

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
«ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ»**

**ΤΙΤΛΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ : «ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΤΑΣΤΡΟΦΑΣΗΣ
ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗΣ»**

ΖΩΓΡΑΦΟΣ ΘΕΟΦΑΝΗΣ

ΒΟΛΟΣ, 2020

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

1.Κωνσταντίνος Κορμάς, Καθηγητής, Μικροβιακή Οικολογία Υδάτινου Περιβάλλοντος, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων.**

2.Ελένη Γκολομάζου, Επίκουρη Καθηγήτρια, Προστασία - Ευζωία Ιχθύων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

3. Μιχαήλ Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής, Φαρμακολογία Αγροτικών Ζώων και Ζώων Εργαστηρίου με έμφαση στην Μικροβιακή Αντοχή, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή.....	7
1.1 Γενικά.....	7
1.2 Ανθεκτικότητα αντιβιοτικών.....	9
1.2.1 Ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη.....	11
1.3 Αντιβιοτικά στην θάλασσα και ύδατα.....	13
1.3.1 Εντοπισμός της πηγής οργανισμών ανθεκτικών στα αντιβιοτικά.....	14
1.3.2 Επιπτώσεις στα υδάτινα περιβάλλοντα.....	14
1.4 Ένζυμα αποικοδόμησης αντιβιοτικών.....	15
1.4.1 Ένζυμα αποικοδόμησης τετρακυκλίνης.....	15
1.4.2 Καταστροφάσες τετρακυκλίνης.....	17
1.4.2.1 Δομή και λειτουργία.....	19
1.4.2.2 Διαφορές στην δέσμευση υποστρώματος.....	21
1.5 Αναστολείς καταστροφασών τετρακυκλίνης.....	23
2. Υλικά και μέθοδοι.....	24
3. Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	25
4. Βιβλιογραφία.....	34
5. Παραρτήματα.....	39

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία μελετά την παραλλακτικότητα στα γονίδια παραγωγής της καταστροφάσης της τετρακυκλίνης σε διάφορους οργανισμούς. Αρχικά μελετάται το φαινόμενο της ανθεκτικότητας απέναντι στα αντιβιοτικά και της επίδρασης που έχει αυτό το φαινόμενο στα ύδατα και συγκεκριμένα στα θαλάσσια ύδατα. Έπειτα μελετώνται τα ένζυμα τα οποία είναι ικανά να αποικοδομήσουν την αντιβιοτική ουσία τετρακυκλίνη, τα οποία ένζυμα ονομάζονται καταστροφάσες τετρακυκλίνης, και τέλος γίνεται αναφορά στους αναστολείς των καταστροφάσων της τετρακυκλίνης. Με την βοήθεια των ιστοσελίδων GenBank και ClustalW συλλέχθηκαν οι αλληλουχίες των γονιδίων που κωδικοποιούν τις καταστροφάσες τετρακυκλίνης από διάφορους μικροοργανισμούς και συγκρίθηκαν μεταξύ τους οι αλληλουχίες των γονιδίων ώστε να εντοπιστούν οι διαφορές στις γονιδιακές αλληλουχίες που κωδικοποιούν τα ένζυμα καταστροφάσες τετρακυκλίνης.

Ποικιλότητα γονιδίων καταστροφάσης τετρακυκλίνης

ABSTRACT

The present work studies the variability in the tetracycline destructase production genes in various organisms. Initially, the phenomenon of resistance to antibiotics and the effect of this phenomenon on water and specifically on seawater is studied. Then the enzymes that are able to degrade the antibiotic tetracycline are studied, which enzymes are called tetracycline destructors, and finally reference is made to the tetracycline destructive inhibitors. With the help of GenBank and ClustalW websites, the sequences of the genes encoding the destructive tetracyclines from different microorganisms were collected and the gene sequences were compared to identify differences in the gene sequences encoding the enzymes encoding tetracyclines.

Variety of tetracycline destructase genes

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η τετρακυκλίνη αποτελεί μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες αντιβιοτικές ουσίες. Εμφανίζει σημαντική δραστηριότητα κα δρα απέναντι σε ένα μεγάλο πλήθος παθογόνων παραγόντων. Οι μηχανισμοί αντοχής στην τετρακυκλίνη, κυρίως συμπεριλαμβανόμενης της αδρανοποίησης του αντιβιοτικού από τα ένζυμα καταστροφάσες τετρακυκλίνες, αποτελούν σημαντικό πρόβλημα που δημιουργεί προβλήματα συσσώρευσης αντιβιοτικού στο περιβάλλον.

Οι καταστροφάσες της τετρακυκλίνης είναι ιδιαίτερα σπάνια ένζυμα που έχουν την ικανότητα να διασπάσουν το αντιβιοτικό τετρακυκλίνη αλλά και άλλα αντιβιοτικά φυσικά προϊόντα. Αποτελούν μέρος μίας ευρείας οικογένειας ενζύμων, των καταστροφασών αντιβιοτικών, που έχουν την ικανότητα να απενεργοποιούν τα αντιβιοτικά προάγοντας έτσι την αντίσταση απέναντι στα αντιβιοτικά. Χαρακτηριστικό των καταστροφασών τετρακυκλινών και γενικότερα των καταστροφασών αντιβιοτικών είναι πως έχουν υψηλή εξειδίκευση και καταλυτικά αποτελεσματικότητα σχετικά με μία συγκεκριμένη κατηγορία αντιβιοτικών στην οποία και εξειδικεύονται (Wright, 2005).

Η σημασία των καταστροφασών τετρακυκλίνης έγκειται στο γεγονός πως εξουδετερώνουν μόνιμα το αντιβιοτικό τετρακυκλίνη μειώνοντας τις ενδοκυτταρικές και εξωκυτταρικές συγκεντρώσεις του. Στην περίπτωση που τα επίπεδα του αντιβιοτικού πέσουν κάτω από ορισμένα επίπεδα τότε επιτυγχάνεται αντοχή στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

Οι καταστροφάσες τετρακυκλίνης κωδικοποιούνται από γονίδια που εντοπίζονται σε διάφορους μικροοργανισμούς και τους προσδίδουν αντοχή στην τετρακυκλίνη. Τα γονίδια αυτά εμφανίζουν ποικιλότητα λόγω των διαφορών που εντοπίζονται στην γονιδιακή τους αλληλουχία, πράγμα που σημαίνει πως κωδικοποιούν ελάχιστα

διαφορετικές μεταξύ τους πρωτεΐνες που συνθέτουν το ένζυμο της καταστροφάσης της τετρακυκλίνης (Therienetal., 2012).

1.1 Γενικά

Τα αντιβιοτικά τετρακυκλίνης ανακαλύφθηκαν τη δεκαετία του 1940 κι έκτοτε χρησιμοποιούνται ευρέως (Nelson and Levy, 2011). Οι φυσικές τετρακυκλίνες που εντοπίζονται σαν πολύ οξειδωμένα, είναι πολυκετίδια τύπου II και αποτελούνται από ένα γραμμικό συντηγμένο τετρακυκλικό ικρίωμα με δακτύλιους που χαρακτηρίζονται A, B, C, D (Chopra, Roberts, 2001). Οι τετρακυκλίνες αναστέλλουν τη σύνθεση βακτηριακών πρωτεϊνών δεσμεύοντας το 16S rRNA του 30S των βακτηριακών ριβοσωμικών υπομονάδων αποτρέποντας την σύνδεση των εισερχόμενων αμινοακυλ-tRNAs στη θέση του αποδέκτη (A-θέση) (Wilson, 2009). Ακόμα οι τετρακυκλίνες δημιουργούν δεσμούς με τις αλληλουχίες των φωσφορικών σακχάρων, με τη κύρια θέση δέσμευσης να εντοπίζεται μεταξύ h31 και h34. Τόσο οι συνθετικές όσο και οι ημισυνθετικές τετρακυκλίνες χρησιμοποιούνται σαν αντιμικροβιακοί παράγοντες χαμηλού κόστους κι ευρέος φάσματος.

Η ελαχιστη ενεργή ποσότητα για την αναστολή των βακτηριακών ριβοσωμάτων είναι η 6-δεοξυ-6-διμεθυλοτετρακυκλίνη (Chopra and Roberts, 2001). Η χημική τροποποίηση των θέσεων 5-9 είναι καλά ανεκτή και μπορεί να βελτιώσει τη συγγένεια των ριβοσωμάτων, όπως συμβαίνει για τα ικρίωματα πρώτης και δεύτερης γενιάς CTc και δοξυκυκλίνη. Η τροποποίηση των θέσεων 1-4 και 10-12 μειώνει αρκετά την αντιβακτηριακή δράση. Η ομάδα 1,3-δικετόνης εντοπίζεται στους άνθρακες 11 και 12 (pKa~7) υπό την μορφή χηλικών αλάτων Mg²⁺ (Jinetal., 2007). Το σύμπλοκο τετρακυκλίνης-Mg είναι η βιολογικά ενεργή μορφή που διαπερνά το περίβλημα των βακτηριακών κυττάρων και συνδέεται με βακτηριακά ριβοσώματα, στους μεταγραφικούς παράγοντες και στα απταμερή (Xiaoetal., 2008).

Η χημική τροποποίηση του ικρίωματος τετρακυκλίνης έχει διατηρήσει αυτήν τη σημαντική κατηγορία αντιβιοτικών για > 70 χρόνια, παρουσιάζοντας ανθεκτικότητα (Sun, Xiao, 2017). Το μοναδικό τρισδιάστατο χημικό σχήμα της τετρακυκλίνης προκύπτει από μια καμπή στη δομή στο σημείο του A, B-δακτυλίου, και αυτό φαίνεται να είναι ένα διακριτικό χαρακτηριστικό της από άλλα τετρακυκλικά πολυκετίδια που προσδίδουν επιλεκτικότητα σχετικά με την σύνδεση

ριβοσώματος Ο δακτύλιος D των τετρακυκλινών έχει αποδειχθεί ισχυρός ως προς τις ημι-συνθετικές τροποποιήσεις, με έμφαση στην μεγάλη πλευρική αλυσίδα Νβουτυλο-γλυκυλαμιδίου της αντικυβικής (αντιβιοτικού τρίτης γενιάς), η οποία παίζει διπλό ρόλο στην καταπολέμηση της αντίστασης αλλά και στην αύξηση της συγγένειας για την 30S ριβοσωμική υπομονάδα (Jenner et al., 2013). Η πρόσβαση σε πλήρως συνθετικές τετρακυκλίνες, συμπεριλαμβανομένων των ενώσεων τέταρτης γενιάς και ομαδοκυκλίνες (όπου και οι δύο προς το παρόν σε δοκιμές τρίτης φάσης) έχουν οδηγήσει σε εμφάνιση νέων προοπτικών για αυτή την κατηγορία φαρμάκων (Sun, Χίαο, 2017). Με την έγκριση τετρακυκλινών επόμενης γενιάς νέοι μηχανισμοί αντοχής στην τετρακυκλίνη είναι βέβαιο ότι θα εμφανιστούν καθώς αυξάνεται η κλινική της χρήση. Η ικανότητα διαχείρισης της αντίστασης είναι ζωτικής σημασίας για να διασφαλιστεί η μελλοντική χρήση αντιβιοτικών τετρακυκλίνης και να αποτραπεί μία κρίση δημόσιας υγείας αλλά και μία περιβαλλοντική κρίση από την συσσώρευση του αντιβιοτικού στο περιβάλλον (Brown, Wright, 2016).

1.2 Ανθεκτικότητα αντιβιοτικών

Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά (Antimicrobial resistance AMR ή AR) είναι η ικανότητα ενός παθογόνου να αναπτύξει αντίσταση απέναντι στην επίδραση ενός αντιμικροβιακού φαρμάκου. Ο όρος ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά (AR ή ABR) είναι ένα υποσύνολο της AMR, καθώς ισχύει για βακτήρια που γίνονται ανθεκτικά στα αντιβιοτικά. Οι ανθεκτικοί μικροοργανισμοί είναι πιο δύσκολο να αντιμετωπιστούν, απαιτώντας υψηλότερες δόσεις ή εναλλακτικά φάρμακα που μπορεί να αποδειχθούν πιο τοξικά. Αυτοί οι τρόποι αντιμετώπισης μπορεί επίσης να είναι πιο ακριβοί. Οι μικροοργανισμοί που είναι ανθεκτικά σε αρκετά αντιμικροβιακά ονομάζονται ανθεκτικά σε πολλαπλά φάρμακα (MDR). Η αντίσταση των βακτηρίων μπορεί να προκύψει φυσικά, με γενετική μετάλλαξη ή από ένα είδος που αποκτά αντίσταση από ένα άλλο. Η αντίσταση μπορεί να εμφανιστεί αυθόρμητα λόγω τυχαίων μεταλλάξεων. Ωστόσο, η εκτεταμένη χρήση αντιμικροβιακών φαίνεται να ενθαρρύνει την επιλογή μεταλλάξεων που μπορούν να καταστήσουν τα αντιβιοτικά αναποτελεσματικά (Magiorakos et al., 2011).

Τα βακτήρια Gram αρνητικά αποτελούν τα πιο επικίνδυνα βακτήρια καθώς γίνονται ολοένα και πιο ανθεκτικά σε όλες τις διαθέσιμες επιλογές αντιβιοτικών δημιουργώντας σοβαρά προβλήματα για τον άνθρωπο. Οι σοβαρότερες μολύνσεις από βακτήρια αρνητικά κατά gram προκαλούνται από Enterobacteriaceae (κυρίως

Klebsiellapneumoniae), *Pseudomonasaeruginosa* και *Acinetobacter*. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται επίσης η *Escherichiacoli*.

Τα αίτια της ανθεκτικότητας των αντιβιοτικών είναι τα εξής (Read, Woods, 2014) :

➤ **Υπερβολική χρήση**

Η υπερβολική χρήση αντιβιοτικών οδηγεί σαφώς στην δημιουργία αντίστασης απέναντι σε αυτά. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει μια άμεση σχέση μεταξύ της κατανάλωσης αντιβιοτικών και της εμφάνισης και διάδοσης ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών. Στα βακτήρια, τα γονίδια μπορούν να κληρονομηθούν από συγγενείς ή μπορεί να αποκτηθούν οριζόντια σε κινητά γενετικά στοιχεία όπως τα πλασμίδια. Αυτή η οριζόντια μεταφορά γονιδίων (horizontalgenetransfer, HGT) μπορεί να επιτρέψει τη μεταφορά αντοχής στα αντιβιοτικά μεταξύ διαφορετικών ειδών βακτηρίων (Read, Woods, 2014). Βέβαια η αντίσταση μπορεί να εμφανιστεί αυθόρμητα έπειτα από μετάλλαξη. Τα αντιβιοτικά απομακρύνουν τους ευαίσθητους στα φάρμακα ανταγωνιστές, αφήνοντας ανθεκτικά βακτήρια στην θέση τους για αναπαραγωγή, σαν αποτέλεσμα της φυσικής επιλογής.

➤ **Ακατάλληλη συνταγογράφηση**

Τα λανθασμένα συνταγογραφούμενα αντιβιοτικά συμβάλλουν επίσης στην προώθηση ανθεκτικών βακτηρίων. Μελέτες έχουν δείξει ότι η ένδειξη θεραπείας, η επιλογή του παράγοντα ή η διάρκεια της θεραπείας με αντιβιοτικά είναι λανθασμένη στο 30% έως 50% των περιπτώσεων (Michaeletal., 2014).

➤ **Εκτενής γεωργική χρήση**

Η χρήση αντιβιοτικών σαν συμπληρώματα ανάπτυξης στα ζώα χρησιμοποιούνται ευρέως σε όλο τον κόσμο. Υπολογίζεται ότι το 80% των αντιβιοτικών που πωλούνται στις ΗΠΑ χρησιμοποιούνται σε ζώα, κυρίως για την προώθηση της ανάπτυξης, την πρόληψη μολύνσεων αλλά και την βελτίωση της γενικής υγείας των ζώων βοηθώντας στην επίτευξη υψηλότερων αποδόσεων και την παραγωγή καλύτερης ποιότητας προϊόντων (Michaeletal., 2014).

➤ **Διαθεσιμότητα λίγων νέων αντιβιοτικών**

Η ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών από τη φαρμακευτική βιομηχανία, μια στρατηγική που ήταν αποτελεσματική στην καταπολέμηση ανθεκτικών βακτηρίων στο παρελθόν,

είχε ουσιαστικά σταματήσει λόγω οικονομικών και νομικών εμποδίων. Οι συγχωνεύσεις μεταξύ φαρμακευτικών εταιρειών έχουν επίσης μειώσει σημαντικά τον αριθμό και την ποικιλομορφία των ερευνητικών ομάδων. Όταν τελικά χρησιμοποιούνται νέοι παράγοντες, η εμφάνιση αντοχής είναι σχεδόν αναπόφευκτη. Ωστόσο, δεδομένου ότι η βακτηριακή εξέλιξη είναι αβέβαιη, το χρονοδιάγραμμα για την ανάπτυξη της αντίστασης είναι απρόβλεπτο. Λόγω αυτών των παραγόντων, πολλές μεγάλες φαρμακευτικές εταιρείες φοβούνται μια πιθανή έλλειψη απόδοσης των εκατομμυρίων δολαρίων ΗΠΑ που θα απαιτηθούν για την ανάπτυξη ενός νέου αντιβιοτικού. Λίγες αντιβακτηριακές ενώσεις βρίσκονταν σε φάση 2 ή 3 (Lushniak, 2014).

Οι φαρμακευτικές εταιρείες έχουν επίσης ενδιαφερθεί περισσότερο για την ανάπτυξη αντιβιοτικών για τον ανθεκτικό στη μεθυκυλλίνη *Staphylococcus aureus* (MRSA), παρά για άλλα αρνητικά κατά Gram παθογόνα. Η πιο πιθανή εξήγηση για αυτήν την ανισορροπία είναι ότι το MRSA είναι ένα σημαντικό πρόβλημα παγκοσμίως, ενώ η αγορά για τη θεραπεία των αρνητικών κατά gram οργανισμών είναι μικρότερη και κάπως πιο απρόβλεπτη δεδομένου ότι η αντίσταση αποκτάται γρήγορα (Gould, 2013).

➤ Ρυθμιστικοί παράγοντες

Ακόμα και στις περιπτώσεις που οι εταιρείες είναι αισιόδοξες σχετικά με την ανακάλυψη νέων αντιβιοτικών η λήψη άδειας έγκρισης είναι αρκετά συχνά εμπόδιο. Μεταξύ 1983 και 2007, σημειώθηκε σημαντική μείωση του αριθμού των νέων εγκρίσεων αντιβιοτικών. Δυσκολίες στην επιδίωξη κανονιστικής έγκρισης που έχουν σημειωθεί περιλαμβάνουν: γραφειοκρατία, απουσία σαφήνειας, διαφορές στις απαιτήσεις κλινικών δοκιμών μεταξύ των χωρών, αλλαγές στους κανονισμούς και τους κανόνες αδειοδότησης, και αναποτελεσματικούς διαύλους επικοινωνίας (Itani, Sorr, 2014). Οι δοκιμές έχουν σχεδιαστεί για να καταδείξουν τη μη κατωτερότητα των νέων παραγόντων σε σύγκριση με τα υπάρχοντα φάρμακα, σε ένα διαφορετικό στατιστικό περιθώριο. Αυτό απαιτεί μεγάλο πληθυσμό δείγματος και κατά συνέπεια υψηλό κόστος, καθιστώντας την ανάπτυξη αντιβιοτικών μη οικονομική και μη ελκυστική.

1.2.1 Ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη

Η αντίσταση στα αντιβιοτικά τετρακυκλίνης παρατηρήθηκε από την αρχή της κλινικής χρήσης τους (Schiott, Stenderup, 1954; Roberts, 1996). Παρά την εκτεταμένη κλινική αντίσταση, οι τετρακυκλίνες εξακολουθούν να είναι σημαντικοί παράγοντες για τη θεραπεία μιας ποικιλίας ανθρώπινων λοιμώξεων που προκαλούνται από Gram-αρνητικά και Gram-θετικά βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων των μυκοπλασμάτων, νηματοδών και πρωτόζωων (Chopra, Roberts, 2001). Οι τετρακυκλίνες χρησιμοποιούνται επίσης ευρέως στον τομέα της κτηνιατρικής και στην γεωργία, συμπεριλαμβανομένης της προστασίας των καλλιεργειών και της εντατικής κτηνοτροφίας, η οποία συνέβαλε στην ευρεία διάδοση της αντίστασης στην τετρακυκλίνη (Thakeretal., 2010). Οι μοριακοί μηχανισμοί αντοχής στην τετρακυκλίνη περιλαμβάνουν την εκροή, την παραγωγή ριβοσωμικών προστατευτικών πρωτεϊνών (Burdett, 1996), μειωμένη διαπερατότητα (Cohenetal., 1998), μετάλλαξη ριβοσωμάτων (Rossetal., 1998) καθώς κι ενζυμική απενεργοποίηση (Nguyenetal., 2014).

Η εκροή ριβοσωμικών προστατευτικών πρωτεϊνών αλλά και αντλιών εκροής είναι οι πιο συνηθισμένοι τρόποι κλινικής εμφάνισης αντοχής στις τετρακυκλίνες. Έχουν αναγνωριστεί επτά ομάδες αντλιών εκροής που προσδίδουν αντοχή στην τετρακυκλίνη μειώνοντας την ενδοκυτταρική συγκέντρωση αντιβιοτικών (Pidcock, 2006). Οι ριβοσωμικές προστατευτικές πρωτεΐνες είναι GTPases με παράγοντες που συνδέουν το ριβοσώμα ανάλογα με παράγοντες επιμήκυνσης και δεσμεύουν τετρακυκλίνη από την ριβοσωμική υπομονάδα 30S (Jenneretal., 2013).

Η μειωμένη διαπερατότητα του φαρμάκου επιτυγχάνεται και μέσω μορφολογικών αλλαγών καθώς και της τροποποίησης ή μειωμένης έκφρασης των πορινών, πράγμα που πιθανώς συμβάλλει στην κλινική αντοχή στην τετρακυκλίνη (Justice etal., 2008). Οι μεταλλάξεις των ριβοσωμάτων είναι ασυνήθιστες στην κλινική αντίσταση στις τετρακυκλίνες, πιθανώς λόγω του ανεξάρτητου από την αλληλουχία τρόπου δέσμευσης της τετρακυκλίνης στην 30S ριβοσωμική υπομονάδα (Brodersenetal., 2000). Ακόμα, έχουν αναφερθεί ορισμένες μεταλλάξεις και εξαλείψεις που προκαλούν αντίσταση γύρω από τη θέση δέσμευσης τετρακυκλίνης (Trieber, Taylor, 2002). Ορισμένα κλινικά προϊόντα απομόνωσης του *Helicobacter pylori* (Nonakaetal., 2005) και του *Propionibacterium macnes* (Rossetal., 1998) φέρουν σημειακές μεταλλάξεις στο ριβόσωμα 16S που προσδίδουν αντίσταση στην τετρακυκλίνη, πιθανώς μέσω μειωμένης συγγένειας δέσμευσης τετρακυκλίνης. Αυτές οι μεταλλάξεις

ριβοσώματος παρέχουν επίσης ανοχή στην τετρακυκλίνη σε εργαστηριακά στελέχη *Escherichia coli* (Cocozaki et al., 2016).

Ένας πιο ασαφής μηχανισμός ανοχής περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της εξαρτώμενης από Mg^{2+} βιοσύνθεσης της πουρίνης μέσω της έκφρασης του προϊόντος του γονιδίου tet34, μιας προβλεπόμενης φωσφοροσιβυλοτρανσφεράσης ζανθίνης-γουανίνης, η οποία εξασθενεί την αντιβακτηριακή δραστηριότητα τετρακυκλίνης πιθανώς αυξάνοντας τη δεξαμενή των GTP διαθέσιμων παραγόντων επιμήκυνσης για την επιτάχυνση της δέσμευσης του αμινοακυλίου -tRNAs στην 30S ριβοσωμική υπομονάδα (Nonaka, Suzuki, 2002). Οι τετρακυκλίνες τρίτης (τιγκεκυκλίνης) και τέταρτης γενιάς (εραβακυκλίνη και ομαδακυκλίνη) είναι γνωστό ότι ξεπερνούν την αντίσταση μέσω εκροής και προστασίας ριβοσωμάτων (Tanaka et al., 2016). Ωστόσο, η ενζυματική απενεργοποίηση έχει αναδειχθεί ως μια νέα ανησυχία για αυτές τις τετρακυκλίνες επόμενης γενιάς (Grossman et al., 2017).

1.3 Αντιβιοτικά σε ύδατα

Ανθρώπινα και ζωικά παθογόνα και δυνητικά παθογόνα βακτήρια απελευθερώνονται συνεχώς με λύματα στο νερό. Πολλοί από αυτούς τους οργανισμούς εμφανίζουν γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, που τελικά εισήχθησαν σε γενετικές κινητές πλατφόρμες (πλασμίδια, τρανσποζόνια, ιντρόνια) ικανά να εξαπλωθούν μεταξύ των βακτηριακών κοινοτήτων νερού και εδάφους. Το νερό δεν αποτελεί μόνο έναν τρόπο διάδοσης ανθεκτικών στα αντιβιοτικά οργανισμών μεταξύ ανθρώπινων και ζωικών πληθυσμών, καθώς το πόσιμο νερό παράγεται από επιφανειακά ύδατα, αλλά και ο τρόπος με τον οποίο τα γονίδια αντίστασης εισάγονται σε φυσικά βακτηριακά οικοσυστήματα. Σε τέτοια συστήματα, μη παθογόνα βακτήρια θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως πηγή γονιδίων ανοχής. Ακόμα η εισαγωγή και προοδευτική συσσώρευση αντιμικροβιακών παραγόντων στα ύδατα συμβάλλει στην εξέλιξη και την εξάπλωση τέτοιων ανθεκτικών οργανισμών στο υδάτινο περιβάλλον (Martinez, 2003).

Στην υδατοκαλλιέργεια και στις ιχθυοκαλλιέργειες η χρήση ισχυρών αντιβιοτικών είναι σημαντική και αρκετά συχνή. Τα περιβαλλοντικά βακτήρια δρουν ως απεριόριστη πηγή γονιδίων που θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως γονίδια αντίστασης όταν εισέρχονται σε παθογόνους οργανισμούς.

Περισσότερο από το 90% των βακτηριακών στελεχών που είναι προσανατολισμένα στο θαλασσινό νερό είναι ανθεκτικά σε περισσότερα από ένα αντιβιοτικά και το 20% είναι ανθεκτικά τουλάχιστον σε πέντε (Martinez, 2003). Γι' αυτό μελέτη της αντιβιοτικής αντοχής σε αυτόχθονες υδρόβιους οργανισμούς είναι σημαντική, καθώς μπορεί να υποδηλώνει την έκταση της αλλοίωσης των οικοσυστημάτων νερού από την ανθρώπινη δράση. Το προφίλ αντοχής των βακτηρίων που ζουν στο νερό εξαρτάται από την σύνθεση των ειδών αλλά και το μέρος στο οποίο εντοπίζονται απομονωμένοι, λόγω της ανθεκτικότητάς τους, υποδεικνύοντας την επιρροή των μη υδάτινων οργανισμών στην ανθεκτικότητα.

1.3.1 Εντοπισμός της πηγής οργανισμών ανθεκτικών στα αντιβιοτικά

Η προσβασιμότητα των σύγχρονων μοριακών τεχνικών για τον ειδικό χαρακτηρισμό των βακτηριακών οργανισμών (ανίχνευση κλώνων) αυξάνει τις δυνατότητές μας για ανίχνευση μικροβιακών πηγών αντοχής στα αντιβιοτικά. Μια τέτοια προσέγγιση θα παρέχει μόνο χρήσιμα αποτελέσματα μετά από μια πολύ πιο ολοκληρωμένη γνώση σχετικά με τον πληθυσμό των βακτηριακών οργανισμών που εμφανίζουν αυτό το χαρακτηριστικό, καθώς η γενετική ποικιλομορφία τέτοιων οργανισμών που εισέρχονται στο νερό είναι αρκετά υψηλή. Το ίδιο ισχύει για την παρακολούθηση των πλασμιδίων και άλλων γενετικών κινητών πλατφορμών που εμπλέκονται στην αντοχή στα αντιβιοτικά. Όμως οι γενετικές τεχνικές παρέχουν μία αρκετά πιο ακριβή εικόνα σχετικά με την πραγματική ποικιλομορφία αλλά και την πολυπλοκότητα της αντοχής στα αντιβιοτικά στα βακτηρίδια που μεταδίδονται στο νερό (Macaulay et al., 2006).

1.3.2 Επιπτώσεις στα υδάτινα περιβάλλοντα

Η αντοχή στα αντιβιοτικά δεν είναι η μόνη πιθανή δυσμενής επίδραση της απελευθέρωσης αντιβιοτικών σε υδάτινα περιβάλλοντα και οι δοκιμές οικοτοξικότητας έρχονται να επιβεβαιώσουν το παραπάνω (Yamashita et al., 2006). Τα αντιβιοτικά ενδέχεται να δράσουν, σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, ως παράγοντες σηματοδότησης (ένα είδος ορμονών) σε μικροβιακά περιβάλλοντα (Fajardo, Martinez, 2008). Οι κοινόχρηστοι υποδοχείς έχουν αναγνωριστεί σε φυτά για έναν αριθμό αντιβιοτικών και απολυμαντικών που επηρεάζουν την αντιγραφή του χλωροπλάστη (ορουοquinolones), μεταγραφή-μετεγγραφή (τετρακυκλίνες, μακρολίδες, λινκοσαμίδες, αμινογλυκοσίδες, πλεуроμουτιλίνες), βιοσύνθεση φολικού

οξέος (sulfonamides και πιθανώς τριμετοπρίμη), σύνθεση λιπαρών οξέων (τρικλοζάνη) και βιοσύνθεση στερόλης (αζόλες, στατίνες) (Brain, 2008).

Ένα θέμα μείζονος μελλοντικής ανησυχίας είναι η επίδραση των αντιβιοτικών που απελευθερώνονται στο περιβάλλον στα κυανοβακτήρια, τα οποία είναι ευπαθή σε ένα μεγάλο αριθμό αντιμικροβιακών παραγόντων, καθώς αυτός ο τύπος οργανισμός αποτελεί παραπάνω από το 70% της συνολικής μάζας φυτοπλαγκτού και είναι υπεύθυνο για περισσότερο από το 1/3 της συνολικής παραγωγής ελεύθερου O₂ ή και δέσμευση CO₂. Έτσι τα αντιβιοτικά επηρεάζουν αρνητικά σε πολλά επίπεδα την θαλάσσια ζωή καθώς και τα ύδατα με τελικό αποτέλεσμα να επηρεάζουν την ανθρώπινη ζωή λόγω της συσσώρευσής τους στο περιβάλλον αλλά και της εισαγωγής τους στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της συσσώρευσης στο περιβάλλον.

1.4 Ένζυμα αποικοδόμησης αντιβιοτικών

1.4.1 Ένζυμα αποικοδόμησης τετρακυκλίνης

Οι καταστροφάσες τετρακυκλίνης οξειδώνουν επιλεκτικά τις τετρακυκλίνες οδηγώντας σε ομοιοπολική καταστροφή του αντιβιοτικού ικρίωματος (Yang et al., 2004). Σε αντίθεση με την εκροή, τον αποκλεισμό, την προστασία από ριβοσώματα και την τροποποίηση ριβοσώματος, η ενζυματική απενεργοποίηση εξαλείφει μόνιμα την πρόκληση αντιβιοτικών τετρακυκλίνης μειώνοντας τις συγκεντρώσεις ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών αντιβιοτικών (Davies, 1994; Wright, 2005). Η κλινική επίδραση της ενζυματικής απενεργοποίησης αντιβιοτικών μπορεί να είναι καταστροφική, όπως τεκμηριώνεται από την εξάπλωση των β-λακταμασών ευρέος φάσματος σε ολόκληρο τον κόσμο (Brandt et al., 2017). Η ενζυματική απενεργοποίηση των τετρακυκλινών προτάθηκε για πρώτη φορά ως μηχανισμός αντοχής το 1984 (Guiney et al., 1984). Ένα πλασμίδιο που παρείχε αντοχή στην τετρακυκλίνη στο *E. coli* απομονώθηκε από το *Bacteroides fragilis* (Matthews, Guiney, 1986) με αυστηρή απαίτηση για αερόβια ανάπτυξη.

Η χαρτογράφηση πλασμιδίων αποκάλυψε την παρουσία μιας υποτιθέμενης αντλίας εκροής τετρακυκλίνης και ενός γονιδίου, *tetX*, που κωδικοποιεί ένα εν δυνάμει νέο ένζυμο αντίστασης στην τετρακυκλίνη το οποίο καταλύει την αποικοδόμηση της τετρακυκλίνης (Park, Levy, 1988). Η ανάπτυξη του *E. coli* που φέρει το γονίδιο *tetX* σε ένα επαγωγίμο πλασμίδιο απέδωσε έναν χαρακτηριστικό φαινότυπο ανάπτυξης χρώματος καφέ, αποκλειστικά υπό αερόβιες συνθήκες (Speer, Salyers, 1989). Τα

χρησιμοποιημένα μέσα από καλλιέργειες *E.coli*, τα οποία εκφράζουν το γονίδιο *tetX*, που υποβλήθηκαν σε αγωγή με τετρακυκλίνη, έδειξαν μειωμένες συγκεντρώσεις τετρακυκλίνης και απώλεια δραστηριότητας τετρακυκλίνης έναντι του 'άγριου τύπου' *E.coli*. Τα προϊόντα λύσης του κυττάρου *E.coli* που εκφράζουν το *tetX* απαιτούν υποχρεωτικά παρουσία εξωγενούς NADPH ώστε να απενεργοποιήσουν την τετρακυκλίνη, σύμφωνα με το TetX που είναι μια εξαρτώμενη οξειδορεντουκτάση από το NADPH (Speer et al., 1991). Δύο επιπλέον παραλλαγές του γονιδίου *tetX*, οι *tetX1* και *tetX2*, ταυτοποιήθηκαν αργότερα σε ένα άλλο μεταθετό στοιχείο του γένους *Bacteroides* (Whittle et al., 2001).

Το γονίδιο *tetX* έχει επίσης παρατηρηθεί σε μια ποικιλία περιβαλλοντικών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των *Myroides odoratimimus* (Ming et al., 2017), *Sphingobacterium* sp. (Ghosh et al., 2009) και *Flavobacterium psychrophilum* (Duchaud et al., 2018). Το *tetX* γονίδιο συναντάται σε ένα ευρύ φάσμα οικοσυστημάτων (ανθρώπινο έντερο, έδαφος, νοσοκομειακά λύματα) και είναι παρόν σε κινητά γενετικά στοιχεία που έχουν προετοιμαστεί για οριζόντια μεταφορά γονιδίων. Αυτό το πρότυπο διάδοσης ARG είναι συνεπές με την οριζόντια μεταφορά γονιδίου του *tetX* μεταξύ περιβαλλοντικών βακτηρίων και ανθρώπινων παθογόνων, όπως έχει παρατηρηθεί για πολλές άλλες κατηγορίες ARGs (Forsberg et al., 2012).

Τα νέα γονίδια καταστροφασών τετρακυκλινών έδειξαν αρκετές αλληλουχίας αμινοξέων όμοιες με το *tetX* κατά 24,4%. Η κλωνοποίηση, η ετερόλογη έκφραση και ο *in vitro* χαρακτηρισμός Tet49 – Tet55 αποκάλυψαν ότι και τα εννέα ένζυμα ήταν λειτουργικά απέναντι στην τετρακυκλίνη που απενεργοποιούν τους FMOs. Συγκριτική ανάλυση γονιδίων αποκάλυψε ένα δέκατο γονίδιο καταστροφής της τετρακυκλίνης, *tet56*, στο γονιδίωμα του ανθρώπινου παθογόνου *Legionella longbeachae*. Η αντιβακτηριακή ευαισθησία και οι δοκιμασίες αποικοδόμησης τετρακυκλίνης *in vitro* απέδειξαν ότι το γονίδιο *tet56* είναι ένα πραγματικό ARG που προσδίδει αντοχή στην τετρακυκλίνη όταν εκφράζεται σε *L. longbeachae*. Αυτές οι μελέτες οδήγησαν επίσης στην ανακάλυψη του πρώτου αναστολέα τετρακυκλίνης καταστροφής της τετρακυκλίνης που διασώζει τη δραστηριότητα της τετρακυκλίνης όταν συγχորηγείται σε βακτηρίδια που εκφράζουν την καταστροφάση της τετρακυκλίνης (Park et al., 2017).

1.4 2Καταστροφάσες τετρακυκλίνης

Το 2015, μια ολοκληρωμένη λειτουργική μεταγονιδιωματική έρευνα χρησιμοποιώντας επιλογή τετρακυκλίνης εντόπισε μια νέα οικογένεια ομόλογων γονιδίων *tetX* που χαρακτηρίζονται ως καταστροφάσες τετρακυκλίνης (*tet49 – tet55*) (Forsberg et al., 2015). Οι καταστροφάσες της τετρακυκλίνης αποτελούν μέρος μιας ευρέως καθορισμένης οικογένειας ενζύμων, που ονομάζονται καταστροφάσες αντιβιοτικών, κι ενεργοποιούνται μέσω μιας ευρείας ποικιλίας ομοιοπολικών τροποποιήσεων στο ικρίωμα αντιβιοτικών (Wright, 2005).

Οι καταστροφάσες αντιβιοτικών ονομάζονται έτσι καθώς αντικατοπτρίζουν την ενζυματική δραστηριότητα που σχετίζεται με την ομοιοπολική τροποποίηση των ικριωμάτων των αντιβιοτικών που καταστρέφουν μόνιμα την αντιμικροβιακή δραστηριότητα και προσδίδουν αντίσταση στους μικροοργανισμούς. Οι καταστροφάσες αντιβιοτικών διαφέρουν από τα ξενοβιοτικά τροποποιητικά μεταβολικά ένζυμα στη ρύθμιση, την καταλυτική αποτελεσματικότητα, τον ρυθμό και την εξειδίκευση του υποστρώματος. Τα ξενοβιοτικά τροποποιητικά ένζυμα εκτελούν λειτουργίες εκκαθάρισης στον ξενιστή, κυρίως εκκαθάριση και αποτοξίνωση των ξενοβιοτικών (Kueger & Williams, 2005).

Η κύρια λειτουργία των καταστροφασών της τετρακυκλίνης είναι η αύξηση της αντίστασης απέναντι στα αντιβιοτικά τετρακυκλίνης. Έτσι, τα ξενοβιοτικά τροποποιητικά ένζυμα τείνουν να εμφανίζουν μία ποικιλία στο υπόστρωμα, κόστος της καταλυτικής αποτελεσματικότητας, ενώ οι καταστροφάσες αντιβιοτικών τείνουν να εμφανίζουν υψηλότερη εξειδίκευση αλλά και καταλυτική αποτελεσματικότητα ως προς μία συγκεκριμένη δομική κατηγορία αντιβιοτικών (Wright, 2005).

Τα πιο γνωστά παραδείγματα καταστροφασών αντιβιοτικών είναι οι β-λακταμάσες που υδρολύουν την τεταμένη τετραμελής λακτάμη αντιβιοτικών βήτα-λακτάμης (Brandt et al., 2017). και ένζυμα αδρανοποίησης αμινογλυκοσίδης συμπεριλαμβανομένων φωσφοτρανσφερασών, ακετυλοτρανσφερασών και αδενυλτρανσφεράσες που τροποποιούν τις ελεύθερες αμινο και υδροξυλομάδες αμινογλυκοσιδικών αντιβιοτικών (Ramirez and Tolmasky, 2010).

Οι γνωστές τάξεις των αντιβιοτικών καταστροφασών (αντιβιοτικά υποστρώματα) περιλαμβάνουν : πεπτιδάσες (βογοκόρη, βακιτρακίνη), υδρολάσες (βήτα-λακτάμες, μακρολίδες), θειοτρανσφεράσες (fosfomycin), εποξειδάσες (fosfomycin),

κυκλοπροπανάσες (colibactin), ακυλ-τρανσφεράσες (αμινογλυκοζίτες, χλωραμφενικόλη), μεθυλ-τρανσφεράσες, νουκλεοτιδυλ-τρανσφεράσες (αμινογλυκοσίδες, λινκοσαμίδη), ADP-ριβοςυλτρανσφεράσες (ριφαμυκίνης), γλυκοσυλοτρανσφεράσες (αμινογλυκοσίδες, ριφαμυκίνης, μακρολίδες), φωσφοτρανσφεράσες (αμινογλυκοσίδες, χλωραμφενικόλη, ριφαμυκίνης, μακρολίδες, βιομυκίνη), λυάσες (στρεπτογραμμίνες) και οξειδορεντουκτάσες (τετρακυκλίνες, ριφαμυκίνης). Καθώς η αναζήτηση αντιβιοτικών συνεχίζεται, ο κατάλογος των αντιβιοτικών καταστροφές είναι βέβαιο ότι θα αυξηθεί (Lietal., 2018).

Σε αντίθεση με άλλες κύριες κατηγορίες αντοχής στα αντιβιοτικά (εκροή, αποκλεισμός, τροποποίηση στόχου), η ομοιοπολική αδρανοποίηση από αντιβιοτικά καταστροφάσες εξουδετερώνει μόνιμα την αντιβιοτική πρόκληση και μειώνει τις ενδοκυτταρικές και εξωκυτταρικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών. Εάν τα επίπεδα των αντιβιοτικών πέσουν κάτω από το MIC, τότε επιτυγχάνεται αντοχή απέναντι στο αντιβιοτικό αυτό. Η ομοιοπολική τροποποίηση των αντιβιοτικών μπορεί να διαταράξει τη συγγένεια στόχου, να εμποδίσει την κυτταρική πρόσληψη, να προκαλέσει μηχανισμούς εκροής ή να οδηγήσει σε αποσύνθεση του αντιβιοτικού (Wright, 2005).

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τη καταστροφή αντιβιοτικών είναι συχνά παρόντα σε οπερόνια που συν-μεταγράφονται με βιοσυνθετικά γονίδια στο μικροοργανισμό που παράγει αντιβιοτικά (Lietal., 2018). Η συν-μεταγραφή εξασφαλίζει αυτοπροστασία κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσης των αντιβιοτικών. Επιπλέον οι καταστροφάσες των αντιβιοτικών συχνά μεταφέρονται μέσω κινητοποιημένων γενετικών στοιχείων όπως τα πλασμίδια (Davies and Davies, 2010). Μόλις μετατραπούν σε ένα μικροβιακό κύτταρο-ξενιστή, η έκφραση των καταστροφασών αντιβιοτικών συχνά επάγεται και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να ενεργοποιηθεί ειδικά ως απόκριση σε αντιβιοτική πρόκληση (Llarrulletal., 2011).

Μία ακόμα ιδιότητα των καταστροφασών αντιβιοτικών είναι πως μπορούν να απεκκρίνονται στο περίπλασμα ή ακόμα και στον εξωκυτταρικό χώρο για να καταστρέψουν το αντιβιοτικό πριν φτάσει στο μικροβιακό κύτταρο. Η αντίσταση που προκαλείται από τις καταστροφάσες αντιβιοτικών μπορεί, θεωρητικά να τροποποιηθεί με την τροποποίηση του ικριώματος του αντιβιοτικού για να αποφευχθεί η καταστροφή μέσω της χορήγησης ενός αναστολέα της καταστροφάσης,

μέσω αναστολής της παραγωγής ή μέσω εντοπισμού των καταστροφασών ή τέλος μέσω της αύξησης των ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων για να ξεπεραστεί η παραγωγή καταστροφασών (McPhersonetal., 2012). Μέχρι στιγμής, μόνο η τροποποίηση του ικρίωματος των αντιβιοτικών και η συγχορήγηση ενός αναστολέα της δοκρουκτάσης έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές για την υπέρβαση της αντοχής στα αντιβιοτικά από τις καταστροφάσες αντιβιοτικών στην περίπτωση κλινικών λοιμώξεων (Drawz and Bonomo, 2010).

Κάθε κατηγορία καταστροφασών αντιβιοτικών διαθέτει έναν ξεχωριστό χημικό τρόπο απενεργοποίησης των αντιβιοτικών με την εξελικτική δυνατότητα να διευρύνει ή να περιορίζει τις διακρίσεις υποστρώματος (Pawlowskietal., 2018). Πλέον το εξελικτικό τοπίο φαίνεται να τείνει προς τη βελτιστοποίηση των ενζύμων αντίστασης λόγω της εκτεταμένης επιλεκτικής πίεσης που ασκείται από αντιβιοτικά ευρέος φάσματος. Για την προετοιμασία και την ανταπόκριση στην εμφάνιση καταστροφασών αντιβιοτικών είναι σημαντικό να μελετηθεί διεξοδικά και να κατανοηθεί η γενετική προέλευση, η διάδοση αλλά και η δομή του μηχανισμού καταστροφής των αντιβιοτικών από καταστροφάσες αντιβιοτικών.

Τα περισσότερα από τα αντιβιοτικά που απενεργοποιούν τα ένζυμα που αναφέρονται παραπάνω δεν αντιπροσωπεύουν τρέχουσες κλινικές απειλές. Ωστόσο στην περίοδο αναμονής πριν από την εκτεταμένη χρήση μίας κατηγορίας αντιβιοτικών ελλοχεύει ο κίνδυνος ανάπτυξης σε αυτά. Η πρόσφατη επιτυχία τετρακυκλινών τέταρτης γενιάς σε προηγμένες κλινικές δοκιμές έχει εγείρει ανησυχίες σχετικά με την επιλογή των καταστροφασών τετρακυκλίνης που θα μπορούσαν να αποτελέσουν μελλοντικό κίνδυνο ως προς την χρήση των αντιβιοτικών τετρακυκλίνης και της αποτελεσματικότητάς τους (Bush, 2018).

1.4.2.1 Δομή και λειτουργία

Οι καταστροφάσες τετρακυκλίνης είναι δομικά ομόλογα των FMO της κατηγορίας A. Τα FMO κατηγορίας A είναι υδροξυλάσες φλαβοπρωτεΐνης ενός συστατικού που χρησιμοποιούν συμπάραγοντες FAD και δότες ηλεκτρονίων NAD (P) H για την οξείδωση υποστρωμάτων μικρών μορίων - κυρίως μέσω ηλεκτροφιλικής υδροξυλίωσης ολεφινών πλούσιων σε ηλεκτρονία ή αρωματικών δακτυλίων από μια παροδική, καταλυτική C4a-υδροπεροξυφλαβίνη (vanBerkeletal., 2006). Γενικά, αυτός ο συγκεκριμένος τύπος ενζύμου FMO χαρακτηρίζεται από μία

απλή πτυχή Rossmann που συνδέει το FAD μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων με το τμήμα μονοφωσφορικήςαδενοσίνης, το οποίο συνδέεται με το καταλυτικό θραύσμα ισοαλλοξαζίνης μέσω πολυοξυγονωμένηςαλκυλικής αλυσίδας. Η ευελιξία σε αυτόν τον αλκυλ-σύνδεσμο είναι το θεμέλιο στην επιτυχία του καταλυτικού κύκλου, ο οποίος περιλαμβάνει πολλαπλές, δυναμικές διαμορφωτικές αλλαγές στη δομή του ενζύμου για τη δημιουργία διακριτών λειτουργικών καταστάσεων ενζύμου που διαφοροποιούνται από τη σχετική ενεργοποίηση FAD και τον τρισδιάστατο προσανατολισμό. Το TetX και τα μέλη της οικογένειας των καταστροφασών της τετρακυκλίνης είναι δομικά και λειτουργικά παρόμοια με τα ομόλογα αυτά.

Ενώ η ακριβής ακολουθία συμβάντων που περιλαμβάνει δυναμικές διαμορφωτικές αλλαγές στο ένζυμο κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου είναι επί του παρόντος άγνωστη, δύο διαμορφωτές ενζύμων έχουν παρατηρηθεί μέσω κρυσταλλογραφικής ανάλυσης ακτίνων X που διακρίνονται τόσο στη δομή προσανατολισμού FAD όσο και στην τριτογενή πρωτεϊνική δομή. Ο διαμορφωτής FAD-OUT, στον οποίο το κανάλι φόρτωσης υποστρώματος είναι ανοιχτό και ο συμπαράγοντας FAD είναι στραμμένος μακριά από το πεδίο δέσμευσης τετρακυκλίνης, επιτρέπει την εύκολη παραμονή του υποστρώματος καθώς και την εύκολη πρόσβαση του FAD σε NADPH δότη ηλεκτρονίων για να διατηρηθεί μια σταθερή συγκέντρωση μειωμένου FADH₂ που ενεργοποιήθηκε για επανενεργοποίηση με μοριακό οξυγόνο.

Ενώ η διαμόρφωση FAD-OUT δεν έχει παρατηρηθεί πειραματικά για το TetX, έχει παρατηρηθεί σε άλλα ένζυμα FMO τύπου A κατηγορίας και αποτελεί το θεμέλιο στην διατήρηση της καταλυτικής αποτελεσματικότητας και των σχετικών επιπέδων αντοχής στα αντιβιοτικά (Goldmanetal., 2012). Κατά την υποδοχή υποστρώματος και / ή NADPH, αρκετά ένζυμα FMO κατηγορίας A υφίστανται μια σειρά διακριτών αλλαγών διαμόρφωσης που αναστρέφουν το ενεργοποιημένο FADH₂ προς το δεσμευμένο υπόστρωμα και επιτρέπουν τόσο τον προστατευμένο σχηματισμό του αντιδραστικού C4a-υπεροξυφλαβίνης από το FADH₂ όσο και το μοριακό οξυγόνο και το επόμενο υπόστρωμα οξείδωση (Huijbersetal., 2014). Ωστόσο, αυτός ο διαμορφωτής FAD-IN έχει παρατηρηθεί μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων X για TetX και Tet50 απουσία NADPH και υποστρώματος. Μια καθορισμένη ακολουθία μηχανιστικών γεγονότων έχει διευκρινιστεί για την υδροξυλάση ρ-υδροξυβενζοϊκής

κατηγορίας A FMO (Suemori, 2013). Ενώ τα ένζυμα που απενεργοποιούν την τετρακυκλίνη φαίνεται να είναι FMO κατηγορίας A, η καθορισμένη ακολουθία συμβάντων, συμπεριλαμβανομένων των στοιχείων δέσμευσης NADPH, και η σχετική παρέκταση αυτών των διαμορφωτών FAD-IN σε δυναμικές διεργασίες ενζύμου φάσης διαλύματος παραμένουν άγνωστοι. Παρ' όλα αυτά, η κρυσταλλογραφική ανάλυση ακτίνων-X των διαμορφωτών FAD-IN χωρίς υπόστρωμα και υπόστρωμα του Tet50 και ο διαμορφωτής FAD-IN που συνδέεται με το υπόστρωμα του TetX υπογραμμίζει αρκετές δομικές διαφορές που μπορούν να βοηθήσουν στην εξήγηση του μοναδικού, ειδικού ενζύμου με φαινότυπο αντοχής στα αντιβιοτικά.

Ένας μικρός, ανοιχτός θύλακας κοντά στη θέση δέσμευσης υποστρώματος επιτρέπει ένα τμήμα του υποστρώματος - στην περίπτωση αυτή, CTc - να εκτεθειθεί από την ενεργή θέση του ενζύμου σε χώρο που είναι εκτεθειμένος σε διαλύτη. Το κανάλι φόρτωσης υποστρώματος κλείνει εντελώς στους διαμορφωτές FAD-IN χωρίς υπόστρωμα και CTc του Tet50, όπου τόσο το FAD όσο και το υπόστρωμα προστατεύονται από την αλληλεπίδραση με διαλύτη τόσο από την "έλικας πύλης" όσο και από ένα υδρόφοβο υπόλειμμα φαινυλαλανίνης τον τομέα δέσμευσης υποστρώματος (Parketal., 2017). Αυτή η μεταβλητότητα της δομής στη διαμόρφωση FAD-IN έχει σημαντικές επιπτώσεις στην αναγνώριση και τη δέσμευση του υποστρώματος, καθώς και στην ειδικότητα και την προτίμηση ενζύμου-υποστρώματος, που οδηγούν άμεσα σε ξεχωριστά προφίλ αποικοδόμησης τετρακυκλίνης.

1.4.2.2 Διαφορές στην δέσμευση υποστρώματος

Όπως συμβαίνει με τα περισσότερα ένζυμα FMO κατηγορίας A (Romeroetal., 2018), η θέση της οξείδωσης υποστρώματος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον χωρικό προσανατολισμό του δεσμευμένου υποστρώματος σε σχέση με τον παροδικό σχετιζόμενο με ένζυμο συμπάραγοντα C4a-peroxyflavin. Επειδή η ευελιξία της ενεργού θέσης μπορεί να οδηγήσει σε μίγματα προϊόντων (καθώς οι πολλαπλοί τρόποι δέσμευσης μπορούν να οδηγήσουν σε πολλαπλά προϊόντα αποδόμησης), είναι σημαντικό να συσχετιστούν πειραματικά παρατηρούμενοι τρόποι σύνδεσης με πιθανές θέσεις οξείδωσης υποστρώματος που αντιστοιχούν σε χαρακτηρισμένα προϊόντα οξείδωσης.

Το δεσμευμένο με ένζυμο CTc βρίσκεται πάνω από τον FAD συμπαράγοντα, ο οποίος εκτείνεται προς την περιοχή δέσμευσης υποστρώματος εντός της δραστικής θέσης ενζύμου όπως συμβαίνει με τη διαμόρφωση FAD-IN. Επιπλέον, το CTc είναι προσανατολισμένο με τέτοιο τρόπο ώστε ο δακτύλιος A να είναι πλησιέστερος στον συμπαράγοντα FAD, ενώ ο δακτύλιος D βρίσκεται πλησιέστερα στον C-άκρο της άλφα-έλικας. Έτσι, αυτός ο προσανατολισμός μπορεί να οριστεί ως τρόπος ID, A, όπου ο αριθμός λειτουργίας (I ή II) περιγράφει την εγγύς ή απομακρυσμένη θέση του ημισφαιρίου C1-C10 του μορίου σε σχέση με τον συντελεστή FAD, και το αναγνωριστικό συνδρομητή να περιγράφει τη συσχέτιση των δακτυλίων D- και A του υποστρώματος τετρακυκλίνης σε σχέση με τον συμπαράγοντα FAD.

Από τους τέσσερις πιθανούς τρόπους δέσμευσης υποστρώματος, μόνο δύο έχουν παρατηρηθεί πειραματικά μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X για τη σύνδεση υποστρωμάτων σε ένζυμα αδρανοποίησης τετρακυκλίνης (Parketal., 2017). Το CTc συνδέεται με το TetX στη λειτουργία ID, A και τα κύρια στοιχεία αναγνώρισης υποστρώματος βρίσκονται στην περιοχή δέσμευσης υποστρώματος, όπου τα υπολείμματα δεσμού υδρογόνου (Q192, H234 και R213) αλληλοεπιδρούν με το H- που δεσμεύει κετόνες και αμίδια σε λειτουργικές ομάδες στο δακτυλίο A του Ctc. Ενώ ένας αριθμός υδρόφοβων υπολειμμάτων στην περιοχή δέσμευσης υποστρώματος αλληλεπιδρά επίσης με τους δακτυλίους C- και D των ενζυμικών CTc η ανοιχτή κοιλότητα κοντά στο κανάλι φόρτωσης υποστρώματος του FAD-IN δίνει την δυνατότητα αλληλεπίδρασης με τον δακτύλιο D.

Οι ουσιαστικές διαφορές σε πειραματικά παρατηρούμενους τρόπους δέσμευσης υποστρώματος για Tetc και Tet50 δεσμεύονται με CTc εξηγούν τη μεταβλητότητα στα προφίλ αποικοδόμησης τετρακυκλίνης που παρατηρούνται καθώς οι εγγύτητες των δραστικών ομάδων που αντιδρούν στο ένζυμο στο κέντρο C4a του FAD ο συμπαράγοντας επηρεάζει άμεσα τη φύση των πιθανών αποδομήσεων (Partketal., 2017). Έτσι, λόγω της ποικιλότητας των γονιδίων η δομή και δραστικότητα των καταστροφικών τετρακυκλίνης μεγάλη ποικιλότητα ανάμεσα σε διαφορετικού είδους οργανισμούς ή σε οργανισμούς του ίδιου είδους.

1.5 Αναστολείς καταστροφών τετρακυκλίνης

Υπάρχουν δύο κλινικά αποδεδειγμένες προσεγγίσεις για την υπερνίκηση της αντοχής από αντιβιοτικά καταστροφές: (1) τροποποίηση της δομής του αντιβιοτικού

με τρόπο που αποτρέπει την ομοιοπολική τροποποίηση(δηλαδή, διαδοχικές γενιές β-λακταμών) (Fisheretal., 2005). (2) συγχορήγηση ενός ανοσοενισχυτικού που αναστέλλει την παραγωγή ή / και την καταλυτική δραστικότητα των καταστροφασών αντιβιοτικών (Συνδυασμούς αναστολέων βήτα-λακτάμης / β-λακταμάσης) (Bush, 2018).

Τα σύγχρονα αντιβιοτικά βήτα-λακτάμης είναι επαναλήψεις ικριωμάτων πέμπτης γενιάς και είναι σπάνιο να εισαχθούν νέες β-λακτάμες στην κλινική χωρίς συγχορήγηση αναστολέα β-λακταμάσης. Οι πρώτοι αναστολείς της β-λακταμάσης, όπως το κλαβουλανικό οξύ που απομονώθηκε από το *Streptomyces clavuligerus*, βρέθηκαν να είναι β-λακτάμες όπως το γονικό αντιβιοτικό (Reading, Cole, 1977). Η φύση φαίνεται να έχει εφεύρει αυτήν την επικουρική προσέγγιση πολύ πριν οι φαρμακοποιοί χημικοί πρότειναν ποτέ την ιδέα. Εκτός από το κλαβουλανικό οξύ, το *S. clavuligerus* παράγει επίσης το αντιβιοτικό κεφαλαμίνηςκεφαλοσπορίνης. Τα βιοσυνθετικά γονίδια τόσο για το κλαβουλανικό οξύ όσο και για την κεφαμυκίνη συγκεντρώνονται σε ένα οπερόνιο «supercluster», με αποτέλεσμα την ταυτόχρονη παραγωγή του αντιβιοτικού και του ανοσοενισχυτικού για τη διασφάλιση της αποτελεσματικότητας έναντι των ανταγωνιστών που παράγουν β-λακταμάση (Ward&Hodgson, 1993).

Οι παραγωγοί τετρακυκλίνης εκκρίνουν εύκολα ανάλογα και προϊόντα διακλάδωσης κατά τη βιοσύνθεση τετρακυκλίνης (Pickens and Tang, 2010). Ένα ενδιαμέσο προϊόν στη βιοσύνθεση τετρακυκλίνης, η ανυδροτετρακυκλίνη, βρέθηκε να είναι ένα φτωχό υπόστρωμα για τις τετρακυκλικές καταστροφές (Forsbergetal., 2015). Μόνο το TetX μπόρεσε να οξειδώσει την ανυδροτετρακυκλίνη, αν και πολύ αργά, υποδηλώνοντας ότι οι καταστροφάσες της τετρακυκλίνης μπορούν ακόμη να δεσμεύσουν την ανυδροτετρακυκλίνη στον τομέα δέσμευσης του υποστρώματος παρόλο που εντοπίζονται μικρές δομικές διαφορές σε σχέση με την ‘μητρική’ τετρακυκλίνη. Παρά τις λεπτές δομικές διαφορές, η τετρακυκλίνη και η ανυδροτετρακυκλίνη εμφανίζουν εξαιρετικά διαφορετική βιολογική δραστικότητα. Οι τετρακυκλίνες είναι ισχυροί αναστολείς ριβοσωμάτων και έχουν συνολική βακτηριοστατική επίδραση στα κύτταρα (Wilson, 2009). Οι ανυδροτετρακυκλίνες είναι αδύναμοι αναστολείς ριβοσωμάτων και έχουν βακτηριοκτόνο δράση στα κύτταρα, πιθανώς μέσω αποπόλωσης μεμβράνης (Rasmussenetal., 1991). Η ανυδροτετρακυκλίνη μπόρεσε να διασώσει τη δραστηριότητα των τετρακυκλινών

όταν συγχωρηγήθηκε σε αντιβακτηριδιακές δοκιμασίες σκακιέρας εναντίον *E.coli* που εκφράζουν τετρακυκλικές καταστροφές (Parketal., 2017). Περαιτέρω, η ανυδροτετρακυκλίνη αποδείχθηκε ότι είναι ένας ισχυρός αναστολέας των τετρακυκλικώνκαταστροφιστασών in vitro σε χαμηλά μικρομοριακά επίπεδα. Παραμένει ασαφές εάν η ανυδροτετρακυκλίνη δρα ως πραγματικός ανταγωνιστικός αναστολέας ή ως ανταγωνιστικό (αργό) υπόστρωμα.

Μείγματα προϊόντων αποικοδόμησης τετρακυκλίνης και τετρακυκλίνης, συμπεριλαμβανομένης της ανυδροτετρακυκλίνης, έχει αποδειχθεί ότι αναστρέφουν την επιλογή αντίστασης και επιλέγουν έναντι αντλιών εκροής τετρακυκλίνης (Palmeretal., 2010). Οι καταστροφάσεςτετρακυκλίνης και τα συναφή προϊόντα αποικοδόμησης διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους εκτός της αντίστασης σε φυσικά περιβάλλοντα, συμπεριλαμβανομένης της σηματοδότησης και του ελέγχου μικροβιακών πληθυσμών (Yimetal., 2007).

2. Υλικά και μέθοδοι

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε με την χρήση των ιστοσελίδων GenBank και ClustalW. Η GenBank πρόκειται για μία βάση δεδομένων όπου η πρόσβαση σε αυτή είναι ανοιχτή και αποτελεί μέρος της InternationalNucleotideSequenceDatabaseCollaboration. Η GenBank αποτελεί έναν οργανισμό όπου έχει συγκεντρωμένες πληροφορίες σχετικές με τις γενετικές αλληλουχίες που έχουν δημοσιευτεί ενώ ανανεώνεται συνεχώς. Το ClustalW είναι ένα πρόγραμμα με παγκόσμια χρήση όπου κατανέμει τις αλληλουχίες του DNA ή των πρωτεϊνών. Με λίγα λόγια έχει την δυνατότητα να υπολογίσει τις αντιστοιχίες, τις διαφορές αλλά και τις ομοιότητες σε αλληλουχίες εμφανίζοντας την σχέση μεταξύ των αλληλουχιών σε μορφή γραφημάτων ώστε να γίνει ευκολότερη η μελέτη τους. Με βάση τις παραπάνω ιστοσελίδες έγινε ταξινόμηση των βακτηρίων αλλά και η μεταξύ τους σύγκριση ώστε να ανιχνευτούν οι ομοιότητές τους, που κυμαίνονταν σε ποσοστό 80-100%.

Αρχικά έγινε αναζήτηση στην GenBank των καταστροφασώντετρακυκλίνης ώστε να εντοπιστούν τα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα αυτά. Από την αναζήτηση εντοπίστηκαν 39 γονίδια. Στη συνέχεια έγινε αναζήτηση των αλληλουχιών στο ClustalW2, ένα παγκόσμιο πρόγραμμα που κατανεμει τις αλληλουχίες του DNAή

πρωτεϊνών. Με το πρόγραμμα ClustalW2 οι αλληλουχίες στοιχήθηκαν χρησιμοποιώντας κριτήριο ομοιότητας >898%.

Έπειτα με την βοήθεια του προγράμματος FASTAη κάθε αλληλουχία συγκρίθηκε με διαθέσιμες αλληλουχίες στην βάση δεδομένων NCBI κι εντοπίστηκαν οι συγγενικοί φυλότυποι της κάθε αλληλοχία.

Ανάλογα με την ομοιότητα στην αλληλουχία των γονιδίων που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη της καταστροφάσηςτετρακυκλίνης οι μικροοργανισμοί που τις κωδικοποιούν τοποθετήθηκαν σε ομάδες με ομοιότητα γονιδίων >80%.

3 Αποτελέσματα-Συζήτηση.

Οι τελικές ομάδες των γονιδίων με τους ανάλογους αντιπροσώπους αλφαριθμούς, που αντιστοιχούν στον κωδικό πρόσβασης στην Genbankείναι οι εξής (ομοιότητα >80%, γονίδια με ομοιότητα 100% δεν αναφέρονται) :

group a	group b	group c	group d	group e	group f	group g	group h
AKQ05899, AKQ05898	AKQ05895, AKQ05894	AKQ05893, AKQ05892	AKQ05892, AKQ05891	AKQ05891, WP_099982811	WP_099982811, WP_099982810	WP_099982810, WP_099982808	WP_099982808, WP_099982808
		AKQ05893, AKQ05891	AKQ05892, WP_099982811	AKQ05891, WP_099982810	WP_099982811, WP_099982809	WP_099982810, WP_099982808	WP_099982808, WP_099982807
		AKQ05893, WP_099982811	AKQ05892, WP_099982810	AKQ05891, WP_099982809	WP_099982811, WP_099982808	WP_099982810, WP_099982807	
		AKQ05893, WP_099982810	AKQ05892, WP_099982809	AKQ05891, WP_099982808	WP_099982811, WP_099982807	WP_099982810, WP_099982807	
		AKQ05893, WP_099982809	AKQ05892, WP_099982808	AKQ05891, WP_099982807	WP_099982811, WP_099982807		
		AKQ05893, WP_099982808	AKQ05892, WP_099982807	AKQ05891, WP_099982807			
		AKQ05893, WP_099982808					

		99982 807					
--	--	--------------	--	--	--	--	--

Πίνακας 1 : Ομάδες γονιδίων ανάλογα με την ομοιότητα των πρωτεϊνών τους (>80%)

group i	group j	group k	group l	group m	group n
WP_099982808, WP_099982807	WP_099982806, WP_099982805	APT68071, APT68070	WP_058508912, AUH73041	AUH73041, WP_094089728	WP_044012519, WP_044012519
				AUH73041, WP_003635403	WP_044012519, WP_094089728
				AUH73041, WP_003635403	WP_044012519,WP_003635403
				AUH73041, WP_058468861	WP_044012519, WP_003635403
					WP_044012519, WP_058468861

Πίνακας 2 : Ομάδες γονιδίων ανάλογα με την ομοιότητα των πρωτεϊνών τους (>80%)

Στην 1^η ομάδα (groupa) εκτοπίζονται 2 διαφορετικές πρωτεΐνες με ομοιότητα >80% που κωδικοποιούνται από τους οργανισμούς *unculturedbacteriumBacteria:environmentalsamples*.

Στην 2^η ομάδα (groupb) εντοπίζονται 2 διαφορετικές πρωτεΐνες με ομοιότητα >80% που κωδικοποιούνται από τους οργανισμούς *unculturedbacteriumBacteria:environmentalsamples*.

Στην 3^η ομάδα (groupc) εντοπίζονται 7 διαφορετικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τους εξής οργανισμούς *Legionellaquinlivanii* DSM 21216, *Legionellafeeleii*, *Legionellasainthelensi*, *Legionellalongbeachae* NSW150, *Legionellamassiliensis*, *Legionellanautarum*, *Legionellaclemsonensis*, *Fluoribactergormanii*.

Στην 4^η ομάδα (groupd) εντοπίζονται 7 διαφορετικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τους εξής οργανισμούς *Legionellafeeleii*, *Legionellasainthelensi*, *Legionellalongbeachae* NSW150, *Legionellamassiliensis*, *Legionellanautarum*, *Legionellaclemsonensis*, *Fluoribactergormanii*.

Στην 5^η ομάδα (groupe) εντοπίζονται 5 διαφορετικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τους οργανισμούς *Legionellasainthelensi*, *Legionellalongbeachae* NSW150, *Legionellamassiliensis*, *Legionellaclemsonensis*, *Fluoribactergormanii*.

Στην 6^η ομάδα (groupf) εντοπίζονται 5 διαφορετικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τους οργανισμούς *Legionellalongbeachae* NSW150, *Legionellamassiliensis*, *Legionellanautarum*, *Legionellaclemsonensis*, *Fluoribactergormanii*

Στην 7^η ομάδα (groupg) εντοπίζονται 4 διαφορετικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τους οργανισμούς *Legionellamassiliensis*, *Legionellanautarum*, *Legionellaclemsonensis*, *Fluoribactergormanii*.

Στην 8^η ομάδα (groupH) εντοπίζονται 3 διαφορετικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τους οργανισμούς *Legionellanautarum*, *Legionellaclemsonensis*, *Fluoribactergormanii*.

Στην 9^η ομάδα (groupI) εντοπίζονται 2 διαφορετικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τους οργανισμούς *Legionellaclemsonensis*, *Fluoribactergormanii*.

Στην 10^η ομάδα (groupJ) εντοπίζονται 1 διαφορετική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από τον οργανισμό *unculturedbacterium* *Bacteria: environmentalsamples*.

Στην 11^η ομάδα (groupK) εντοπίζονται 1 διαφορετική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από τον οργανισμό *unculturedbacterium* *Bacteria: environmentalsamples*.

Στην 12^η ομάδα (group L) εντοπίζονται 1 διαφορετική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από τον οργανισμό *unculturedbacterium* *Bacteria: environmentalsamples*.

Στην 13^η ομάδα (group M) εντοπίζονται 1 διαφορετική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από τον οργανισμό *unculturedbacterium* *Bacteria: environmentalsamples*.

Στην 14η ομάδα (group N) εντοπίζονται 1 διαφορετική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από τον οργανισμό *unculturedbacteriumBacteria:environmentalsamples*.

Στην 15η ομάδα (group O) εντοπίζονται 1 διαφορετική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από τον οργανισμό *unculturedbacteriumBacteria:environmentalsamples*.

Στην 16η ομάδα (group P) εντοπίζονται 1 διαφορετική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από τον οργανισμό *unculturedbacteriumBacteria:environmentalsamples*.

Στην 17η ομάδα (group Q) εντοπίζονται 1 διαφορετική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από τον οργανισμό *unculturedbacteriumBacteria:environmentalsamples*.

Στην 18η ομάδα (group R) εντοπίζονται 1 διαφορετική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από τον οργανισμό *unculturedbacteriumBacteria:environmentalsamples*.

Σύμφωνα με την τελική κατάταξη καθώς και με τον διαχωρισμό των γονιδίων καταλήξαμε σε δύο πίνακες που θα μας βοηθήσουν να αντιληφθούμε καλύτερα την προέλευση των γονιδίων που είναι τα φυσικά αλλά και τα τεχνητά ενδαιτήματα. Αναλυτικότερα σαν φυσικά ενδαιτήματα ονομάζονται τα φυσικά ύδατα δηλαδή η θάλασσα, γλυκά νερά/υγροτοποι, υπόγεια νερά καθώς και γαστρεντερικός σωλήνας ζώων. Οι μικροοργανισμοί της 1ης, 2ης, 10ης, 11ης, 12ης, 13ης, 14ης, 15ης, 16ης ομάδας πρόκειται για μη καλλιεργημένα δείγματα βακτηρίων. Οι μικροοργανισμοί που ανήκουν στην 3η, 4η, 5η, 6η, 7η, 8η κι 9η ομάδα στο μεγαλύτερο μέρος τους εντοπίζονται σε ύδατα (ιδιαίτερα σε ύδατα που υπόκεινται σε ανθρώπινη χρήση) ενώ μερικοί οργανισμοί όπως ο *Legionellafeeleii*, *Legionellaclemsonensis* και *Legionellasainthelensi* εντοπίζονται και στον ανθρώπινο οργανισμό, υποδηλώνοντας πως η μεταφορά των μικροοργανισμών από τον άνθρωπο στα ύδατα (με ποικίλους τρόπους) μπορεί να συμβάλλει στην συσσώρευσή τους στο περιβάλλον (κυρίως υδάτινο περιβάλλον) με αποτέλεσμα να εμφανίζεται περιβαλλοντική ανοσία που μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση της τετρακυκλίνης στο περιβάλλον επηρεάζοντας σημαντικά τόσο τους ανθρώπους όσο και τους υπόλοιπους οργανισμούς.

Η συνεχής και μακροχρόνια χρήση αντιβιοτικών μπορεί να δημιουργήσει σοβαρά προβλήματα ανθεκτικότητας σε αυτό. Η ανθεκτικότητα αυτή μπορεί να μεταφερθεί και στο περιβάλλον καθώς οφείλεται και σε ορισμένους μικροοργανισμούς που παράγουν ένζυμα τα οποία μπορούν να αποδημήσουν το αντιβιοτικό.

Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκαν οι μικροοργανισμοί που παράγουν το ένζυμο καταστροφάσητετρακυκλίνης, το οποίο είναι υπεύθυνο για την δημιουργία αντίστασης απέναντι στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη, αντιβιοτικό που χρησιμοποιείται αρκετά συχνά σε ανθρώπους αλλά και στην ιχθυοκαλλιέργεια.

Από την έρευνά μας εντοπίστηκαν 39 διαφορετικά γονίδια που κωδικοποιούν την καταστροφάση της τετρακυκλίνης. Αυτά τα 39 διαφορετικά γονίδια κατατάσσονται σε 18 διαφορετικές ομάδες ανάλογα με την ομοιότητα των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν (ομοιότητα >80%). Γονίδια με ομοιότητα κωδικοποιούμενων πρωτεϊνών 100% δεν συμπεριλήφθηκαν.

Παράλληλα εντοπίστηκαν και οι μικροοργανισμοί που παράγουν την καταστροφάσητετρακυκλίνης. Το μεγαλύτερο μέρος των μικροοργανισμών αυτών εντοπίζεται σε ύδατα και ιδιαίτερα σε ύδατα κοντά σε βιομηχανικές ζώνες όπως υδάτινα σώματα κοντά σε αστικές περιοχές και ύδατα που χρησιμοποιούνται για ανθρώπινη χρήση.

Η παρουσία αυτών των μικροοργανισμών υποδηλώνει πως η αντίσταση στην τετρακυκλίνη είναι αρκετά εύκολο να επιτευχθεί με την χρήση της σε ύδατα, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση ιχθυοκαλλιεργειών ιδιαίτερα όταν αυτές εντοπίζονται κοντά σε περιοχές με ύδατα που είναι ήδη επιβαρυνμένα όπως για παράδειγμα αστικές περιοχές.

Πιο συγκεκριμένα ο μεγαλύτερος αριθμός μικροοργανισμών που εμφανίζουν ομοιότητα στην πρωτεϊνική αλληλουχία της καταστροφάσητετρακυκλίνης είναι οι μικροοργανισμοί που ανήκουν στην ομάδα 3 και ομάδα 4 δηλαδή αντίστοιχα οι εξής μικροοργανισμοί : *Legionellaquinlivanii* DSM 21216, *Legionellafeeleii*, *Legionellasainthelensi*, *Legionellalongbeachae* NSW150, *Legionellamassiliensis*, *Legionellanautarum*, *Legionellaclemsonensis*, *Fluoribactergormanii* (group) και *Legionellafeeleii*, *Legionellasainthelensi*, *Legionellalongbeachae* NSW150, *Legionellamassiliensis*, *Legionellanautarum*, *Legionellaclemsonensis*,

Fluoribactergormanii (groupd). Το μεγαλύτερο μέρος των παραπάνω οργανισμών εντοπίζεται σε επιβαρυμένα ύδατα με τα οποία έχει επαφή ο άνθρωπος

Γι' αυτό τον λόγο η χρήση του αντιβιοτικού τετρακυκλίνης θα πρέπει να γίνεται με σύνεση τόσο γενικά όσο και στην περίπτωση που χρησιμοποιείται στην βιομηχανία των ιχθυοκαλλιεργειών καθώς η δημιουργία αντίστασης σε αυτή είναι μεγάλη με αποτέλεσμα το αντιβιοτικό αυτό να συσσωρεύεται στο περιβάλλον.

ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ								
Legionellaquinli vanii DSM 21216	Νοτιοανατολικό Κουίνσλαντ, Αυστραλία (Lawrence, A., Eglezos, S., Huston, W. 2016)	περιβαλλοντικά δείγματα στην Κρήτη, Ελλάδα, κατά την περίοδο 2004-2011(Chochlakis, D.et.all. 2013)	δύο άσχετες πηγές στο Ηνωμένο Βασίλειο (Birtles.et.all 1991)						
Legionellafeeleii	ασθενείς με λεγιονέλλωση στην Ιαπωνία μεταξύ 2008 και 2016 (Amemura-Maekawa.et .all. 2018)	περιβαλλοντικό νερό και ασθενείς (Zhan, X.-Y., Hu, C.-H., Zhu, Q.-Y. 2016)	υδατικοί πόροι στην Ταϊλάνδη (Wadowsky-Yee-Okudaagar) (Paveenkittiporn, W., Dejsirilert, S., Kalambaheti, T. 2012)	Λίμνη Taihu το χειμώνα (Κίνα) (Wang, N., Xing, P., Wu, Q.-L., Yu, D.-W. 2011)	εδάφη μολυσμένα με βιομηχανικά απόβλητα στην Ιαπωνία (Kuroki, H.et.all 2007)				
Legionellasaintheleinsi	ασθενής με νόσο Legionnaires στη Νέα Ζηλανδία(Slow, S.et.all	χώμα κήπου στην Ολλανδία(vanH eijnsbergen, E.et.all 2016)	υδατικοί πόροι στην Ταϊλάνδη (Wadowsky-Yee-Okudaagar) (Paveenkittiporn, W., Dejsirilert, S.,	υδραυλικές αντλίες και το υδραυλικό σύστημα (υπόγεια ύδατα)(Costa,					

	2018)		Kalambaheti, T. 2012)	J.et.all 2005)					
Legionellalongb eachae NSW150	ιατρικό κέντρο στη βόρεια Ταϊβάν(Καο, W.-F.et.all 2019)	νερό της βρύσης στην Ελβετία(Boss, R.et.all 2018)	ασθενείς με λεγιονέλλωση στην Ιαπωνία(Amemura- Maekawa, J.et.all 2018)	Νοτιοανατολικό Κουίνσλαντ, Αυστραλία (Lawrence, A., Eglezos, S., Huston, W. 2016)	χώμα κήπου στην Ολλανδ ία(vanH eijnsber gen, E.et.all 2016)	σε συστήματα νερού των δημόσιων εγκαταστάσεω ν στην Κορέα (Chungnam)(Ki m.et.all 2014)	υδατικοί πόροι στην Ταϊλάνδη (Wadows ky-Yee- Okudaag ar) (Paveenk ittiporn, W., Dejsiriler t, S., Kalamba heti, T. 2012)	Γαλλικό SPA νερό (Bornstein, N.et.all 1989)	εδάφη μολυσμένα με βιομηχανικά απόβλητα στην Ιαπωνία(Kuroki, H.et.all 2007)
Legionellamassil iensis	δείγμα νερού πύργου ψύξης (Pagnier, I.et.all 2014)	περιβαλλοντικά δείγματα νερού(Camproca sso, A.et.all 2012)							
Legionellanauta rum	περιβαλλον τικά	συστήματα νερού στη							

	δείγματα νερού(Camrocasso, A.et.all 2012)	Σεούλ(Kimet.all 2009)							
Legionellaclemsonensis	έναν ασθενή με πνευμονία(Palmer, A.et.all 2016)								
Fluoribactergormanii	συνταξιοδοτικά σπίτια και ομαδικά σπίτια διανομής νερού(De Filippiset.all 2018)								

Πίνακας 3 : Πληροφορίες σχετικά με τους οργανισμούς που παράγουν τις καταστροφάσες τετρακυκλίνης και το μέρος που εντοπίζονται.

4. Βιβλιογραφία

- Brain RA, Hanson ML, Solomon KR, Brooks BW (2008). Aquatic plant exposed to pharmaceuticals: effects and risks. *Rev Environ Contam Toxicol* 2008, 192:67-115
- Brandt C, Braun SD, Stein C, Slickers P, Ehrlich R, Pletz MW, Makarewicz O (2017). In silico serine β -lactamases analysis reveals a huge potential resistome in environmental and pathogenic species, *Sci Rep*. 2017 Feb 24; 7():43232.
- Brodersen D. E., Clemons W. M., Jr., Carter A. P., Morgan-Warren R. J., Wimberly B. T., Ramakrishnan V. (2000). The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell* 103 1143–1154.
- Brown ED, Wright GD (2016). Antibacterial drug discovery in the resistance era, *Nature*. 2016 Jan 21; 529(7586):336-43.
- Burdett V. (1996). Tet(M)-promoted release of tetracycline from ribosomes is GTP dependent. *J. Bacteriol.* 178 3246–3251.
- Bush K (2018). Game Changers: New β -Lactamase Inhibitor Combinations Targeting Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria, *ACS Infect Dis*. 2018 Feb 9; 4(2):84-87.
- Chopra I, Roberts M (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance, *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001 Jun; 65(2):232-60 ; second page, table of contents.
- Cocozaki A. I., Altman R. B., Huang J., Buurman E. T., Kazmirski S. L., Doig P., et al. (2016). Resistance mutations generate divergent antibiotic susceptibility profiles against translation inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113 8188–8193.
- Duchaud E., Rochat T., Habib C., Barbier P., Loux V., Guerin C., et al. (2018). Genomic diversity and evolution of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Front. Microbiol.* 9:138
- Fajardo A, Martı́nez JL (2008). Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Curr Opin Microbiol* 2008, 11:161-16
- Fisher J. F., Meroueh S. O., Mobashery S. (2005). Bacterial resistance to β -lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem. Rev.* 105 395–424.
- Forsberg K. J., Reyes A., Wang B., Selleck E. M., Sommer M. O., Dantas G. (2012). The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science* 337 1107–1111. 10.112

- Ghosh S., LaPara T. M., Sadowsky M. J. (2014). Draft genome sequence of *Sphingobacterium* sp. strain PM2-P1-29, a tetracycline-degrading TetX-expressing aerobic bacterium isolated from agricultural soil. *Genome Announc.* 2:e00963-14. 10.1128/genomeA.00963-14
- Goldman P. J., Ryan K. S., Hamill M. J., Howard-Jones A. R., Walsh C. T., Elliott S. J., et al. (2012). An unusual role for a mobile flavin in StaC-like indolocarbazole biosynthetic enzymes. *Chem. Biol.* 19 855–865.
- Grossman T. H., Fyfe C., O'Brien W., Hackel M., Minyard M. B., Waites K. B., et al. (2017). Fluorocycline TP-271 is potent against complicated community-acquired bacterial pneumonia pathogens. *mSphere* 2:e00004-17. 10.1128/mSphere.00004-17
- Gould IM, Bal AM (2013). New antibiotic agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance, *Virulence.* 2013 Feb 15; 4(2):185-9
- Gould IM, Bal AM (2015). New antibiotic agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance, *Virulence.* 2013 Feb 15; 4(2):185-91.
- Huijbers M. M. E., Montersino S., Westphal A. H., Tischler D., van Berkel W. J. H. (2014). Flavin dependent monooxygenases. *Arch. Biochem. Biophys.* 544 2–17. 10.1016
- Jenner L., Starosta A. L., Terry D. S., Mikolajka A., Filonava L., Yusupov M., et al. (2013). Structural basis for potent inhibitory activity of the antibiotic tigecycline during protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 3812–3816.
- Jin L, Amaya-Mazo X, Apel ME, Sankisa SS, Johnson E, Zbyszynska MA, Han A (2007). Ca²⁺ and Mg²⁺ bind tetracycline with distinct stoichiometries and linked deprotonation, *Biophys Chem.* 2007 Jul; 128(2-3):185-96
- Justice S. S., Hunstad D. A., Cegelski L., Hultgren S. J. (2008). Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. *Nat. Rev. Microbiol.* 6 162–168.
- Itani KM, Shorr AF (2014). FDA guidance for ABSSSI trials: implications for conducting and interpreting clinical trials, *Clin Infect Dis.* 2014 Jan; 58 Suppl 1():S4-9.
- Krueger SK, Williams DE (2005). Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism, *PharmacolTher.* 2005 Jun; 106(3):357-87.
- Llarrull LI, Toth M, Champion MM, Mobashery S (2011). Activation of BlaR1 protein of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, its proteolytic processing, and recovery from induction of resistance, *J Biol Chem.* 2011 Nov 4; 286(44):38148-58.

- Li YX, Zhong Z, Hou P, Zhang WP, Qian PY (2018). Resistance to nonribosomal peptide antibiotics mediated by D-stereospecific peptidases, *Nat Chem Biol.* 2018 Apr; 14(4):381-387
- Lushniak BD (2014). Antibiotic resistance: a public health crisis, *Public Health Rep.* 2014 Jul-Aug; 129(4):314-6.
- Macauley JJ, Quiang Z, Adams CD, Surampalli R, Mormile MR: Disinfection of swine wastewater using chlorine, ultraviolet light and ozone. *Water Res* 2006, 10:2017-2026.
- Martinez JL: Recent advances on antibiotic resistance genes. In *Recent Advances in Marine Biotechnology. Molecular Genetics of Marine Organisms*, vol 10. Edited by Fingerman, Nagabhushanam. 2003:13-32.
- Magiorakos A.P., A. Srinivasan, R. B. Carey, Y. Carmeli, M. E. Falagas, C. G. Giske, S. Harbarth, J. F. Hindler et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria.... *Clinical Microbiology and Infection*, Vol 8, Iss. 3
- McPherson CJ, Aschenbrenner LM, Lacey BM, Fahnoe KC, Lemmon MM, Finegan SM, Tadakamalla B, O'Donnell JP, Mueller JP, Tomaras AP (2012). Clinically relevant Gram-negative resistance mechanisms have no effect on the efficacy of MC-1, a novel siderophore-conjugated monocarbam, *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Dec; 56(12):6334-42.
- Michael CA, Dominey-Howes D, Labbate M (2014). The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management, *Front Public Health.* 2014; 2():145.
- Ming D.-S., Chen Q.-Q., Chen X.-T. (2017). Analysis of resistance genes in pan-resistant *Myroides odoratus* clinical strain PR63039 using whole genome sequencing. *Microb. Pathog.* 112 164–170.
- Nelson ML, Levy SB (2011). The history of the tetracyclines, *Ann N Y Acad Sci.* 2011 Dec; 1241():17-32.
- Nguyen F., Starosta A. L., Arenz S., Sohmen D., Donhofer A., Wilson D. N. (2014). Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biol. Chem.* 395 559–575.
- Nonaka L., Suzuki S. (2002). New Mg²⁺-dependent oxytetracycline resistance determinant tet34 in *Vibrio* isolates from marine fish intestinal contents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 1550–1552.
- Nonaka L., Connell S. R., Taylor D. E. (2005). 16S rRNA mutations that confer tetracycline resistance in *Helicobacter pylori* decrease drug binding in *Escherichia coli* ribosomes. *J. Bacteriol.* 187 3708–3712.
- Palmer A. C., Angelino E., Kishony R. (2010). Chemical decay of an antibiotic inverts selection for resistance. *Nat. Chem. Biol.* 6 105–107.

- Park B. H., Levy S. B. (1988). The cryptic tetracycline resistance determinant on Tn4400 mediates tetracycline degradation as well as tetracycline efflux. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32 1797–1800. 10.1128/aac.32.12.1797
- Park J., Gasparrini A. J., Reck M. R., Symister C. T., Elliott J. L., Vogel J. P., et al. (2017). Plasticity, dynamics, and inhibition of emerging tetracycline resistance enzymes. *Nat. Chem. Biol.* 13 730–736
- Pawlowski AC, Stogios PJ, Koteva K, Skarina T, Evdokimova E, Savchenko A, Wright GD (2018). The evolution of substrate discrimination in macrolide antibiotic resistance enzymes, *Nat Commun.* 2018 Jan 9; 9(1):112.
- Pickens L. B., Tang Y. (2010). Oxytetracycline biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 285 27509–27515
- Piddock L. J. V. (2006). Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 19 382–402.
- Rasmussen B., Noller H. F., Daubresse G., Oliva B., Misulovin Z., Rothstein D. M., et al. (1991). Molecular basis of tetracycline action: identification of analogs whose primary target is not the bacterial ribosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35 2306–2311.
- Read AF, Woods RJ (2014). Antibiotic resistance management, *Evol Med Public Health.* 2014 Oct 28; 2014(1):147.
- Romero E., Gómez Castellanos J. R., Gadda G., Fraaije M. W., Mattevi A. (2018). Same substrate, many reactions: oxygen activation in flavoenzymes. *Chem. Rev.* 118 1742–1769.
- Ross J. I., Eady E. A., Cove J. H., Cunliffe W. J. (1998). 16S rRNA mutation associated with tetracycline resistance in a gram-positive bacterium. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42 1702–1705.
- Roberts M. C. (1996). Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol. Rev.* 19 1–24.
- Ross J. I., Eady E. A., Cove J. H., Cunliffe W. J. (1998). 16S rRNA mutation associated with tetracycline resistance in a gram-positive bacterium. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42 1702–1705.
- Schiott C. R., Stenderup A. (1954). Terramycin-, aureomycin- and chloromycetin-dependent bacteria isolated from patients. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 34 410–416.
- Speer B. S., Salyers A. A. (1989). Novel aerobic tetracycline resistance gene that chemically modifies tetracycline. *J. Bacteriol.* 171 148–153. 10.1128/jb.171.1.148-153.1989

- Suemori A. (2013). Conserved and non-conserved residues and their role in the structure and function of p-hydroxybenzoate hydroxylase. *Protein Eng. Des. Sel.* 26 479–488.
- Sun C., Xiao X.-Y. (2017). Fully synthetic tetracyclines: increasing chemical diversity to combat multidrug-resistant bacterial infections, in *Topics in Medicinal Chemistry* ed. Fisher J. F. (Berlin: Springer;).
- Tanaka S. K., Steenbergen J., Villano S. (2016). Discovery, pharmacology, and clinical profile of omadacycline, a novel aminomethylcycline antibiotic. *Bioorg. Med. Chem.* 24 6409–6419.
- Thaker M., Spanogiannopoulos P., Wright G. D. (2010). The tetracycline resistome. *Cell. Mol. Life Sci.* 67 419–431.
- Therien, A. G., Huber, J. L., Wilson, K. E., Beaulieu, P., Caron, A., Claveau, D., et al. (2012). Broadening the spectrum of β -lactam antibiotics through inhibition of signal peptidase type I. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 4662–4670.
- Thompson MK, Keithly ME, Harp J, Cook PD, Jagessar KL, Sulikowski GA, Armstrong RN (2013). Structural and chemical aspects of resistance to the antibiotic fosfomycin conferred by FosB from *Bacillus cereus*, *Biochemistry*. 2013 Oct 15; 52(41):7350-62.
- Trieber C. A., Taylor D. E. (2002). Mutations in the 16S rRNA genes of *Helicobacter pylori* mediate resistance to tetracycline. *J. Bacteriol.* 184 2131–2140.
- van Berkel W. J., Kamerbeek N. M., Fraaije M. W. (2006). Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. *J. Biotechnol.* 124 670–689.
- Ward J. M., Hodgson J. E. (1993). The biosynthetic genes for clavulanic acid and cephamycin production occur as a ‘super-cluster’ in three *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.* 110 239–242.
- Whittle G., Hund B. D., Shoemaker N. B., Salyers A. A. (2001). Characterization of the 13-kilobase ermF region of the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 3488–3495. 10.1128/AEM.67.8.3488-3495.2001
- Wilson DN (2009). The A-Z of bacterial translation inhibitors, *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2009 Nov-Dec; 44(6):393-433.
- Wright GD (2005). Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification, *Adv Drug Deliv Rev.* 2005 Jul 29; 57(10):1451-70.
- Xiao H, Edwards TE, Ferré-D'Amaré AR (2008). Structural basis for specific, high-affinity tetracycline binding by an in vitro evolved aptamer and artificial riboswitch, *Chem Biol.* 2008 Oct 20; 15(10):1125-37.

Yamashita N, Yasojima M, Nakada N, Miyajima K, Komori K, Suzuki Y, Tanaka H: Effects of antibacterial agents, levofloxacin and clarithromycin, on aquatic organisms. *WaterSci Technol* 2006, 53:65-72.

Yim G., Huimi Wang H., Davies J. (2007). Antibiotics as signalling molecules. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 362 1195–1200. 10.1098/rstb.2007.2044

5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1

DEFINITION Uncultured bacterium clone S20_12 tetracycline destructase Tet(55) gene, complete cds.

ACCESSION KR857689

ORGANISM uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1158)

AUTHORS Forsberg, K.J., Patel, S., Wencewicz, T.A. and Dantas, G.
TITLE The Tetracycline Destructases: A Novel Family of Tetracycline-Inactivating Enzymes

JOURNAL *Chem. Biol.* 22 (7), 888-897 (2015)

REFERENCE 2 (bases 1 to 1158)

AUTHORS Forsberg, K.J., Patel, S., Wencewicz, T.A. and Dantas, G.

TITLE DirectSubmission
Submitted (20-MAY-2015) Center for Genome Sciences and Systems Biology,
Washington University School of Medicine, 4444 Forest Park Ave, Saint Louis,
MO 63108, USA

JOURNAL /isolation_source="soil"

2

DEFINITION Uncultured bacterium clone S19_4 tetracycline destructase Tet(54) gene, complete cds.

ACCESSION KR857688

ORGANISM uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1167)

AUTHORS Forsberg, K.J., Patel, S., Wencewicz, T.A. and Dantas, G.
TITLE The Tetracycline Destructases: A Novel Family of Tetracycline-Inactivating Enzymes

JOURNAL *Chem. Biol.* 22 (7), 888-897 (2015)

REFERENCE 2 (bases 1 to 1167)

AUTHORS Forsberg, K.J., Patel, S., Wencewicz, T.A. and Dantas, G.

TITLE DirectSubmission
Submitted (20-MAY-2015) Center for Genome Sciences and Systems Biology,
Washington University School of Medicine, 4444 Forest Park Ave, Saint Louis,
JOURNAL MO 63108, USA

/isolation_source="soil"

3

DEFINITION Uncultured bacterium clone S15_14 tetracycline destructase Tet(53) gene,
complete cds.

ACCESSION KR857687

ORGANISM uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1164)

AUTHORS Forsberg,K.J., Patel,S., Wencewicz,T.A. and Dantas,G.
TITLE The Tetracycline Destructases: A Novel Family of Tetracycline-Inactivating
Enzymes

JOURNAL Chem. Biol. 22 (7), 888-897 (2015)

REFERENCE 2 (bases 1 to 1164)

AUTHORS Forsberg,K.J., Patel,S., Wencewicz,T.A. and Dantas,G.

TITLE DirectSubmission
Submitted (20-MAY-2015) Center for Genome Sciences and Systems Biology,
Washington University School of Medicine, 4444 Forest Park Ave, Saint Louis,
JOURNAL MO 63108, USA

/isolation_source="soil"

4

DEFINITION Uncultured bacterium clone S14_3 tetracycline destructase Tet(52) gene,
complete cds.

ACCESSION KR857686

ORGANISM uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1173)

AUTHORS Forsberg,K.J., Patel,S., Wencewicz,T.A. and Dantas,G.
TITLE The Tetracycline Destructases: A Novel Family of Tetracycline-Inactivating
Enzymes

JOURNAL Chem. Biol. 22 (7), 888-897 (2015)

REFERENCE 2 (bases 1 to 1173)

AUTHORS Forsberg,K.J., Patel,S., Wencewicz,T.A. and Dantas,G.

TITLE DirectSubmission
Submitted (20-MAY-2015) Center for Genome Sciences and Systems Biology,
Washington University School of Medicine, 4444 Forest Park Ave, Saint Louis,
JOURNAL

MO 63108, USA

/isolation_source="soil"

5

DEFINITION Uncultured bacterium clone S14_2 tetracycline destructase Tet(51) gene, complete cds.

ACCESSION KR857685

ORGANISM uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1164)

AUTHORS Forsberg,K.J., Patel,S., Wencewicz,T.A. and Dantas,G.

TITLE The Tetracycline Destructases: A Novel Family of Tetracycline-Inactivating Enzymes

JOURNAL Chem. Biol. 22 (7), 888-897 (2015)

REFERENCE 2 (bases 1 to 1164)

AUTHORS Forsberg,K.J., Patel,S., Wencewicz,T.A. and Dantas,G.

TITLE DirectSubmission
Submitted (20-MAY-2015) Center for Genome Sciences and Systems Biology,
Washington University School of Medicine, 4444 Forest Park Ave, Saint Louis,
MO 63108, USA

JOURNAL MO 63108, USA

/isolation_source="soil"

6

DEFINITION Uncultured bacterium clone S11_7 tetracycline destructase Tet(50) gene, complete cds.

ACCESSION KR857684

ORGANISM uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1167)

AUTHORS Forsberg,K.J., Patel,S., Wencewicz,T.A. and Dantas,G.

TITLE The Tetracycline Destructases: A Novel Family of Tetracycline-Inactivating Enzymes

JOURNAL Chem. Biol. 22 (7), 888-897 (2015)

REFERENCE 2 (bases 1 to 1167)

AUTHORS Forsberg,K.J., Patel,S., Wencewicz,T.A. and Dantas,G.

TITLE DirectSubmission
Submitted (20-MAY-2015) Center for Genome Sciences and Systems Biology,
Washington University School of Medicine, 4444 Forest Park Ave, Saint Louis,
MO 63108, USA

JOURNAL MO 63108, USA

/isolation_source="soil"

7

DEFINITION Uncultured bacterium clone S11_5 tetracycline destructase Tet(49) gene, complete cds.

ACCESSION KR857683

ORGANISM uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1164)

AUTHORS Forsberg,K.J., Patel,S., Wencewicz,T.A. and Dantas,G.
The Tetracycline Destructases: A Novel Family of Tetracycline-Inactivating
TITLE Enzymes

JOURNAL Chem. Biol. 22 (7), 888-897 (2015)

REFERENCE 2 (bases 1 to 1164)

AUTHORS Forsberg,K.J., Patel,S., Wencewicz,T.A. and Dantas,G.

TITLE DirectSubmission
Submitted (20-MAY-2015) Center for Genome Sciences and Systems Biology,
Washington University School of Medicine, 4444 Forest Park Ave, Saint Louis,
JOURNAL MO 63108, USA

/isolation_source="soil"

8

DEFINITION Uncultured bacterium clone S08_12 tetracycline destructase Tet(48) gene, complete cds.

ACCESSION KR857682

ORGANISM uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1200)

AUTHORS Forsberg,K.J., Patel,S., Wencewicz,T.A. and Dantas,G.
The Tetracycline Destructases: A Novel Family of Tetracycline-Inactivating
TITLE Enzymes

JOURNAL Chem. Biol. 22 (7), 888-897 (2015)

REFERENCE 2 (bases 1 to 1200)

AUTHORS Forsberg,K.J., Patel,S., Wencewicz,T.A. and Dantas,G.

TITLE DirectSubmission
Submitted (20-MAY-2015) Center for Genome Sciences and Systems Biology,
Washington University School of Medicine, 4444 Forest Park Ave, Saint Louis,
JOURNAL MO 63108, USA

/isolation_source="soil"

9

DEFINITION Uncultured bacterium clone S08_6 tetracycline destructase Tet(47) gene, complete cds.
 ACCESSION KR857681
 ORGANISM uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1248)
 AUTHORS Forsberg,K.J., Patel,S., Wencewicz,T.A. and Dantas,G.
 TITLE The Tetracycline Destructases: A Novel Family of Tetracycline-Inactivating Enzymes
 JOURNAL Chem. Biol. 22 (7), 888-897 (2015)
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1248)
 AUTHORS Forsberg,K.J., Patel,S., Wencewicz,T.A. and Dantas,G.
 TITLE DirectSubmission
 Submitted (20-MAY-2015) Center for Genome Sciences and Systems Biology, Washington University School of Medicine, 4444 Forest Park Ave, Saint Louis, MO 63108, USA
 JOURNAL MO 63108, USA

10

DEFINITION uncultured bacterium tet(54) gene for tetracycline destructase Tet(54), complete CDS.
 ACCESSION NG_055779
 ORGANISM uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1167)
 AUTHORS Forsberg,K.J., Patel,S., Wencewicz,T.A. and Dantas,G.
 TITLE The Tetracycline Destructases: A Novel Family of Tetracycline-Inactivating Enzymes
 JOURNAL Chem. Biol. 22 (7), 888-897 (2015)
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1167)
 AUTHORS NCBI Refseq Project
 TITLE DirectSubmission
 Submitted (13-NOV-2017) National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA
 JOURNAL /isolation_source="soil"

11

DEFINITION uncultured bacterium tet(53) gene for tetracycline destructase Tet(53), complete CDS.
 ACCESSION NG_055778
 ORGANISM uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1164)
AUTHORS Forsberg,K.J., Patel,S., Wencewicz,T.A. and Dantas,G
TITLE The Tetracycline Destructases: A Novel Family of Tetracycline-Inactivating
Enzymes
JOURNAL Chem. Biol. 22 (7), 888-897 (2015)
REFERENCE 2 (bases 1 to 1164)
AUTHORS
TITLE DirectSubmission
Submitted (13-NOV-2017) National Center for Biotechnology Information, NIH,
JOURNAL Bethesda, MD 20894, USA

/isolation_source="soil"

12

DEFINITION uncultured bacterium tet(52) gene for tetracycline destructase Tet(52),
complete CDS.
ACCESSION NG_055777
ORGANISM uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1173)
AUTHORS Forsberg,K.J., Patel,S., Wencewicz,T.A. and Dantas,G.
TITLE The Tetracycline Destructases: A Novel Family of Tetracycline-Inactivating
Enzymes
JOURNAL Chem. Biol. 22 (7), 888-897 (2015)
REFERENCE 2 (bases 1 to 1173)
AUTHORS
TITLE DirectSubmission
Submitted (13-NOV-2017) National Center for Biotechnology Information, NIH,
JOURNAL Bethesda, MD 20894, USA

/isolation_source="soil"

13

DEFINITION uncultured bacterium tet(51) gene for tetracycline destructase Tet(51),
complete CDS.
ACCESSION NG_055776
ORGANISM uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1164)
AUTHORS Forsberg,K.J., Patel,S., Wencewicz,T.A. and Dantas,G.
TITLE The Tetracycline Destructases: A Novel Family of Tetracycline-Inactivating
Enzymes

JOURNAL Chem. Biol. 22 (7), 888-897 (2015)
REFERENCE 2 (bases 1 to 1164)
AUTHORS
TITLE DirectSubmission
Submitted (13-NOV-2017) National Center for Biotechnology Information, NIH,
JOURNAL Bethesda, MD 20894, USA
/isolation_source="soil"

14

uncultured bacterium tet(50) gene for tetracycline destructase Tet(50),
DEFINITION complete CDS.
ACCESSION NG_055775
ORGANISM uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1167)
AUTHORS Forsberg,K.J., Patel,S., Wenciewicz,T.A. and Dantas,G.
The Tetracycline Destructases: A Novel Family of Tetracycline-Inactivating
TITLE Enzymes
JOURNAL Chem. Biol. 22 (7), 888-897 (2015)
REFERENCE 2 (bases 1 to 1167)
AUTHORS
TITLE DirectSubmission
Submitted (13-NOV-2017) National Center for Biotechnology Information, NIH,
JOURNAL Bethesda, MD 20894, USA
/isolation_source="soil"

15

uncultured bacterium tet(49) gene for tetracycline destructase Tet(49),
DEFINITION complete CDS.
ACCESSION NG_055774
ORGANISM uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1164)
AUTHORS Forsberg,K.J., Patel,S., Wenciewicz,T.A. and Dantas,G.
The Tetracycline Destructases: A Novel Family of Tetracycline-Inactivating
TITLE Enzymes
JOURNAL Chem. Biol. 22 (7), 888-897 (2015)
REFERENCE 2 (bases 1 to 1164)
AUTHORS

TITLE DirectSubmission
Submitted (13-NOV-2017) National Center for Biotechnology Information, NIH,
JOURNAL Bethesda, MD 20894, USA

/isolation_source="soil"

16

DEFINITION uncultured bacterium tet(48) gene for tetracycline destructase Tet(48),
complete CDS.
ACCESSION NG_055773
ORGANISM uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1200)
AUTHORS Forsberg,K.J., Patel,S., Wenciewicz,T.A. and Dantas,G.
TITLE The Tetracycline Destructases: A Novel Family of Tetracycline-Inactivating
Enzymes
JOURNAL Chem. Biol. 22 (7), 888-897 (2015)
REFERENCE 2 (bases 1 to 1200)
AUTHORS

TITLE DirectSubmission
Submitted (13-NOV-2017) National Center for Biotechnology Information, NIH,
JOURNAL Bethesda, MD 20894, USA

/isolation_source="soil"

17

DEFINITION uncultured bacterium tet(47) gene for tetracycline destructase Tet(47),
complete CDS.
ACCESSION NG_055772
ORGANISM uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1248)
AUTHORS Forsberg,K.J., Patel,S., Wenciewicz,T.A. and Dantas,G.
TITLE The Tetracycline Destructases: A Novel Family of Tetracycline-Inactivating
Enzymes
JOURNAL Chem. Biol. 22 (7), 888-897 (2015)
REFERENCE 2 (bases 1 to 1248)
AUTHORS

TITLE DirectSubmission
Submitted (13-NOV-2017) National Center for Biotechnology Information, NIH,
JOURNAL Bethesda, MD 20894, USA

/isolation_source="soil"

18

DEFINITION Uncultured bacterium clone QTet1435 tetracycline destructase gene, partial cds.

ACCESSION KX161713

ORGANISM uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1164)

AUTHORS Wang,S., Gao,Y., Gao,X., Cao,M. and Feng,Z.
TITLE Novel Tetracycline Resistance Genes Discovered in Mount Qomolangma Soil by Using Functional Metagenomics

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1164)

AUTHORS Wang,S., Gao,Y., Gao,X., Cao,M. and Feng,Z.
TITLE DirectSubmission
Submitted (28-APR-2016) College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Weigang Road 1#, Nanjing, Nanjing 210095, China

JOURNAL /isolation_source="Mount Qomolangma soil"

19

DEFINITION Uncultured bacterium clone QTet776 tetracycline destructase gene, partial cds.

ACCESSION KX161712

ORGANISM uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1161)

AUTHORS Wang,S., Gao,Y., Gao,X., Cao,M. and Feng,Z.
TITLE Novel Tetracycline Resistance Genes Discovered in Mount Qomolangma Soil by Using Functional Metagenomics

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1161)

AUTHORS Wang,S., Gao,Y., Gao,X., Cao,M. and Feng,Z.
TITLE DirectSubmission
Submitted (28-APR-2016) College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Weigang Road 1#, Nanjing, Nanjing 210095, China

JOURNAL /isolation_source="Mount Qomolangma soil"

20

DEFINITION Legionella quinlivanii DSM 21216, whole genome shotgun sequence.

ACCESSION NZ_FNVH01000008 NZ_FNVH00000000
Legionella quinlivanii DSM 21216 Bacteria; Proteobacteria;
ORGANISM Gammaproteobacteria; Legionellales; Legionellaceae; Legionella.
REFERENCE 1
AUTHORS Varghese,N. and Submissions,S.
TITLE DirectSubmission
Submitted (22-OCT-2016) DOE - JOINT GENOME INSTITUTE, LBNL, 2800 Mitchell
JOURNAL Drive, Walnut Creek, CA 94598, 94598, USA

21

DEFINITION Legionella sainthelensi strain LA01-117 chromosome, complete genome.
ACCESSION CP025491
Legionella sainthelensi Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;
ORGANISM Legionellales; Legionellaceae; Legionella.
REFERENCE 1 (bases 1 to 4344886)
AUTHORS Cree,S.L., Slow,S., Kennedy,M.A., Murdoch,D.R., Biggs,P.J. and Anderson,T.
Legionella sainthelensi LA01-117, whole genome sequence of a clinical isolate
TITLE from New Zealand
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 4344886)
AUTHORS Cree,S.L., Slow,S., Kennedy,M.A., Murdoch,D.R., Biggs,P.J. and Anderson,T.
TITLE DirectSubmission
Submitted (16-DEC-2017) Microbiology, Canterbury Health Laboratories,
JOURNAL cnrTuam St and Hagley Ave, Christchurch 8011, New Zealand
/isolation_source="Respiratory sample - sputum"

22

DEFINITION Legionella sainthelensi strain LA01-117 chromosome, complete genome.
ACCESSION CP025491
Legionella sainthelensi Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;
ORGANISM Legionellales; Legionellaceae; Legionella.
REFERENCE 1 (bases 1 to 4344886)
AUTHORS Cree,S.L., Slow,S., Kennedy,M.A., Murdoch,D.R., Biggs,P.J. and Anderson,T.
Legionella sainthelensi LA01-117, whole genome sequence of a clinical isolate
TITLE from New Zealand
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 4344886)
AUTHORS Cree,S.L., Slow,S., Kennedy,M.A., Murdoch,D.R., Biggs,P.J. and Anderson,T.

TITLE DirectSubmission
Submitted (16-DEC-2017) Microbiology, Canterbury Health Laboratories,
JOURNAL cnrTuam St and Hagley Ave, Christchurch 8011, New Zealand

/isolation_source="Respiratory sample - sputum"

23

DEFINITION Legionella massiliensis strain LegA, whole genome shotgun sequence.
ACCESSION NZ_CCW01000004 NZ_CCW00000000
Legionella massiliensis Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;
ORGANISM Legionellales; Legionellaceae; Legionella.
REFERENCE 1
AUTHORS UrmiteGenomesUrmite,Genomes.
TITLE DirectSubmission
Submitted (05-SEP-2014) URMITE, 27 Bd J Moulin, 13385 Marseille Cedex 05,
JOURNAL France, 13385, France

24

DEFINITION Legionella massiliensis, whole genome shotgun sequence.
ACCESSION NZ_CCSB01000004 NZ_CCSB00000000
Legionella massiliensis Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;
ORGANISM Legionellales; Legionellaceae; Legionella.
REFERENCE 1
AUTHORS UrmiteGenomesUrmite,Genomes.
TITLE DirectSubmission
Submitted (24-JUN-2014) URMITE, 27 Bd J Moulin, 13385 Marseille Cedex 05,
JOURNAL France, 13385, France

25

DEFINITION Legionella clemsonensis strain CDC-D5610 chromosome, complete genome.
ACCESSION NZ_CP016397
Legionella clemsonensis Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;
ORGANISM Legionellales; Legionellaceae; Legionella.
REFERENCE 1 (bases 1 to 3272100)
AUTHORS Hassler,H.
TITLE DirectSubmission
Submitted (06-JUL-2016) Biological Sciences, Clemson University, 132 Long Hall,
JOURNAL Clemson, SC 29634, USA

/isolation_source="BronchialWash"

26

DEFINITION *Legionella longbeachae* NSW150, complete genome.

ACCESSION NC_013861

ORGANISM *Legionella longbeachae* NSW150 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Legionellales; Legionellaceae; *Legionella*.

REFERENCE 1

AUTHORS Cazalet,C., Gomez-Valero,L., Rusniok,C., Lomma,M., Dervins-Ravault,D., Newton,H.J., Sansom,F.M., Jarraud,S., Zidane,N., Ma,L., Bouchier,C., Etienne,J., Hartland,E.L. and Buchrieser,C.

TITLE Analysis of the *Legionella longbeachae* genome and transcriptome uncovers unique strategies to cause Legionnaires' disease

JOURNAL PLoSGenet. 6 (2), E1000851 (2010)

REFERENCE 2 (bases 1 to 4077332)

AUTHORS Rusniok,C.

TITLE DirectSubmission
Submitted (06-JAN-2010) Rusniok C., Unite de Biologie des BacteriesIntracellulaires, Institut Pasteur, 25, 28 rue du Docteur Roux, 75015,

JOURNAL FRANCE

27

DEFINITION *Legionella longbeachae* strain F1157CHC chromosome, complete genome.

ACCESSION NZ_CP020894

ORGANISM *Legionella longbeachae* Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Legionellales; Legionellaceae; *Legionella*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 4162768)

AUTHORS Anderson,T., Biggs,P.J., Slow,S., Miller,J., Singh,S. and Murdoch,D.R.

TITLE Complete Genome of a *L. longbeachae* clinical isolate

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 4162768)

AUTHORS Anderson,T., Biggs,P.J., Slow,S., Miller,J., Singh,S. and Murdoch,D.R.

TITLE DirectSubmission
Submitted (20-APR-2017) Microbiology, Canterbury Health Laboratories, cnrTuam St and Hagley Ave, Christchurch 8011, New Zealand

JOURNAL /isolation_source="Respiratory sample - sputum"

28

DEFINITION *Fluoribactergormanii* strain ATCC 33297 Scaffold36_1, whole genome shotgun sequence.

ACCESSION NZ_LBAY01000054 NZ_LBAY00000000
Fluoribactergormanii Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;
ORGANISM Legionellales; Legionellaceae; Fluoribacter.
REFERENCE 1 (bases 1 to 16928)
AUTHORS Qin,T
TITLE DirectSubmission
Submitted (16-APR-2015) Department of Respiratory Diseases, National
Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for
JOURNAL Disease Control and Prevention, Changbai Road, Beijing 102206, China
/isolation_source="soil from a creek bank"

29

DEFINITION Fluoribactergormanii strain ATCC 33342, whole genome shotgun sequence.
ACCESSION NZ_FTNL01000040 NZ_FTNL00000000
Fluoribactergormanii Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;
ORGANISM Legionellales; Legionellaceae; Fluoribacter.
REFERENCE 1
AUTHORS Varghese,N. and Submissions,S.
TITLE DirectSubmission
Submitted (10-JAN-2017) DOE - JOINT GENOME INSTITUTE, LBNL, 2800 Mitchell
JOURNAL Drive, Walnut Creek, CA 94598, USA

30

DEFINITION Legionella quinlivanii strain CDC#1442-AUS-E Lqui_ctg025, whole genome
shotgun sequence.
ACCESSION NZ_LNYS01000025 NZ_LNYS00000000
Legionella quinlivanii Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;
ORGANISM Legionellales; Legionellaceae; Legionella.
REFERENCE 1 (bases 1 to 383100)
Burststein,D., Amaro,F., Zusman,T., Lifshitz,Z., Cohen,O., Gilbert,J.A., Pupko,T.,
AUTHORS Shuman,H.A. and Segal,G.
Genomic analysis of 38 Legionella species identifies large and diverse effector
TITLE repertoires
JOURNAL Nat. Genet. 48 (2), 167-175 (2016)
REFERENCE 2 (bases 1 to 383100)
AUTHORS Burststein,D.
TITLE DirectSubmission
Submitted (24-NOV-2015) Cell Research and Immunology, Tel Aviv University,
JOURNAL Tel Aviv 69978, Israel
/isolation_source="Water in bus air conditioner"

31

DEFINITION *Legionella nautarum* strain ATCC 49506 Lnau_ctg024, whole genome shotgun sequence.

ACCESSION NZ_LNYO01000024 NZ_LNYO00000000

ORGANISM *Legionella nautarum* Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Legionellales; Legionellaceae; *Legionella*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 827231)

AUTHORS Burstein,D., Amaro,F., Zusman,T., Lifshitz,Z., Cohen,O., Gilbert,J.A., Pupko,T., Shuman,H.A. and Segal,G.

TITLE Genomic analysis of 38 *Legionella* species identifies large and diverse effector repertoires

JOURNAL Nat. Genet. 48 (2), 167-175 (2016)

REFERENCE 2 (bases 1 to 827231)

AUTHORS Burstein,D.

TITLE DirectSubmission
Submitted (24-NOV-2015) Cell Research and Immunology, Tel Aviv University,

JOURNAL Tel Aviv 69978, Israel

/isolation_source="Hot water tap"

32

DEFINITION *Legionella feeleeii* strain ATCC 35072 Scaffold41, whole genome shotgun sequence.

ACCESSION NZ_KV441823 NZ_LBHK01000000

ORGANISM *Legionella feeleeii* Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Legionellales; Legionellaceae; *Legionella*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 23888)

AUTHORS Qin,T.

TITLE DirectSubmission
Submitted (16-APR-2015) Department of Respiratory Diseases, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Changbai Road, Beijing 102206, China

JOURNAL

/isolation_source="grinding machine coolant fluid"

33

DEFINITION *Fluoribacter gormanii* strain LS-13 Lgor_ctg035, whole genome shotgun sequence.

ACCESSION NZ_LNYD01000035 NZ_LNYD00000000

ORGANISM *Fluoribacter gormanii* Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Legionellales; Legionellaceae; *Fluoribacter*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 152980)
 Burstein,D., Amaro,F., Zusman,T., Lifshitz,Z., Cohen,O., Gilbert,J.A., Pupko,T.,
 AUTHORS Shuman,H.A. and Segal,G.
 TITLE Genomic analysis of 38 Legionella species identifies large and diverse effector
 repertoires
 JOURNAL Nat. Genet. 48 (2), 167-175 (2016)
 REFERENCE 2 (bases 1 to 152980)
 AUTHORS Burstein,D.
 TITLE DirectSubmission
 Submitted (24-NOV-2015) Cell Research and Immunology, Tel Aviv University,
 JOURNAL Tel Aviv 69978, Israel
 /isolation_source="Soil from a creek bank"

34

DEFINITION Legionella feeleii strain WO-44C Lfee_ctg002, whole genome shotgun
 sequence.
 ACCESSION NZ_LNYB01000002 NZ_LNYB00000000
 Legionella feeleii Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;
 ORGANISM Legionellales; Legionellaceae; Legionella.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 23994)
 Burstein,D., Amaro,F., Zusman,T., Lifshitz,Z., Cohen,O., Gilbert,J.A., Pupko,T.,
 AUTHORS Shuman,H.A. and Segal,G.
 TITLE Genomic analysis of 38 Legionella species identifies large and diverse effector
 repertoires
 JOURNAL Nat. Genet. 48 (2), 167-175 (2016)
 REFERENCE 2 (bases 1 to 23994)
 AUTHORS Burstein,D.
 TITLE DirectSubmission
 Submitted (24-NOV-2015) Cell Research and Immunology, Tel Aviv University,
 JOURNAL Tel Aviv 69978, Israel
 /isolation_source="Grinding machine coolant fluid"

35

DEFINITION Fluoribacterdumoffii NY 23 Ldum_ctg006, whole genome shotgun sequence.
 ACCESSION NZ_LNXZ01000006 NZ_LNXZ00000000
 Fluoribacterdumoffii NY 23 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;
 ORGANISM Legionellales; Legionellaceae; Fluoribacter.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 2817594)
 Burstein,D., Amaro,F., Zusman,T., Lifshitz,Z., Cohen,O., Gilbert,J.A., Pupko,T.,
 AUTHORS Shuman,H.A. and Segal,G.

TITLE Genomic analysis of 38 Legionella species identifies large and diverse effector repertoires
REFERENCE 2 (bases 1 to 2817594)
AUTHORS Burstein,D.
TITLE DirectSubmission
Submitted (24-NOV-2015) Cell Research and Immunology, Tel Aviv University,
JOURNAL Tel Aviv 69978, Israel
/isolation_source="Coolingtower"

36

DEFINITION Fluoribacterdumoffii NY 23 chromosome, whole genome shotgun sequence.
ACCESSION NZ_CM001373 NZ_AGVU01000000
Fluoribacterdumoffii NY 23 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;
ORGANISM Legionellales; Legionellaceae; Fluoribacter.
REFERENCE 1 (bases 1 to 3689573)
Qin,T., Cen,Z., Zhu,B.Q., Yang,X.W., Liang,T., Li,D.F., Zhao,X.N., Liu,Z.Y., Cui,Y.J.,
AUTHORS Yang,R.F., Shao,Z.J. andSong,Y.J.
TITLE Whole-Genome Sequences of two Legionella dumoffii strains
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 3689573)
Qin,T., Cen,Z., Zhu,B.Q., Yang,X.W., Liang,T., Li,D.F., Zhao,X.N., Liu,Z.Y., Cui,Y.J.,
AUTHORS Yang,R.F., Shao,Z.J. andSong,Y.J.
TITLE DirectSubmission
Submitted (13-OCT-2011) State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity,
Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, No. 20, Dongdajie Street,
JOURNAL Fengtai District, Beijing, Beijing 100071, China
/isolation_source="coolingtower"

37

DEFINITION FluoribacterdumoffiiTex-KL chromosome, whole genome shotgun sequence.
ACCESSION NZ_CM001371 NZ_AGVT01000000
FluoribacterdumoffiiTex-KL Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;
ORGANISM Legionellales; Legionellaceae; Fluoribacter.
REFERENCE 1 (bases 1 to 3635360)
Qin,T., Cen,Z., Zhu,B.Q., Yang,X.W., Liang,T., Li,D.F., Zhao,X.N., Liu,Z.Y., Cui,Y.J.,
AUTHORS Yang,R.F., Shao,Z.J. andSong,Y.J.
TITLE Whole-Genome Sequences of two Legionella dumoffii strains
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 3635360)

AUTHORS Qin,T., Cen,Z., Zhu,B.Q., Yang,X.W., Liang,T., Li,D.F., Zhao,X.N., Liu,Z.Y., Cui,Y.J., Yang,R.F., Shao,Z.J. and Song,Y.J.

TITLE DirectSubmission
Submitted (13-OCT-2011) State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity,
Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, No. 20, Dongdajie Street,
JOURNAL Fengtai District, Beijing, Beijing 100071, China

/isolation_source="postmortem lung specimen from a patient"

38

DEFINITION Legionella longbeachae D-4968 Cont_LLB_02, whole genome shotgun
sequence.

ACCESSION NZ_ACZG01000002 NZ_ACZG00000000

ORGANISM Legionella longbeachae D-4968 Bacteria; Proteobacteria;
Gammaproteobacteria; Legionellales; Legionellaceae; Legionella.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1431070)

AUTHORS Kozak,N.A., Buss,M., Lucas,C.E., Frace,M., Govil,D., Travis,T., Olsen-
Rasmussen,M., Benson,R.F. and Fields,B.S.

TITLE Virulence factors encoded by Legionella longbeachae identified on the basis of
the genome sequence analysis of clinical isolate D-4968

JOURNAL J. Bacteriol. 192 (4), 1030-1044 (2010)

REFERENCE 2 (bases 1 to 1431070)

AUTHORS Kozak,N.A., Buss,M., Frace,M., Govil,D., Lucas,C.E., Travis,T., Olsen-
Rasmussen,M., Benson,R.F. and Fields,B.S.

TITLE DirectSubmission
Submitted (25-SEP-2009) Division of Bacterial Diseases, National Center for
Immunization and Respiratory Diseases, Coordinating Center for Infectious
Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Rd NE,
JOURNAL Mailstop G03, Atlanta, GA 30333, USA

/isolation_source="bronchial wash sample from a 77-year-old Oregon woman
diagnosed with legionellosis"

39

DEFINITION Legionella longbeachae strain FDAARGOS_201 chromosome, complete genome.

ACCESSION NZ_CP020412

ORGANISM Legionella longbeachae Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;
Legionellales; Legionellaceae; Legionella.

REFERENCE 1 (bases 1 to 4162717)

AUTHORS Kerrigan,L., Tallon,L., Sadzewicz,L., Sengamalay,N., Ott,S., Godinez,A.,
Nagaraj,S., Nadendla,S., Geyer,C. and Sichtig,H.

TITLE FDA dAtabase for Regulatory Grade micrObial Sequences (FDA-ARGOS):
Supporting development and validation of Infectious Disease Dx tests

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 4162717)
Kerrigan,L., Tallon,L., Sadzewicz,L., Sengamalay,N., Ott,S., Godinez,A.,
AUTHORS Nagaraj,S., Nadendla,S., Geyer,C. and Sichtig,H.
TITLE DirectSubmission
Submitted (23-MAR-2017) Institute for Genome Sciences, University of
JOURNAL Maryland, 801 W.Baltimore Street, Baltimore, MD 21201, USA

/isolation_source="Lung"

Πίνακας 4 : Γονίδια καταστροφασών τετρακυκλινών και οργανισμοί που εντοπίστηκαν

1
>AKQ05899.1 tetracycline destructase Tet(55) [uncultured bacterium]
2
>AKQ05898.1 tetracycline destructase Tet(54) [uncultured bacterium]
3
>AKQ05897.1 tetracycline destructase Tet(53) [uncultured bacterium]
4
>AKQ05896.1 tetracycline destructase Tet(52) [uncultured bacterium]
5
>AKQ05895.1 tetracycline destructase Tet(51) [uncultured bacterium]
6
>AKQ05894.1 tetracycline destructase Tet(50) [uncultured bacterium]
7
>AKQ05893.1 tetracycline destructase Tet(49) [uncultured bacterium]
8
>AKQ05892.1 tetracycline destructase Tet(48) [uncultured bacterium]
9
>AKQ05891.1 tetracycline destructase Tet(47) [uncultured bacterium]
10
>WP_099982811.1 tetracycline destructase Tet(54) [uncultured bacterium]
11
>WP_099982810.1 tetracycline destructase Tet(53) [uncultured bacterium]
12
>WP_099982809.1 tetracycline destructase Tet(52) [uncultured bacterium]
13
>WP_099982808.1 tetracycline destructase Tet(51) [uncultured bacterium]
14
>WP_099982807.1 tetracycline destructase Tet(50) [uncultured bacterium]
15
>WP_099982806.1 tetracycline destructase Tet(49) [uncultured bacterium]
16
>WP_099982805.1 tetracycline destructase Tet(48) [uncultured bacterium]
17

>WP_099982804.1 tetracycline destructase Tet(47) [uncultured bacterium]
18
>APT68071.1 tetracycline destructase, partial [uncultured bacterium]
19
>APT68070.1 tetracycline destructase, partial [uncultured bacterium]
20
>WP_058508912.1 tetracycline destructase [Legionella quinlivanii]
21
>AUH73041.1 tetracycline destructase [Legionella sainthelensi]
22
>AUH73041.1 tetracycline destructase [Legionella sainthelensi]
23
>WP_044012519.1 tetracycline destructase [Legionella massiliensis]
24
>WP_044012519.1 tetracycline destructase [Legionella massiliensis]
25
>WP_094089728.1 tetracycline destructase [Legionella clemsonensis]
26
>WP_003635403.1 tetracycline destructase [Legionella longbeachae]
27
>WP_003635403.1 tetracycline destructase [Legionella longbeachae]
28
>WP_058468861.1 tetracycline destructase [Fluoribactergormanii]
29
>WP_058468861.1 tetracycline destructase [Fluoribactergormanii]
30
>WP_058508912.1 tetracycline destructase [Legionella quinlivanii]
31
>WP_058505830.1 tetracycline destructase [Legionella nautarum]
32
>WP_058443238.1 tetracycline destructase [Legionella feeleii]
33
>WP_058468861.1 tetracycline destructase [Fluoribactergormanii]
34
>WP_058443238.1 tetracycline destructase [Legionella feeleii]
35
>WP_010652895.1 tetracycline destructase [Fluoribacterdumoffii]
36
>WP_010652895.1 tetracycline destructase [Fluoribacterdumoffii]
37
>WP_010652895.1 tetracycline destructase [Fluoribacterdumoffii]
38
>WP_003635403.1 tetracycline destructase [Legionella longbeachae]
39
>WP_003635403.1 tetracycline destructase [Legionella longbeachae]

Πίνακας 5 : Γονίδια και οι αλφαριθμοί που αντιστοιχούν στον κωδικό πρόσβασης στην Genbank

group a	1,2
group b	5,6
group c	7,8 7,9 7,1 7,11 7,12 7,13 7,14
group d	8,9 8,1 8,11 8,12 8,13 8,14
group e	9,1 9,11 9,12 9,13 9,14
group f	10,11 10,12 10,13 10,14
group g	11,12 11,13 11,14
group h	12,13 12,14
group i	13,14
group j	15,16
group k	

	18,19
group l	
	20,21
group m	
	22,25
	22,26
	22,27
	22,28
group n	
	23,24
	23,25
	23,26
	23,27
	23,28
group o	
	24,25
	24,26
	24,27
	24,28
group p	
	25,26
	25,27
	25,28
group q	
	26,27
	26,28
group r	
	27,28

Πίνακας 6 : Ομάδες μικροοργανισμών ανάλογα με την ομοιότητά της τετρακυκλίνης (ομοιότητα >80% σε κάθε ομάδα)

group A
uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.

group B
uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.

group C
Legionellaquinlivanii DSM 21216
Legionellafeeleii
Legionellasainthelensi
Legionellalongbeachae NSW150
Legionellamassiliensis
Legionellanautarum
Legionellaclemsonensis

Fluoribactergormanii

group D

Legionellafeeleii

Legionellasainthelensi

Legionellalongbeachae NSW150

Legionellamassiliensis

Legionellanautarum

Legionellaclemsonensis

Fluoribactergormanii

group E

Legionellasainthelensi

Legionellalongbeachae NSW150

Legionellamassiliensis

Legionellaclemsonensis

Fluoribactergormanii

group F

Legionellalongbeachae NSW150

Legionellamassiliensis

Legionellanautarum

Legionellaclemsonensis

Fluoribactergormanii

group G

Legionellamassiliensis

Legionellanautarum

Legionellaclemsonensis

Fluoribactergormanii

group H

Legionellanautarum

Legionellaclemsonensis

Fluoribactergormanii

group I

Legionellaclemsonensis

Fluoribactergormanii

group J

uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.

group K

uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.

group L
uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.

group M
uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.

group N
uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.

group O
uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.

group P
uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.

group Q
uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.

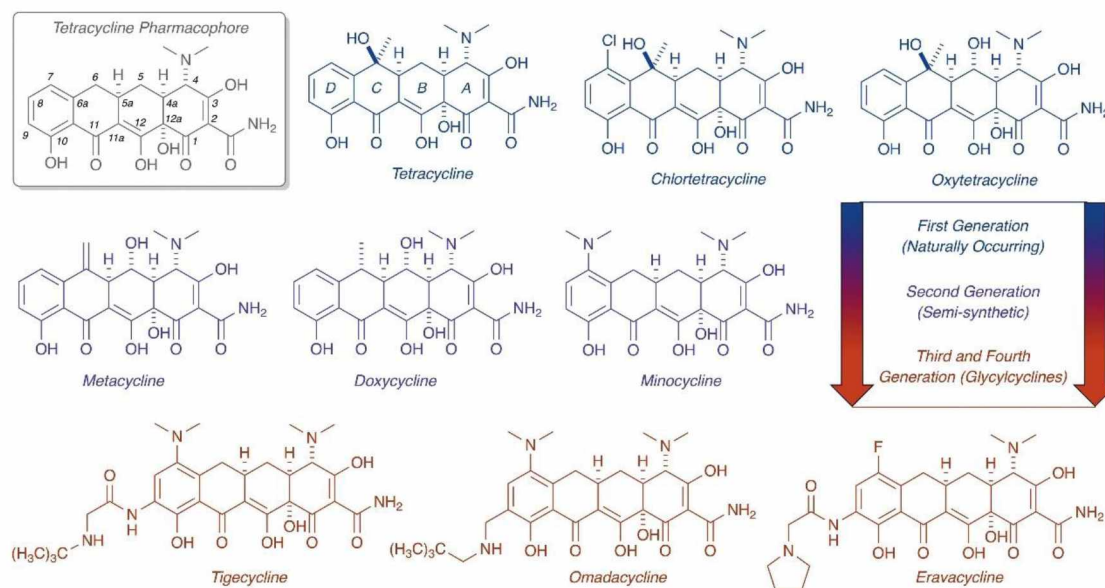
group R
uncultured bacterium Bacteria: environmental samples.

Πίνακας 7 :Οι οργανισμοί κάθε ομάδας

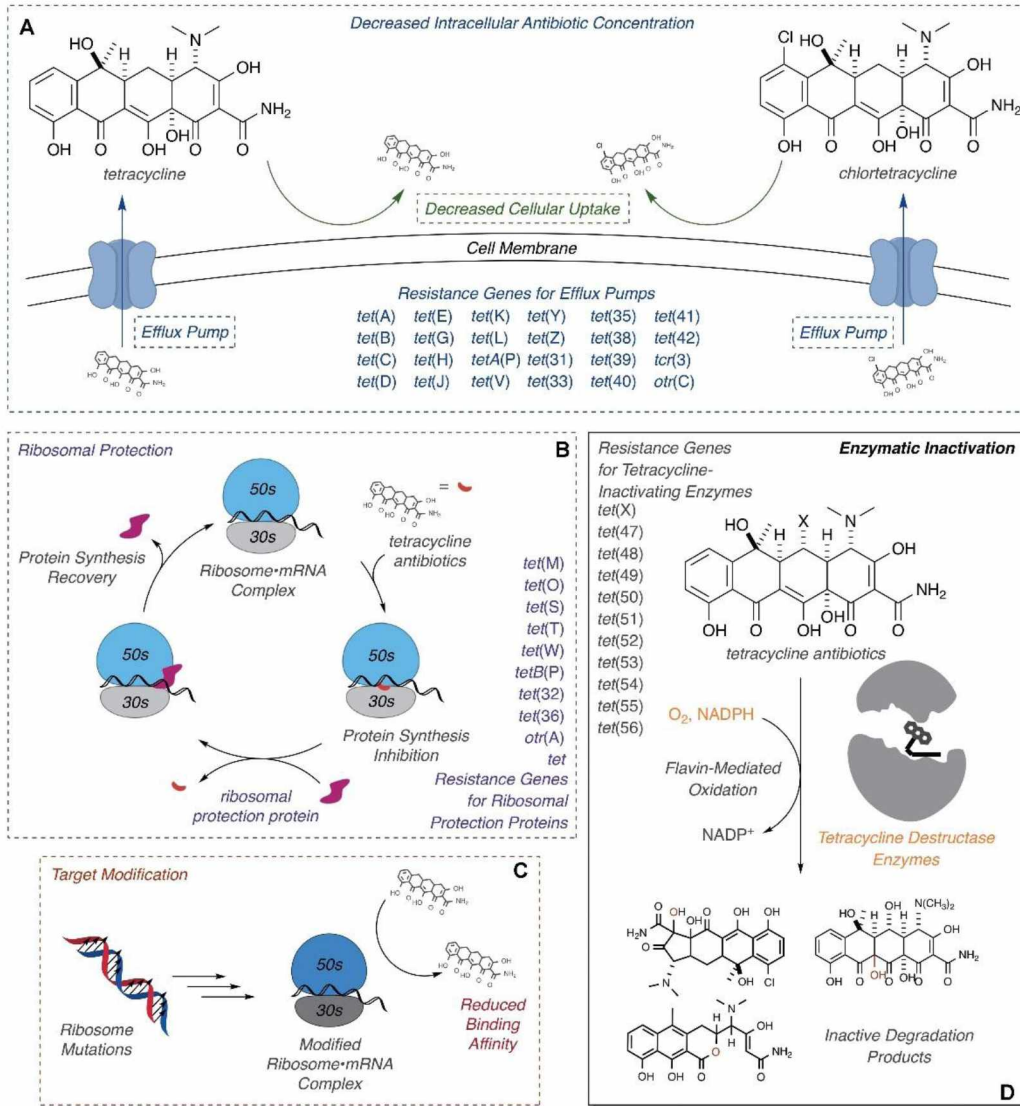
>AKQ05892.1 tetracycline destructase Tet(48) [uncultured bacterium]	1
>WP_099982805.1 tetracycline destructase Tet(48) [uncultured bacterium]	2
>WP_010652895.1 tetracycline destructase [Fluoribacterdumoffii]	3
>AKQ05899.1 tetracycline destructase Tet(55) [uncultured bacterium]	4
>AKQ05894.1 tetracycline destructase Tet(50) [uncultured bacterium]	5
>WP_099982807.1 tetracycline destructase Tet(50) [uncultured bacterium]	6
>WP_058508912.1 tetracycline destructase [Legionella quinlivanii]	7
>WP_058443238.1 tetracycline destructase [Legionella feeleii]	8
>AUH73041.1 tetracycline destructase [Legionella sainthelensi]	9
>WP_003635403.1 tetracycline destructase [Legionella longbeachae]	10
	11
	62

>WP_044012519.1 tetracycline destructase [Legionella massiliensis]	12
>WP_058505830.1 tetracycline destructase [Legionella nautarum]	13
>WP_094089728.1 tetracycline destructase [Legionella clemsonensis]	14
>WP_058468861.1 tetracycline destructase [Fluoribactergormanii]	15
>AKQ05898.1 tetracycline destructase Tet(54) [uncultured bacterium]	16
>WP_099982811.1 tetracycline destructase Tet(54) [uncultured bacterium]	17
>APT68070.1 tetracycline destructase, partial [uncultured bacterium]	18
>AKQ05897.1 tetracycline destructase Tet(53) [uncultured bacterium]	19
>WP_099982810.1 tetracycline destructase Tet(53) [uncultured bacterium]	20
>AKQ05896.1 tetracycline destructase Tet(52) [uncultured bacterium]	21
>WP_099982809.1 tetracycline destructase Tet(52) [uncultured bacterium]	22
>APT68071.1 tetracycline destructase, partial [uncultured bacterium]	23
>AKQ05895.1 tetracycline destructase Tet(51) [uncultured bacterium]	24
>WP_099982808.1 tetracycline destructase Tet(51) [uncultured bacterium]	25
>AKQ05893.1 tetracycline destructase Tet(49) [uncultured bacterium]	26
>WP_099982806.1 tetracycline destructase Tet(49) [uncultured bacterium]	27
>AKQ05891.1 tetracycline destructase Tet(47) [uncultured bacterium]	28
>WP_099982804.1 tetracycline destructase Tet(47) [uncultured bacterium]	

Πίνακας 8 : Οι πληροφορίες κάθε οργανισμού όπως τοποθετήθηκαν στο πρόγραμμα Clustal.



Evolution of the tetracycline scaffold. 6-Deoxy-6-demethyltetracycline represents the minimum tetracycline pharmacophore required for inhibition of the ribosome. Tetracycline (first reported in 1953), CTc (first reported in 1948), and oxytetracycline (first reported in 1950) represent first generation structures. Metacycline (first reported in 1962), doxycycline (first reported in 1967), and minocycline (first reported in 1961) represent second generation structures. Tigecycline (first reported in 1993) is the only FDA-approved third generation structure, while omadacycline (first reported in 2013) and eravacycline (first reported in 2013) are fourth generation molecules currently in phase III clinical trials.



Molecular mechanisms of tetracycline resistance. (A) Efflux, exclusion, (B) ribosome protection, (C) ribosome modification, and (D) enzymatic inactivation. Documented ARGs associated with each type of tetracycline resistance are provided.