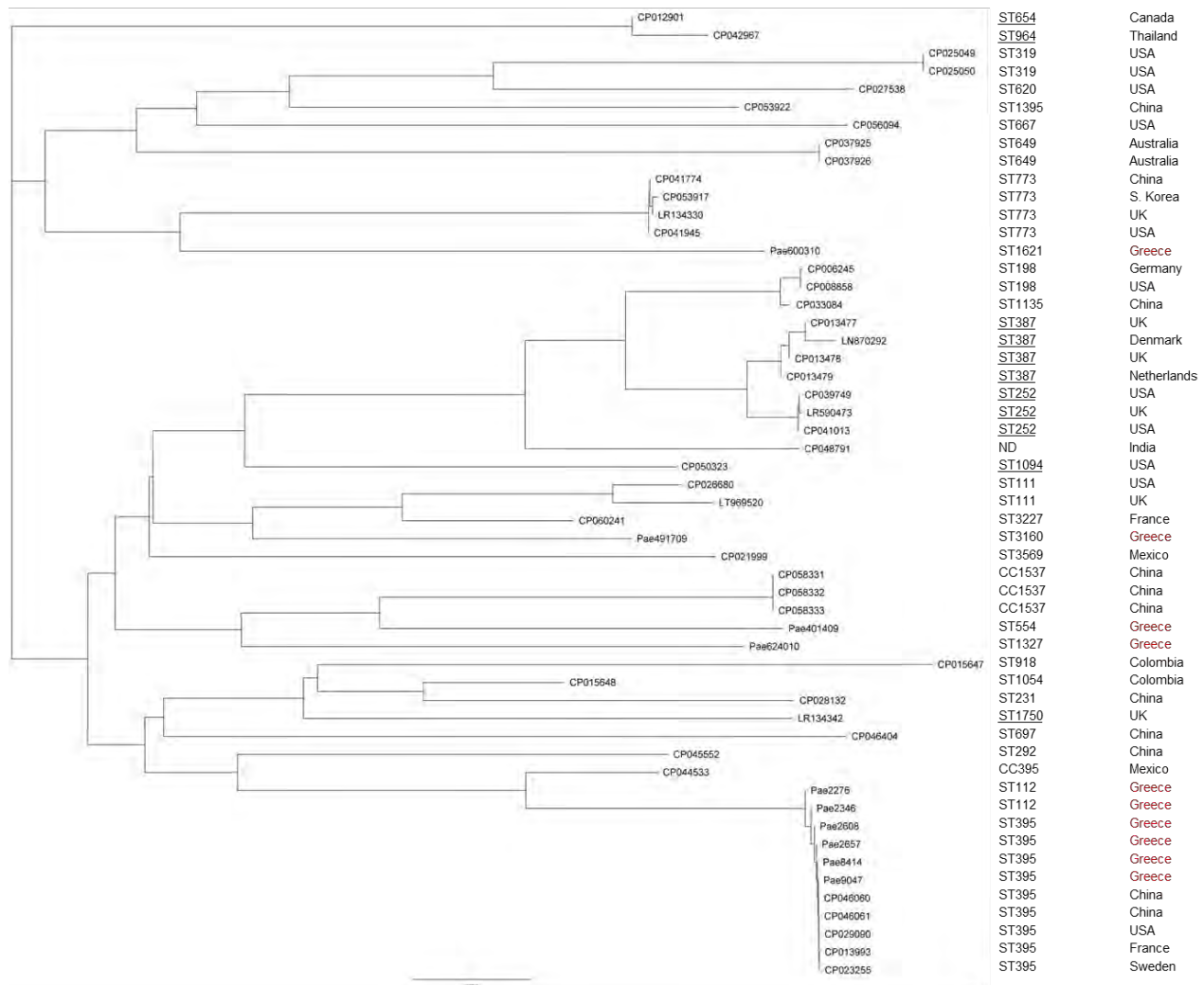
Για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων των *P. aeruginosa*, χρησιμοποιήσαμε όλα τα διαθέσιμα στελέχη που βρήκαμε στη βάση δεδομένων (CRISPRCasdb). Δημιουργήσαμε τρία φυλογενετικά δέντρα, για κάθε τύπου συστήματος χωριστά (IC, IE και IF).

Παρακάτω παρουσιάζεται το φυλογενετικό δέντρο για στελέχη *P. aeruginosa*, για τύπου I-C CRISPR/Cas σύστημα (Εικόνα 24). Αυτό αποτελείται από είκοσι-τέσσερα στελέχη και διακλαδίζεται σε δύο κύριες ομάδες. Η μία ομάδα περιλαμβάνει στελέχη ST277 [Βραζιλία, Καναδά], ενώ η άλλη ομάδα αποτελείται κυρίως από στελέχη τα οποία ανήκουν στο κλωνικό σύμπλοκο 235 (CC235) [Ελλάδα, Σουηδία].

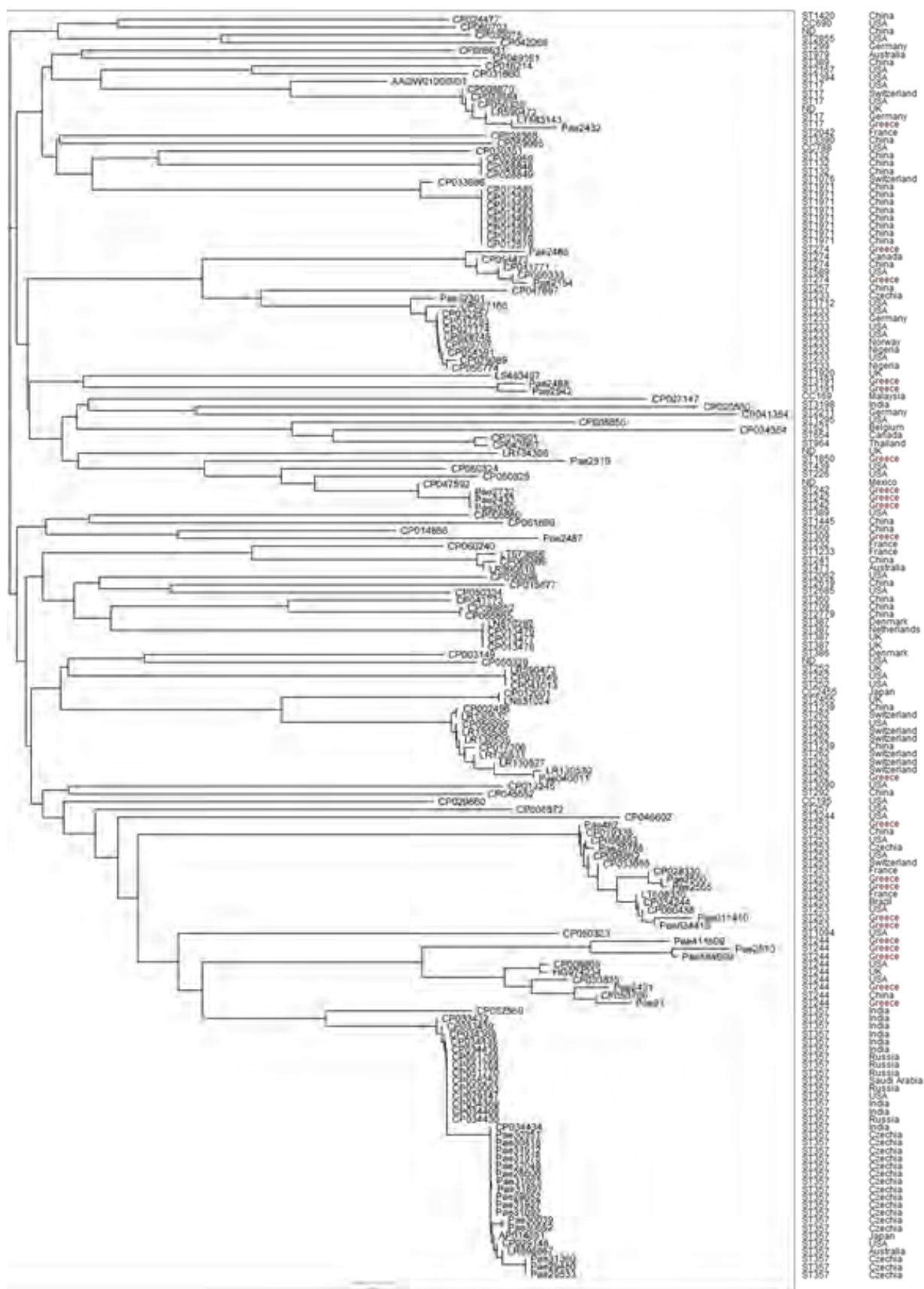


Εικόνα 24: Φυλογενετικό δέντρο, CRISPR-βασιζόμενο, για τύπου I-C CRISPR/Cas-θετικά στελέχη *P. aeruginosa*.

Το επόμενο φυλογenetικό δέντρο που κατασκευάσαμε ήταν για τύπου I-E CRISPR αλληλουχίες και το οποίο αποτελούνταν από πενήντα-τέσσερα στελέχη από διάφορα γεωγραφικά μήκη (Εικόνα 25). Παρά τη διαφορετική προέλευση των στελεχών, είδαμε ότι αυτά που ανήκαν στον ίδιο κλώνο, ομαδοποιήθηκαν και στις ίδιες συστάδες μετά την CRISPR τυποποίηση. Η πλειοψηφία των στελεχών μας που ανήκαν στο κλωνικό σύμπλοκο 395 (ST112 και ST395), εμφανίστηκαν σε μία ευδιάκριτη συστάδα [Ελλάδα, Κίνα, Αμερική, Σουηδία], ενώ τα υπόλοιπα στελέχη που ανήκαν σε μεμονωμένους κλώνους, υπάρχουν διάσπαρτα μέσα στο δέντρο.



Εικόνα 25: Φυλογenetικό δέντρο, CRISPR-βασιζόμενο, για τύπου I-E CRISPR/Cas-θετικά στελέχη *P. aeruginosa*



Εικόνα 26: Φυλογενετικό δέντρο, CRISPR-βασισμένο, για τύπου I-F CRISPR/Cas-θετικά στελέχη *P. aeruginosa*.

Τέλος, η δημιουργία του τρίτου φυλογενετικού δέντρου για τύπου I-F CRISPR/Cas, CRISPR συστοιχίες, έγινε αποτελούμενο από εκατό-εξήντα-τρία στελέχη (Εικόνα 26). Το δέντρο αυτό δομείται κυρίως από επτά κύριες συστάδες, με πολλά στελέχη μας να μην ομαδοποιούνται σε καμία από αυτές. Τα στελέχη του κλώνου 357, που είχαν βρεθεί σε πολλές χώρες πλην της Ελλάδας, αποτελούν τη μεγαλύτερη συστάδα. Έπειτα, ακολουθούσε η συστάδα που περιλαμβάνει στελέχη του κλώνου 253 και τρίτη, σε σειρά συστάδα είναι αυτή με στελέχη του κλώνου 262. Η τέταρτη, Πέμπτη και έκτη συστάδα αποτελούνται από τους κλώνους 17, 233 και 1971, αντίστοιχα. Τέλος, η έβδομη συστάδα, εμφανίζει μεγάλη ποικιλομορφία και αποτελείται από στελέχη του κλώνου 244 [Ελλάδα, ΗΠΑ, Ηνωμένο Βασίλειο και Κίνα]. Τα στελέχη των κλώνων 242, 387, 132 και 252, ανήκαν στις τέσσερις μικρότερες συστάδες.

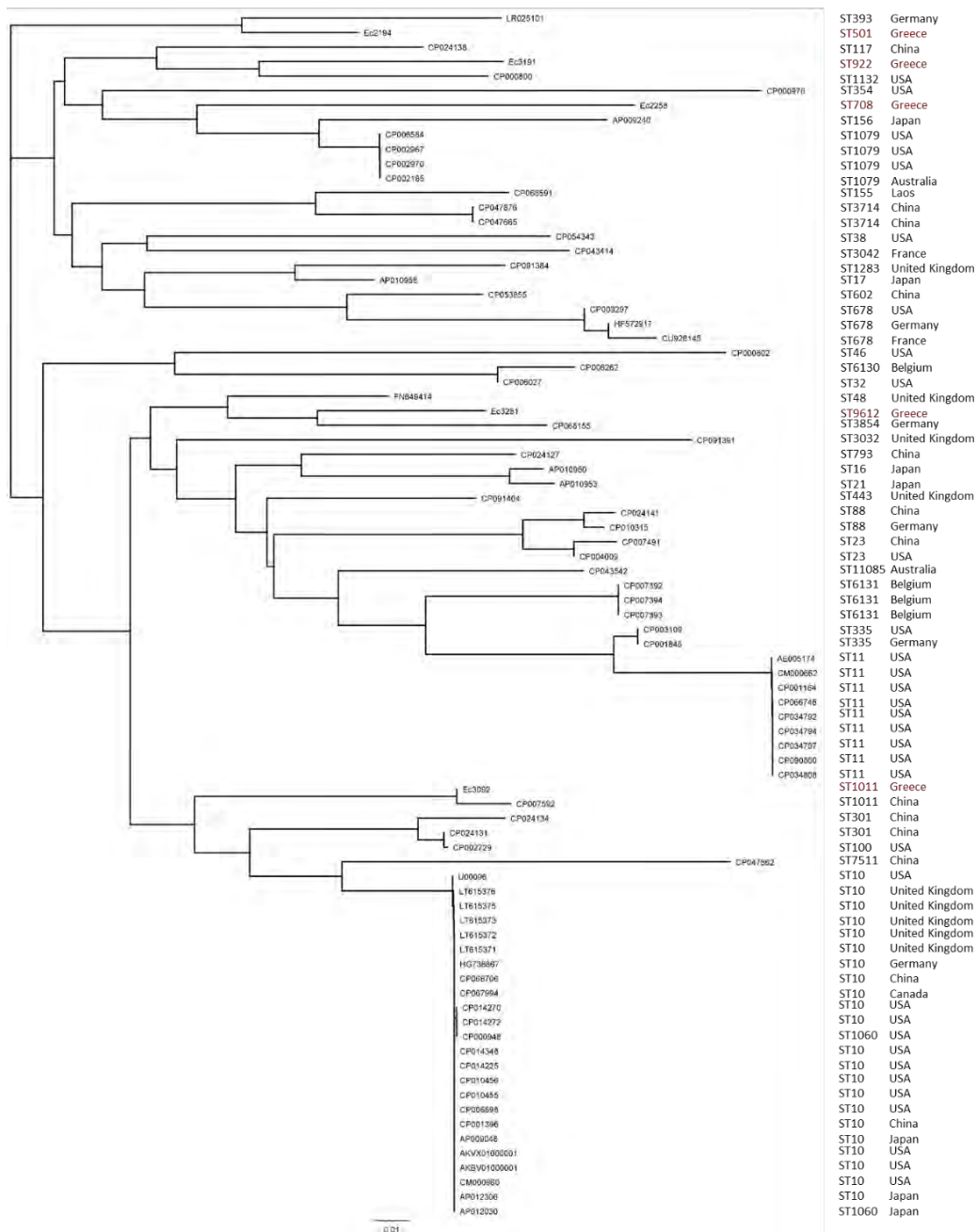
4.5.2 *E. coli*

Για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων των *E. coli*, χρησιμοποιήσαμε διαθέσιμα στελέχη που βρήκαμε στη βάση δεδομένων (CRISPRCasdb). Έτσι λοιπόν, δημιουργήσαμε δύο φυλογενετικά δέντρα για κάθε τύπου συστήματος χωριστά (IE και IF).

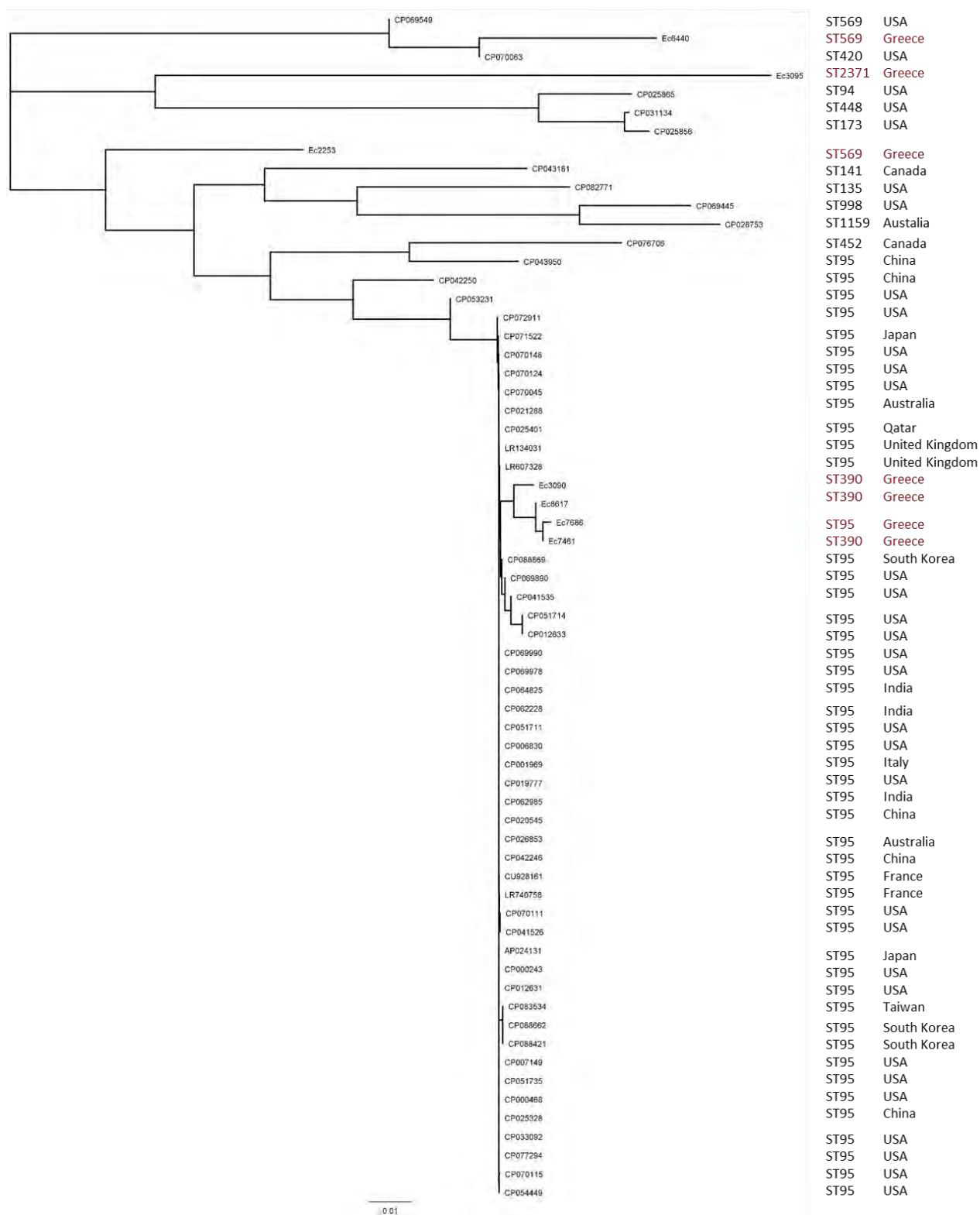
Το φυλογενετικό δέντρο στελεχών *E. coli* για τύπου I-E CRISPR/Cas σύστημα περιείχε ογδόντα-τρία στελέχη (Εικόνα 27). Αν και στη βάση δεδομένων βρήκαμε 2,086 στελέχη με τύπου I-E CRISPR/Cas συστήματα, προκειμένου να δημιουργηθεί πιο ευδιάκριτο και κατανοητό φυλογενετικό δέντρο, χρησιμοποιήσαμε τα πρώτα πέντε στελέχη κάθε έτους από τη χρονική περίοδο 2004-2022 (78 στελέχη), από τη βάση δεδομένων (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/MainDb/StrainList>). Έτσι λοιπόν, παρατηρήσαμε ότι από τα πέντε στελέχη μας, μόνο αυτό που ανήκει στον κλώνο ST1011, βρέθηκε να φέρει CRISPR συστοιχίες όμοιες σε μεγάλο βαθμό με στέλεχος που ανήκει επίσης στον ίδιο κλώνο. Τα υπόλοιπα από τα στελέχη μας, ανήκαν σε μοναδικούς κλώνους [ST501 (n=1), ST708 (n=1), ST922 (n=1), ST9612 (n=1), χωρίς καμία ομοιότητα με στελέχη από τη βάση δεδομένων. Γενικά, στο φυλογενετικό αυτό δέντρο, παρατηρήθηκε μεγάλη πληθώρα, πολλών διαφορετικών κλώνων, με τα κλωνικά σύμπλοκα 10 [ST10 (n=22), ST1060 (n=2)], 11 [ST11 (n=9), ST335 (n=20)] και 23 [ST23 (n=2), ST88 (n=2)], να εμφανίζουν ομοιότητες στις συστοιχίες τους και να ομαδοποιούνται σε συστάδες.

Τέλος, το φυλογενετικό δέντρο των στελεχών *E. coli* για τύπου I-F CRISPR/Cas σύστημα περιείχε εξήντα-τέσσερα στελέχη (Εικόνα 28), δηλαδή πενήντα-επτά στελέχη από τη βάση δεδομένων και τα επτά δικά μας στελέχη. Τα στελέχη από τη βάση δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν για το δέντρο αυτό, τα σαράντα-επτά, ανήκαν στον κλώνο 95 (ST95), ενώ τα υπόλοιπα δέκα στελέχη από τυχαίους

κλώνους και χρησιμοποιήθηκαν ως περιοχές εκτός του εύρους τιμών (outliers). Η επιλογή των στελεχών με ST95 έγινε καθώς πολλά από τα στελέχη μας ανήκαν σε αυτό τον κλώνο. Σε αυτή την περίπτωση, το δέντρο δεν εμφανίζει πολλές διακλαδώσεις και αποτελείται κυρίως από το κλωνικό σύμπλοκο 95 [ST95 (n=50), ST390 (n=3)], στο οποίο εντοπίζονται και τέσσερα από τα δικά μας στελέχη. Οι υπόλοιποι μεμονωμένοι κλώνοι δεν εμφανίζουν κάποια σημαντική ομοιότητα μεταξύ τους.



Εικόνα 27: Φυλογενετικό δέντρο, CRISPR-βασισμένο, για τύπου I-E CRISPR/Cas-θετικά στελέχη *E. coli*.



Εικόνα 28: Φυλογenetικό δέντρο, CRISPR-βασισμένο, για τύπου I-F CRISPR/Cas-θετικά στελέχη *E. coli*.

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα CRISPR/Cas συστήματα εμφανίζουν ορισμένες διαφοροποιήσεις, ανάλογα με τον τύπο συστήματος και στον οργανισμό στον οποίο εντοπίζονται [12]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [13], από την ανίχνευση CRISPR/Cas συστημάτων στα βακτήρια που μελετήσαμε, εντοπίσαμε τους τύπους συστημάτων I-C, I-E και I-F για τα *P. aeruginosa* και τους τύπους I-E και I-F για τα *E. coli*. Όσον αφορά τα στελέχη *K. pneumoniae*, δεν εντοπίσαμε σε κανένα από αυτά τύπου I-E (I-E*) CRISPR/Cas συστήματα. Αυτό ίσως οφείλεται και στο γεγονός ότι οι *K. pneumoniae*, έχουν βρεθεί να φέρουν πολλαπλά γονίδια αντοχής σε αντιβιοτικά. Συνήθως τα γονίδια αντοχής εντοπίζονται σε πολλά διαφορετικά πλασμίδια, που πιθανότητα συμβάλλουν στη μεταφορά τους [67]. Αξίζει να σημειωθεί ότι, όσα στελέχη ήταν θετικά για τέτοιου τύπου συστήματα, σε κανένα από αυτά, δε βρέθηκε παραπάνω από ένα CRISPR/Cas σύστημα.

Πιο αναλυτικά, για τα στελέχη *P. aeruginosa*, το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την εύρεση των CRISPR/Cas συστημάτων έγιναν σύμφωνα με μελέτες οι οποίες είναι δημοσιευμένες [19, 54, 57]. Το 36,0% των στελεχών μας ήταν θετικά για CRISPR/Cas συστήματα, με τα περισσότερα από αυτά να φέρουν τύπου I-F συστήματα. Τα *P. aeruginosa* που έφεραν I-F και I-E CRISPR/Cas συστήματα, βρέθηκαν να ανήκουν σε διάφορους κλώνους, σε αντίθεση με τα στελέχη που ήταν θετικά για τύπου I-C συστήματα όπου όλα ανήκαν στο κλωνικό σύμπλοκο 235. Αντίστοιχα, για τα στελέχη *E. coli*, η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε προήλθε ένα μέρος της από τη βιβλιογραφία [55] και η υπόλοιπη από εμάς. Ένα μικρότερο ποσοστό, 12,0%, των *E. coli*, βρέθηκαν να είναι θετικά για CRISPR/Cas συστήματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι υπήρχαν και αρκετά στελέχη που έφεραν ορφανές CRISPR συστοιχίες (συνολικά 26 στελέχη για τύπου IE και IF), δηλαδή ο μηχανισμός του CRISPR/Cas συστήματος δεν ήταν ακέραιος καθώς δεν ανιχνεύτηκαν τα *cas* γονίδια. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην εξελικτική πορεία των μικροοργανισμών, λόγω γεγονότων ανασυνδυασμού, όπου κατάφεραν να διαγράψουν αυτά τα γονίδια. Οι ορφανές αυτές συστοιχίες θα μας δώσουν τις πληροφορίες της αλληλοεπίδρασης των στελεχών με «μόρια εισβολείς», μέχρι τη χρονική στιγμή της διαγραφής. Όλα τα I-E τύπου θετικά συστήματα έφεραν διαφορετικούς κλώνους, ενώ για τα τύπου I-F θετικά συστήματα, τα περισσότερα βρέθηκαν να ανήκουν στο κλωνικό σύμπλοκο 95.

Επιπρόσθετα, και στα τρία βακτήρια που αναφέρθηκαν σε αυτή τη μελέτη, πραγματοποιήθηκε έλεγχος ύπαρξης ανθεκτικότητας ή μη στα αντιβιοτικά. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων είδαμε ότι, CRISPR/Cas συστήματα εντοπίστηκαν τόσο σε ανθεκτικά όσο και σε ευαίσθητα για αντιβιοτικά στελέχη των βακτηρίων που μελετήσαμε. Πιο συγκεκριμένα, το 75% των *P. aeruginosa*, θετικά για

CRISPR/Cas συστήματα, ήταν ανθεκτικά για τουλάχιστον μία κεφαλοσπορίνη ή καρβαπενέμη, ενώ για τα θετικά στελέχη *E. coli* για CRISPR/Cas συστήματα, μόνο ένα στέλεχος εμφάνισε ανθεκτικότητα σε κεφαλοσπορίνες και κανένα σε καρβαπενέμες. Μελέτη της ανθεκτικότητας, των στελεχών μας, για άλλα αντιβιοτικά όπως οι αμινογλυκοσίδες και φθοροκινολόνες, έδειξε ότι το 33% και 52%, αντίστοιχα, αυτών ήταν ανθεκτικά. Η αντοχή των στελεχών μας στα αντιβιοτικά, λογικά προέκυψε με τη πρόσληψη γονιδίων αντοχής σε αυτά. Από έλεγχο που κάναμε εντοπίσαμε γονίδια β-λακταμασών (*bla_{VIM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA}*, *bla_{CTX-M-1}* και *bla_{CTX-M-9}*), οπότε εικάζουμε ότι η ανθεκτικότητα τους σε κεφαλοσπορίνες και καρβαπενέμες οφείλεται σε αυτά. Η μεταφορά των γονιδίων αυτών προέκυψε πιθανά μέσω κινητών γενετικών στοιχείων, όπως είναι τα πλασμίδια, τα ενσωματόνια και τα τρανσποζόνια. Τα ενσωματόνια ευθύνονται σε πολλές περιπτώσεις για τους φαινοτύπους πολυαντοχής των βακτηρίων [58].

Στις CRISPR συστοιχίες, έγινε ενίσχυση με PCR και ακολούθησε αλληλούχηση με τη μέθοδο Sanger. Η αποτελεσματικότητα των εκκινήτων, για την ενίσχυση των CRISPR συστοιχιών, πραγματοποιήθηκε με αλληλουχίες στελεχών που είναι ήδη κατατεθειμένες στη βάση δεδομένων CRISPRCasdb (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/MainDb/StrainList>). Από την ανάλυση των CRISPR συστοιχιών, μεταξύ των στελεχών των δύο CRISPR-θετικών βακτηρίων, παρατηρήσαμε ότι τα *E. coli* έφεραν περισσότερους μοναδικούς διαχωριστές ομόλογους με χρωμοσωμικές αλληλουχίες τους αντίστοιχα, 77% (47% για *P. aeruginosa*) αλλά και περισσότερους ομόλογους για πλασμίδια, 6% (2,5% για *P. aeruginosa*). Αντίθετα, η ομολογία των διαχωριστών με αλληλουχίες φάγων των *P. aeruginosa* 33%, ήταν μεγαλύτερη από τα *E. coli* (2%). Τα παραπάνω δεδομένα πιθανά υποδεικνύουν ότι τα *E. coli* χρησιμοποιούν κυρίως τα CRISPR/Cas συστήματα για εσωτερική τους πιθανή ρύθμιση, σε σχέση με τα *P. aeruginosa*, όπου φαίνεται τα συστήματα αυτά να χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση προσπάθειας εισόδου στα κύτταρα ξένου γενετικού υλικού. Επιπλέον, τα παραπάνω δεδομένα υπογραμμίζουν το σημαντικό ρόλο των φάγων στη εξελικτική πορεία των *P. aeruginosa* στελεχών. Επιπρόσθετα, για τα *E. coli*, αν και γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία ότι, έχουν βρεθεί να φέρουν νησίδες παθογονικότητας [68], στη συγκεκριμένη μελέτη, δε βρήκαμε ούτε έναν διαχωριστή ομόλογο με μία τέτοια νουκλεοτιδική αλληλουχία. Τέλος, από το ποσοστό των αχαρακτήριστων διαχωριστών που ήταν παρόμοιο και στα δύο αυτά είδη βακτηρίων (16% και 15%), δεν μπορούμε να βγάλουμε κάποιο συμπέρασμα για την ώρα καθώς δεν γνωρίζουμε την προέλευση τους.

Όπως ήδη έχει αναφερθεί τα CRISPR/Cas συστήματα λειτουργούν ως μηχανισμοί άμυνας για τους μικροοργανισμούς. Η απόκτηση των αυτό-στοχευόμενων διαχωριστών (spacers ταυτόσημα με χρωμοσωμικές αλληλουχίες), σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, αναφέρεται ότι οφείλεται σε

πιθανό ρόλο των CRISPR/Cas συστημάτων στη ρύθμιση βακτηριακής λοιμογόνου δράσης. Έχει βρεθεί ότι, το CRISPR/Cas σύστημα επιτρέπει τη δημιουργία βιοφίλμ, σε στελέχη *P. aeruginosa*. Το βιοφίλμ είναι σημαντικός λοιμογόνος παράγοντας δράσης για παθογόνους μικροοργανισμούς [69]. Αντίστοιχα, spacers τα οποία είναι ταυτόσημα με αλληλουχίες φάγων ή πλασμιδίων, ίσως προστατεύουν το βακτήριο από τυχόν νέα εισβολή φάγου ή πλασμιδίου, αντίστοιχα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση δε βρέθηκε κάποιο από τα γνωστά πλασμίδια να φέρει κάποιο γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.

Αξίζει να αναφερθεί ότι, η φυλογενετική σύγκριση στελεχών, τόσο από τη δικιά μας μελέτη, όσο και από τη βάση δεδομένων CRISPRCasdb, για κάθε είδος, και για κάθε τύπου CRISPR/Cas συστήματος χωριστά, μας έδειξε ότι, στελέχη τα οποία ανήκαν στον ίδιο κλώνο, βρέθηκαν να φέρουν και σχεδόν ίδιες CRISPR συστοιχίες και να ομαδοποιούνται στις ίδιες συστάδες. Στα δέντρα αυτά παρατηρήθηκαν, στελέχη που αν και ανήκαν στον ίδιο κλώνο, εμφάνισαν διαφορές στον αριθμό των spacers των οποίων έφεραν, με απόκλιση 1-3 διαχωριστές (I-F CRISPR/Cas σύστημα *P. aeruginosa*: ST357, I-E CRISPR/Cas σύστημα *E. coli*: ST569). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι παρόλο που ανήκουν στον ίδιο κλώνο, κάθε στέλεχος βιώνει διαφορετικά γεγονότα ανάλογα με το περιβάλλον που θα βρεθεί. Τα δεδομένα αυτά επισημαίνουν ότι, αν και δεν φέρουν όλα τα στελέχη CRISPR/Cas συστήματα, η αξιοποίηση της CRISPR τυποποίησης θα μπορούσε να μας βοηθήσει να παρακολουθήσουμε επιδημικά στελέχη και να μελετήσουμε τα εξελικτικά τους μονοπάτια.

Συμπερασματικά, εντοπίστηκε, μέσω της τεχνικής PCR, η ύπαρξη CRISPR/Cas συστημάτων στο 36% των κλινικών στελεχών *P. aeruginosa*, 12% των *E. coli* και 0% των *K. pneumoniae*. Λαμβάνοντας υπόψιν και τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών [54, 14, 55, 56], τα δεδομένα μας, μας επαλήθευσαν την παρουσία των τύπου I-C, I-E, I-F και τύπου I-E, I-F CRISPR/Cas συστημάτων σε κλινικής προέλευσης *P. aeruginosa* και *E. coli*, αντίστοιχα. Ο μη εντοπισμός τύπου I-E (I-E*) CRISPR/Cas συστήματος στα κλινικά στελέχη *K. pneumoniae*, δε μας επέτρεψε να μελετήσουμε το μηχανισμό αυτό και τι πληροφορίες μπορούμε να λάβουμε από τη συσχέτιση του με στελέχη ίδιων κλώνων και με ίδιου τύπου σύστημα, άλλων βακτηρίων. Έτσι, λοιπόν, περαιτέρω πειραματικοί χαρακτηρισμοί θα μας βοηθήσουν στην πιθανή αποσαφήνιση του λειτουργικού τους ρόλου.

ΠΗΓΕΣ - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Javed MR, Sadaf M, Ahmed T, Jamil A, Nawaz M, Abbas H, Ijaz A, CRISPR-Cas System: History and Prospects as a Genome Editing Tool in Microorganisms, *Current microbiology*, 2018;75(12):1675–1683
- [2] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A, Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product, *Journal of bacteriology*, 1987;169(12):5429–5433
- [3] Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM, Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes, *Molecular microbiology*, 2002;43(6):1565–1575
- [4] Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD, Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin, *Microbiology*, 2005;151(8):2551–2561
- [5] Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G, CRISPR elements in *Yersinia Pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies, *Microbiology*, 2005;151(3):653–663
- [6] Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E, Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements, *Molecular Evolution*, 2005;60(2):174–182
- [7] Deveau H, Barrangou R, Garneau JE, Labonté J, Fremaux C, Boyaval P, Romero DA, Horvath P, Moineau S, Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*, *Journal of bacteriology*, 2008;190(4):1390–1400
- [8] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E, A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, *Science*, 2012;337(6096):816–821
- [9] Wang G, Song G, Xu Y, Association of CRISPR/Cas System with the Drug Resistance in *Klebsiella pneumoniae*, *Infection and drug resistance*, 2020;13:1929–1935
- [10] Shivram H, Cress BF, Knott GJ, Doudna JA, Controlling and enhancing CRISPR systems, *Nature chemical biology*, 2021;17(1):10–19
- [11] Paul B, Montoya G, CRISPR-Cas12a: Functional overview and applications, *Biomedical journal*, 2020;43(1):8–17

- [12] Koonin EV, Makarova KS, Zhang F, Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems, *Current opinion in microbiology*, 2017;37:67–78
- [13] Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Terns RM, Terns MP, White MF, Yakunin AF, Garrett RA, van der Oost J, Backofen R, Koonin EV, An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems, *Nature reviews. Microbiology*, 2015;13(11):722–736
- [14] Luz ACO, da Silva JMA, Rezende AM, de Barros MPS, & Leal-Balbino TC, Analysis of direct repeats and spacers of CRISPR/Cas systems type I-F in Brazilian clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Molecular genetics and genomics : MGG*, 2019;294(5):1095–1105
- [15] Kim JS, Cho DH, Park M, Chung WJ, Shin D, Ko KS, Kweon DH, CRISPR/Cas9-Mediated Re-Sensitization of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Harboring Extended-Spectrum β -Lactamases, *Journal of microbiology and biotechnology*, 2016;26(2):394–401
- [16] Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A, Mobile genetic elements: the agents of open-source evolution, *Nature reviews. Microbiology*, 2005;3(9):722–732
- [17] Summers D, Chapter 1-The Function and Organization of Plasmids, *The Biology of Plasmids* (First ed.). Wiley-Blackwell, 1996:21–22
- [18] Makalowski W, Gotea V, Pande A, Makalowska I, Transposable Elements: Classification, Identification, and Their Use As a Tool For Comparative Genomics, *Methods in molecular biology* (Clifton NJ), 2019;1910:177–207
- [19] Mahillon J, Chandler M, Insertion sequences. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 1998;62(3):725–774
- [20] Tansirichaiya S, Mullany P, Roberts AP, PCR-based detection of composite transposons and translocatable units from oral metagenomic DNA, *FEMS microbiology letters*, 2016;363(18):195
- [21] Babakhani S, Oloomi M, Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria, *Journal of basic microbiology*, 2018;58(11):905–917
- [22] Collis CM, Hall RM, Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1995;39(1):155–162

- [23] Kaushik M, Kumar S, Kapoor RK, Virdi JS, Gulati P, Integrons in Enterobacteriaceae: diversity, distribution and epidemiology, International journal of antimicrobial agents, 2018;51(2):167–176
- [24] Madigan M, Martinko J, Bender S, Buckley D, Stahl D, (2018) Brock Βιολογία των Μικροοργανισμών (14η αμερικανική έκδοση), Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης 2015, 2018;2(1):54-55
- [25] Clokie M, Millard A, Letarov A, Heaphy S, Phages in nature, Bacteriophage, 2011;1(1): 31–45
- [26] Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR, Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review, Frontiers in microbiology, 2019;10:539
- [27] Κουμεντάκου Ε, (1974), Ψευδομονάδες – νόσοι εκ ψευδομονάδων, Οικολογία και Μικροβιολογία των ψευδομονάδων. Πρακτικά 6ου Εθνικού Συνεδρίου Μικροβιολογίας - Αθήνα, 1974;1:10-11
- [28] Centers for Disease Control and Prevention, *Pseudomonas aeruginosa* in Healthcare Settings, USA, Ημερομηνία πρόσβασης 08/02/2024 από: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html>
- [29] Αρσένη Α, Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή διάγνωση των λοιμώξεων, Ψευδομονάδες, 4η έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις «Ζήτα», 1994;3:45-47
- [30] Παπαπαναγιώτου Ι, Κυριαζοπούλου – Δαλαΐνα Β, Ιατρική Μικροβιολογία και ιολογία, 1η έκδοση University Studio Press. Θεσσαλονίκη, 2001;5:347-389
- [31] Reimer LC, Vetschinnova A, Carbasse JS, Söhngen C, Gleim D, Ebeling C, Overmann J, (2019), BacDive in 2019: bacterial phenotypic data for High-throughput biodiversity analysis, Nucleic acids research, 2019;47(D1):D631–D636
- [32] Centers for Disease Control and Prevention, *Escherichia coli*: Questions and Answers, USA, Ημερομηνία πρόσβασης 08/02/2024 από: <https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>
- [33] Fotadar U, Zaveloff P, Terracio L, Growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures, Journal of basic microbiology, 2005;45(5):403–404
- [34] Rode CK, Melkerson-Watson LJ, Johnson AT, Bloch CA, Type-specific contributions to chromosome size differences in *Escherichia coli*. Infection and immunity, 1999;67(1):230–236

- [35] Bhawsinghka N, Glenn KF, Schaaper RM, Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* BL21-AI, Microbiology resource announcements, 2020;9(10):e00009-20
- [36] Ammar EM, Wang X, Rao CV, Regulation of metabolism in *Escherichia coli* during growth on mixtures of the non-glucose sugars: arabinose, lactose, and xylose, Scientific reports, 2018;8(1):609
- [37] Gonzalez-Ferrer S, Peñaloza HF, Budnick JA, Bain WG, Nordstrom HR, Lee JS, Van Tyne D, Finding Order in the Chaos: Outstanding Questions in *Klebsiella pneumoniae* Pathogenesis. Infection and immunity, 2021;89(4):e00693-20
- [38] Chen Q, Wang M, Han M, Xu L, Zhang H, Molecular basis of *Klebsiella pneumoniae* colonization in host. Microbial pathogenesis, 2023;177:106026
- [39] Choby JE, Howard-Anderson J, Weiss DS, Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* - clinical and molecular perspectives, Journal of internal medicine, 2020;287(3):283–300
- [40] Wyres KL, Lam MMC, Holt KE, Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*, Nature reviews, Microbiology, 2020;18(6):344–359
- [41] Mitić D, Bolt EL, Ivančić-Baće I, CRISPR-Cas adaptation in *Escherichia coli*, Bioscience reports, 2023;43(3):BSR20221198
- [42] Kannadasan AB, Sumantran VN, Vaidyanathan R, A Global Comprehensive Study of the Distribution of Type I-E and Type I-E* CRISPR-Cas Systems in *Klebsiella pneumoniae*, Indian journal of community medicine: official publication of Indian Association of Preventive & Social Medicine, 2023;48(4):567–572
- [43] Zango UU, Ibrahim M, Shawai SAA, Shamsuddin IM, A review on β -lactam antibiotic drug resistance, MOJ Drug Design Development & Therapy, 2019;3(2):52-58
- [44] Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ, Noreddin AM, Karlowsky JA, Comparative review of the carbapenems, Drugs, 2007;67(7):1027–1052
- [45] Zhao WH, Hu ZQ, Beta-lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, Critical reviews in microbiology, 2010;36(3):245–258
- [46] Queenan AM, Bush K, Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. Clinical microbiology reviews, 2007;20(3):440–458

- [47] Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P, Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm?, *Clinical microbiology reviews*, 2005;18(2):306–325
- [48] Han R, Shi Q, Wu S, Yin D, Peng M, Dong D, Zheng Y, Guo Y, Zhang R, Hu F, China Antimicrobial Surveillance Network (CHINET) Study Group, Dissemination of Carbapenemases (KPC, NDM, OXA-48, IMP, and VIM) Among Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Isolated From Adult and Children Patients in China. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2020;10:314
- [49] Nasiri H, Forouzandeh M, Rasaee MJ, Rahbarizadeh F, Modified salting-out method: high-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent, *Journal of clinical laboratory analysis*, 2005;19(6):229–232
- [50] Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ, Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications, *Wellcome open research*, 2018;3:124
- [51] El-Shazly S, Dashti A, Vali L, Bolaris M, Ibrahim AS, Molecular epidemiology and characterization of multiple drug-resistant (MDR) clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *International Journal of Infectious Diseases*, 2015;41:42–9
- [52] Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden MC, Ochman H, Achtman M, Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective, *Molecular microbiology*, 2006;60(5):1136–1151
- [53] Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S, Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates, *Journal of clinical microbiology*, 2005;43(8):4178–4182
- [54] Essoh C, Blouin Y, Loukou G, Cablanmian A, Lathro S, Kutter E, Thien HV, Vergnaud G, Pourcel C, The susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strains from cystic fibrosis patients to bacteriophages, *PloS one*, 2013;8(4):e60575
- [55] Touchon M, Charpentier S, Clermont O, Rocha EP, Denamur E, Branger C, CRISPR distribution within the *Escherichia coli* species is not suggestive of immunity-associated diversifying selection. *Journal of bacteriology*, 2011;193(10):2460–2467
- [56] Mackow NA, Shen J, Adnan M, Khan AS, Fries BC, Diago-Navarro E, CRISPR-Cas influences the acquisition of antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae*, *PloS one*, 2019;14(11):e0225131

- [57] Gagaletsios LA, Papagiannitsis CC, Petinaki E, Prevalence and analysis of CRISPR/Cas systems in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Greece, *Molecular genetics and genomics: MGG*, 2022;297(6):1767–1776
- [58] Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N, Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2007;59(2):321–322
- [59] Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ, Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2006;57(1):154–155
- [60] Lesk AM, (2017), *Introduction to genomics*, Oxford University Press, 2017;4(2):320–321
- [61] Saitou N, Nei M, The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Molecular biology and evolution*, 1987;4(4):406–425
- [62] Guzvinec M, Izdebski R, Butic I, Jelic M, Abram M, Koscak I, Baraniak A, Hryniewicz W, Gniadkowski M, Tambic Andrasevic A, Sequence types 235, 111, and 132 predominate among multidrug-resistant *pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Croatia, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2014;58(10):6277–6283
- [63] Gomila M, Del Carmen Gallegos M, Fernández-Baca V, Pareja A, Pascual M, Díaz-Antolín P, García-Valdés E, Lalucat J, Genetic diversity of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a public hospital in Spain. *BMC microbiology*, 2013;13:138
- [64] Molina-Mora JA, Chinchilla-Montero D, García-Batán R, García F, Genomic context of the two integrons of ST-111 *Pseudomonas aeruginosa* AG1: A VIM-2-carrying old-acquaintance and a novel IMP-18-carrying integron. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 2021;89:104740
- [65] Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY, *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group, *Clinical microbiology reviews*, 2014;27(3):543–574
- [66] Tryfinopoulou K, Linkevicius M, Pappa O, Alm E, Karadimas K, Svartström O, Polemis M, Mellou K, Maragkos A, Brolund A, Fröding I, David S, Vatopoulos A, Palm D, Monnet DL, Zaoutis T, Kohlenberg A, Greek CCRE study group, Members of the Greek CCRE study group, Emergence and persistent spread of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* high-risk clones in Greek

hospitals, 2013 to 2022, Euro surveillance: bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin, 2023;28(47):2300571

[67] Papagiannitsis CC, Malli E, Florou Z, Sarrou S, Hrabak J, Mantzaris K, Zakynthinos E, Petinaki E, Emergence of sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* coproducing NDM-1 and VIM-1 metallo- β -lactamases in a Greek hospital, Diagnostic microbiology and infectious disease, 2017;87(3):295–297

[68] Gal-Mor O, Finlay BB, Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence, Cellular microbiology, 2006;8(11):1707–1719

[69] Hatoum-Aslan A, Marraffini LA, Impact of CRISPR immunity on the emergence and virulence of bacterial pathogens, Current opinion in microbiology, 2014;17:82–90