



Διπλωματική Εργασία

Διερεύνηση του ρόλου των CRISPR/Cas συστημάτων σε στελέχη *Pseudomonas aeruginosa*

Λάζαρος Α. Γκαγκαλέτσιος



ΛΑΡΙΣΑ 2022

Θέμα Διπλωματικής εργασίας

«Διερεύνηση του ρόλου των CRISPR/Cas συστημάτων σε στελέχη *Pseudomonas aeruginosa*»

Λάζαρος Α. Γκαγκαλέτσιος

Diploma Thesis

“Investigation of the role of CRISPR / Cas systems in *Pseudomonas aeruginosa* strains”

Lazaros A. Gkagkaletsios

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

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

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

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

Περιεχόμενα

	Σελ.
Ευχαριστίες	4
Περίληψη	5
Abstract	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 CRISPR/Cas συστήματα	7
1.1.1 Ιστορική αναδρομή των CRISPR/Cas συστημάτων.....	7
1.1.2 Δομή και λειτουργία των CRISPR/Cas συστημάτων	8
1.1.3 Ταξινόμηση των CRISPR/Cas συστημάτων.....	10
1.2 Κινητά Γενετικά Στοιχεία (Mobile Genetic Elements – MGEs)	13
1.2.1 Γενικές πληροφορίες	13
1.2.2 Οριζόντια μεταφορά γονιδίων – Μηχανισμοί	15
1.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
1.3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> και CRISPR/Cas συστήματα	18
1.3.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> και αντοχή στα αντιβιοτικά	19
1.4 β-λακταμάσες	20
2. ΣΚΟΠΟΣ	22
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	23
3.1 Λήψη δειγμάτων από ασθενείς	23
3.2 Καλλιέργεια κλινικών δειγμάτων από τα οποία έγινε απομόνωση των στελεχών <i>P.aeruginosa</i>	23
3.3 Ταυτοποίηση των στελεχών και μελέτη της ευαισθησίας τους	23
3.4 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA (DNA extraction)	24
3.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	25
3.5.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση γονιδίων βασικής κυτταρικής λειτουργίας (MLST)	27
3.5.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση γονιδίων που σχετίζονται με CRISPR/Cas συστήματα	29
i. Γονίδιο <i>cas1</i>	30
ii. Γονίδιο <i>cse1</i>	31
iii. Γονίδιο <i>cas8</i>	32
3.5.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση CRISPR/Cas συστοιχιών	32
i. IF-CRISPR1 περιοχή	33
ii. IF-CRISPR2 περιοχή	34
iii. IE-CRISPR1 περιοχή	35
iv. IE-CRISPR2 περιοχή	36
v. IC-CRISPR περιοχή	37

3.5.4	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση του <i>bla_{VIM}</i> γονιδίου	38
3.6	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	39
3.7	Καθαρισμός προϊόντος	39
3.7.1	Καθαρισμός PCR προϊόντων	40
3.7.2	Καθαρισμός PCR προϊόντων από πήκτωμα	41
3.8	Αλληλούχηση με μέθοδο Sanger	42
3.9	Χρήση βιοπληροφορικών προγραμμάτων για ανάλυση των αποτελεσμάτων	43
3.9.1	BioEdit	43
3.9.2	PubMLST	44
3.9.3	Blastn	45
3.9.4	CRISPRCasFinder [online]	46
3.9.5	Geneious 7.1.9	47
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	48
4.1	Έλεγχος ευαισθησίας	48
4.2	Τυποποίηση στελεχών με MLST	49
4.3	Έλεγχος ύπαρξης CRISPR/Cas συστημάτων στα στελέχη <i>P. aeruginosa</i>	50
4.4	Ανάλυση των CRISPR συστοιχιών	51
4.4.1	Τύπου I-C CRISPR/Cas συστήματα	53
4.4.2	Τύπου I-E CRISPR/Cas συστήματα	54
4.4.3	Τύπου I-F CRISPR/Cas συστήματα	57
4.5	CRISPR - βασιζόμενη φυλογένεση	66
5	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	70
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	72

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με την πλειοψηφία των πειραμάτων να πραγματοποιείται το διάστημα Ιουνίου-Αυγούστου 2021.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας, Επίκουρο Καθηγητή Ιατρικής Μικροβιολογίας, κ. Παπαγιαννίτη Κωνσταντίνο. Δεν ξέρω για ποιο από όλα να τον πρώτο-ευχαριστήσω...Για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ μαζί του σε αυτό το ερευνητικό project; Για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στο να χειρίζομαι διάφορες τεχνικές στο εργαστήριο; Ή για τις καίριες συμβουλές του αλλά και την καθοδήγηση του όλο αυτό το διάστημα, κυρίως βέβαια όταν κάποια πειράματα δεν πήγαιναν όπως θα θέλαμε; Επίσης, να αναφέρω, και την ευκαιρία που μου έδωσε να παρουσιάσω την εργασία αυτή σε ένα συνέδριο, ενώ είμαι ακόμα προπτυχιακός φοιτητής, μία εμπειρία που θα μου μείνει αξέχαστη, πόσο μάλλον από τη στιγμή που πήραμε κι έπαινο!

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο, Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, ως συνεπιβλέπων της διπλωματικής μου, για την άριστη συνεργασία.

Θα αποτελούσε παράληψη να μην αναφερθώ και στην συνεισφορά της κ. Πετεινάκης Ευθυμίας, η οποία ως καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας-Κλινικής Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής, με τη σειρά της βοήθησε σημαντικά στην επίτευξη αυτού του project.

Τέλος, εννοείται ότι θα ευχαριστήσω όλα αυτά τα άτομα εντός και εκτός σχολής, οικογένεια, φίλους και συμφοιτητές που στην πορεία έγιναν φίλοι, που με τον τρόπο τους, με βοήθησαν να περάσουν αυτά τα τέσσερα χρόνια ευχάριστα.

Περίληψη

Τα CRISPR/Cas συστήματα αποτελούν έναν φυσικό μηχανισμό άμυνας των προκαρυωτικών κυττάρων έναντι της εισόδου κινητών γενετικών στοιχείων, όπως οι φάγοι και τα πλασμίδια. Οι «πληροφορίες» των εισβολέων αποθηκεύονται σε μικρές αλληλουχίες, με την ονομασία διαχωριστές (spacers), των CRISPR συστοιχιών. Η σημερινή ταξινόμηση των CRISPR/Cas συστημάτων είναι σε 2 τάξεις, 6 τύπους και 20 τουλάχιστον υποτύπους, βάσει της σύνθεσης των crRNP συμπλόκων.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της παρουσίας CRISPR/Cas συστημάτων σε κλινικά στελέχη *P. aeruginosa*, και η βιοπληροφορική ανάλυση των πληροφοριών που είναι αποθηκευμένες στα spacers, ώστε να μελετηθεί το ιστορικό των γενετικών στοιχείων με τα οποία έχουν έρθει σε επαφή. Μία συλλογή από 100 κλινικά στελέχη *P. aeruginosa* που απομονώθηκαν στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, το 2020, μελετήθηκαν. Όλα τα *P. aeruginosa* στελέχη τυποποιήθηκαν με τη χρήση της μεθόδου της πολυτοπικής αλληλούχησης (MLST). Η παρουσία των CRISPR/Cas συστημάτων εξετάστηκε με PCR, χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές, και πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της αλληλουχίας των PCR προϊόντων.

CRISPR/Cas συστήματα εντοπίστηκαν σε 38 από τα 100 κλινικά στελέχη *P. aeruginosa*. 29 CRISPR/Cas-θετικά στελέχη ήταν ανθεκτικά στις καρβαπενέμες, εκ των οποίων 14 παράγαν τη VIM-τύπου μέταλλο-β-λακταμάση. Η πλειοψηφία των CRISPR/Cas-θετικών στελεχών (n=19) έφερε τύπου I-F σύστημα, ενώ τύπου I-E και I-C συστήματα βρέθηκαν σε 8 και 9 στελέχη, αντίστοιχα. Η MLST τυποποίηση έδειξε ότι τα CRISPR/Cas-θετικά στελέχη, ανήκαν σε διαφορετικούς κλώνους. Τα I-F και I-E συστήματα περιλάμβαναν 2 CRISPR συστοιχίες με διαφορετικό αριθμό 'διαχωριστών', ανά στέλεχος, τα τύπου I-C περιλάμβαναν μία CRISPR συστοιχία με 20 'διαχωριστές', οι οποίοι ταιριάζουν με *P. aeruginosa* χρωμοσωμικές αλληλουχίες, καθώς και διάφορα κινητά γενετικά στοιχεία. Επομένως, στη παρούσα μελέτη παρατηρήσαμε τη παρουσία των τύπου I-C, I-E και I-F CRISPR/Cas συστημάτων σε διαφορετικούς κλώνους *P. aeruginosa*, ενώ φαίνεται ότι η παρουσία τους δεν εμπόδιζε την εισαγωγή γονιδίων αντοχής, τα οποία συνήθως σχετίζονται με κινητά γενετικά στοιχεία.

Abstract

CRISPR/Cas systems are a natural defense mechanism of prokaryotic cells against the entrance of mobile genetic elements, such as phages and plasmids. The “information” of the invaders is stored in small sequences of CRISPR arrays, called spacers. The current classification of CRISPR/Cas systems comprises of 2 classes, 6 types and at least 20 subtypes, based on the synthesis of crRNP complexes.

The purpose of this study was to investigate the presence of CRISPR/Cas systems in *P. aeruginosa* clinical strains and the bioinformatics analysis of information stored in spacers, in order to study the history of the genetic data with which they have come in contact. A collection of 100 *P. aeruginosa* clinical strains isolated at the University General Hospital of Larissa, in 2020, was studied. All *P. aeruginosa* strains were standardized using the polytopic sequencing (MLST) method. The presence of CRISPR/Cas systems was examined by using PCR specific primers and sequencing of PCR products.

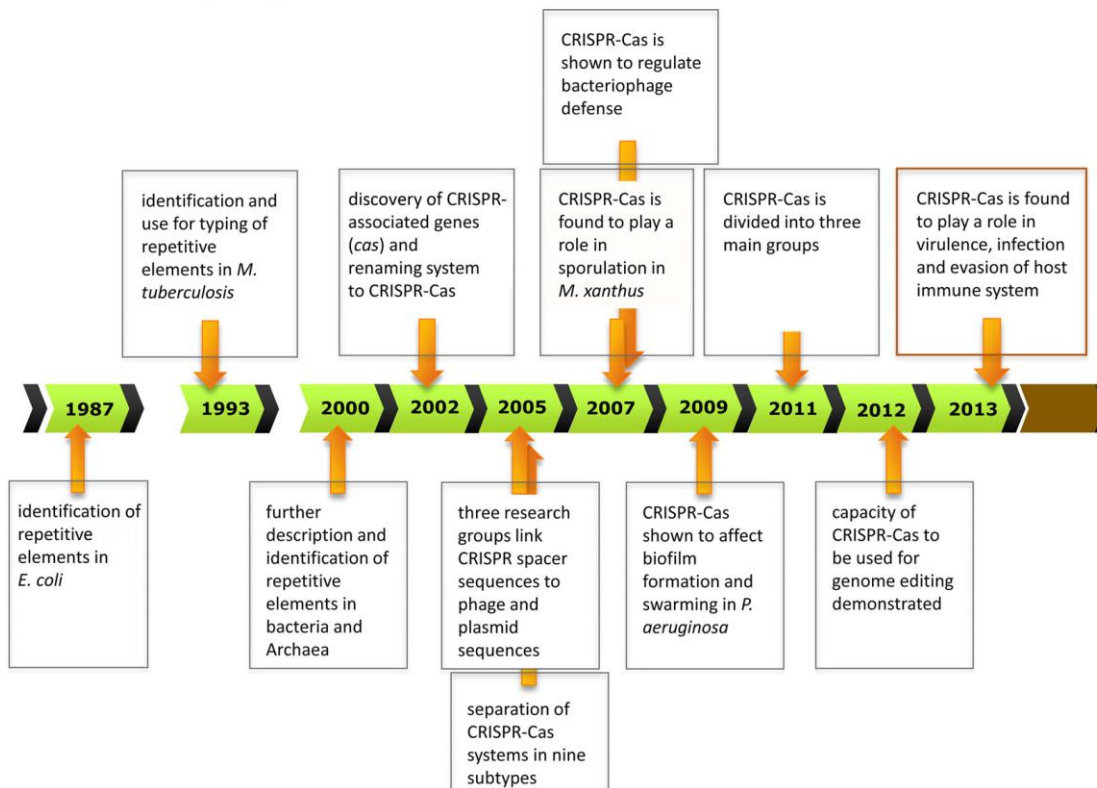
CRISPR/Cas systems were detected in 38 of the 100 *P. aeruginosa* hospital strains. 29 CRISPR/Cas-positive strains were resistant to carbapenems, of which 14 produced VIM-type metal- β -lactamase. The majority of CRISPR/Cas-positive strains (n=19) had type I-F system, while type I-E and I-C systems were found in 8 and 9 strains, respectively. MLST standardization showed that CRISPR/Cas-positive strains belonged to different clones. I-F and I-E systems included 2 CRISPR arrays with different number of spacers per strain, I-C systems included only one CRISPR array with 20 spacers, which matching with *P. aeruginosa* chromosomal sequences as well as various mobile genetic elements. Therefore, in this study we observed the presence of type I-C, I-E and I-F CRISPR/Cas systems in different *P. aeruginosa* clones, while their presence did not appear to prevent the introduction of resistance genes, which are usually associated with mobile genetic elements.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 CRISPR/Cas συστήματα

Οι Ομαδοποιημένες Κανονικά Διασπαρμένες Βραχείες Παλινδρομικές Επαναλήψεις (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - CRISPR) καθώς και οι CRISPR-σχετιζόμενες (Cas) πρωτεΐνες αποτελούν ένα προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα που έχει βρεθεί σε βακτήρια, καθώς και σε αρχαία, και τα προστατεύει από εισβολή και πιθανή θανάτωσή τους από διάφορα κινητά γενετικά στοιχεία, όπως πλασμίδια και ιούς (Javed et al, 2018).

1.1.1 Ιστορική αναδρομή των CRISPR/Cas συστημάτων



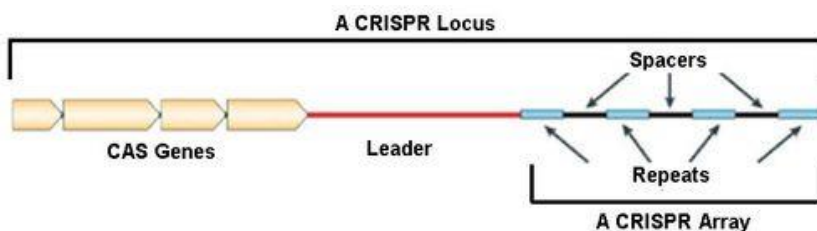
Εικόνα 1: Επισκόπηση των πιο σημαντικών ανακαλύψεων σε μελέτη των CRISPR/Cas συστημάτων. (Louwen et al, 2014)

Το σύστημα CRISPR/Cas πρωτοπεριγράφηκε το 1987, όταν βρέθηκε να εισάγεται μία 32-βάσεων αλληλουχία (spacer) μέσα σε μία 29-βάσεων επαναλαμβανόμενη αλληλουχία σε μία CRISPR περιοχή. Ο μικροοργανισμός τον οποίο μελετούσαν ήταν η *Escherichia coli* (*E.coli* K-12 chromosome) και είχε έρθει σε επαφή με DNA φάγο (Ishino et al, 1987). Σε μετέπειτα έρευνες,

βρέθηκε ότι τέτοιου τύπου επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες υπάρχουν κατά 90% σε αρχαία και κατά 40% σε βακτηριακά γονιδιώματα που έχουν αλληλουχηθεί, με άγνωστη ωστόσο, για εκείνη την εποχή, λειτουργία. Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις, αργότερα ανακαλύφθηκαν και CRISPR-συσχετιζόμενα γονίδια (Cas genes), που κωδικοποιούσαν ένζυμα επεξεργασίας νουκλεϊκών οξέων (Jansen et al, 2002), καθώς και άλλες δομές του μηχανισμού αυτού όπως το protospacer adjacent motif (PAM), το CRISPR RNA (crRNA) και το trans-activating crRNA (tracrRNA). Χρονιά ορόσημο για τον μηχανισμό CRISPR/Cas αποτελεί το 2005, όπου και ανακαλύφθηκε ότι οι αλληλουχίες των διαχωριστών προέρχονται από DNA αλληλουχίες πλασμιδίων ή ιών (Bolotin et al, 2005). Μέχρι τις αρχές του 2000 οι επιστήμονες πίστευαν ότι στους προκαρυώτες υπάρχουν μόνο έμφυτα ανοσοποιητικά συστήματα (π.χ. εξωνουκλεάσες) και όχι προσαρμοστική ανοσία. Το 2007 αποδείχθηκε για πρώτη φορά ότι οι CRISPR/Cas περιοχές αποτελούν ένα προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα εναντίον διαφόρων γενετικών στοιχείων. Βρήκαν δηλαδή, ότι τα βακτήρια ενσωματώνουν νέους διαχωριστές που προέρχονται από γονιδιωματικές αλληλουχίες φάγων, ύστερα από εισβολή φάγου, και τα βακτήρια αυτά καταφέρνουν τελικά να επιβιώσουν (Deveau et al, 2008). Παρόλο που είχαν ανακαλυφθεί οι αλληλουχίες αυτές, ο μηχανισμός πίσω από το σύστημα CRISPR/Cas διατυπώθηκε το 2012, με τη συμβολή δύο ομάδων επιστημόνων (Jinek et al, 2012).

1.1.2 Δομή και λειτουργία των CRISPR/Cas συστημάτων

Οι συστοιχίες CRISPR (CRISPR arrays) απαρτίζονται από μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (direct repeats) 21 με 48 ζεύγη βάσεων (bp), τα οποία διαχωρίζονται από τις αλληλουχίες διαχωριστές (spacers), οι οποίες έχουν μήκος 26 με 72 ζεύγη βάσεων (bp), και ταυτίζονται με ετερόλογες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες οι οποίες κάποια στιγμή εισέβαλαν στον ξενιστή. Συνοδευτικά με τις αλληλουχίες CRISPR, παρατηρούνται και 4-10 εξαιρετικά συντηρημένα γονίδια που συσχετίζονται με αυτές, τα ονομαζόμενα Cas (CRISPR associated) γονίδια, που κωδικοποιούν, αντίστοιχα, τις Cas πρωτεΐνες. Οι Cas πρωτεΐνες προσφέρουν προσαρμοστική ανοσία στους προκαρυώτες, βασιζόμενη στις «ανοσολογικές μνήμες» που βρίσκονται αποθηκευμένες στις CRISPR συστοιχίες και πιο συγκεκριμένα στους διαχωριστές (Εικόνα 2) (Wang et al, 2020).

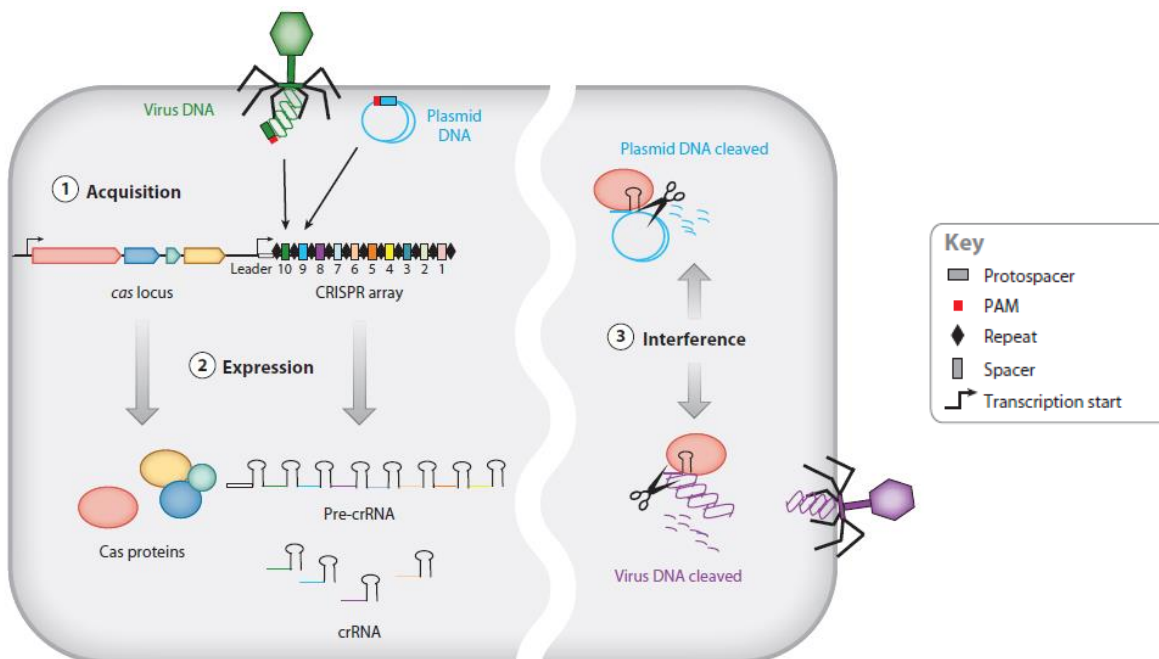


Εικόνα 2: CRISPR τόπος (Sorek et al, 2008)

Το σύστημα CRISPR/Cas ενσωματώνει ένα μικρό κομμάτι ξένου DNA, που προέρχεται από «μόρια εισβολείς», όπως πλασμίδιο και ιό, μεταξύ των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Αυτό το κομμάτι που ενσωματώθηκε στη συνέχεια θα αναγνωρίσει και θα καταστρέψει τα ίδια

εξωτερικά γενετικά στοιχεία, κατά τη διάρκεια μίας μελλοντικής εισβολής (Wang et al, 2020). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχουν και κάποιοι παράγοντες, όπως η γλυκόζη, ο σίδηρος κ.α. που μπορούν να ενισχύσουν ή να αποδυναμώσουν τη δράση του CRISPR/Cas συστήματος (Shivram et al, 2021).

Πιο συγκεκριμένα, το σύστημα CRISPR/Cas δημιουργεί την επιθυμητή ανοσία στον μικροοργανισμό έναντι των εισερχόμενων ξένων γενετικών στοιχείων, μέσα από μία διαδικασία που χωρίζεται σε 3 στάδια: προσαρμογή, έκφραση/ωρίμανση και αλληλεπίδραση (Εικόνα 3).

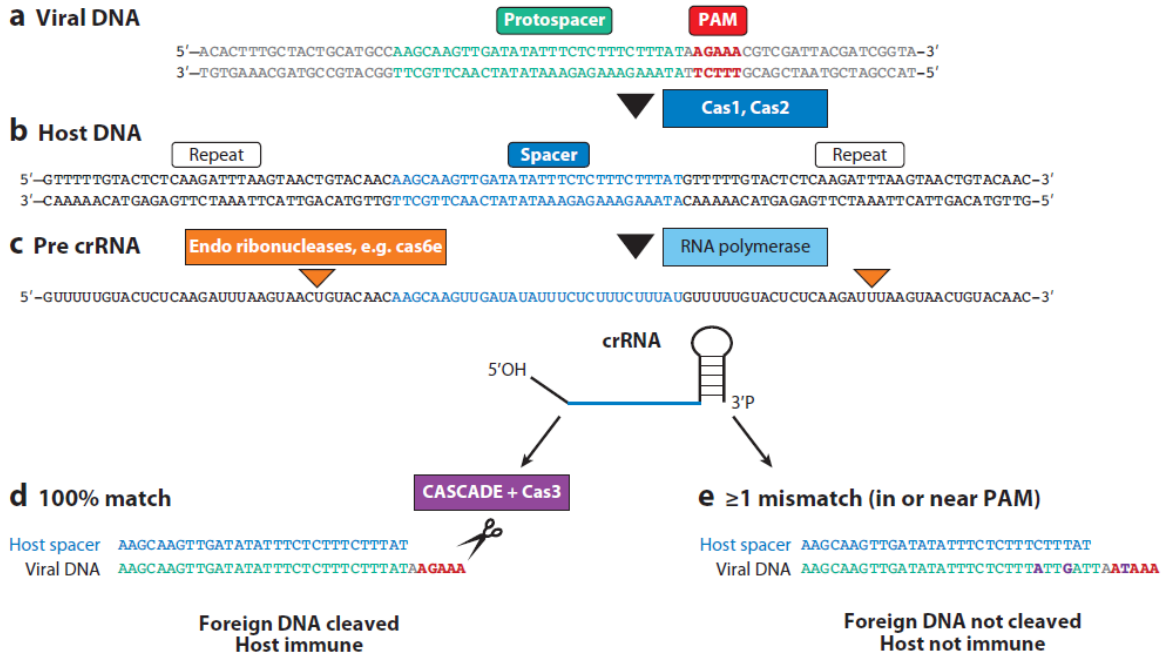


Εικόνα 3: Στάδια της CRISPR/Cas ανοσίας: προσαρμογή, έκφραση/ωρίμανση και παρεμβολή. (Bhaya et al, 2012)

- 1) Το στάδιο της προσαρμογής περιλαμβάνει την ταυτοποίηση και εξαγωγή του πρωτοδιαχωριστή (protospacer) του εισερχόμενου DNA/RNA, ικής ή πλασμιδιακής προέλευσης, και στη συνέχεια την ενσωμάτωσή του στη συστοιχία CRISPR. Και οι δύο αυτές λειτουργίες εκτελούνται από το σύμπλοκο Cas1-Cas2 πρωτεϊνών. Η ταυτοποίηση του πρωτοδιαχωριστή ξεκινά με την αναγνώριση των παρακείμενων μοτίβων πρωτοδιαχωριστών (protospacer adjacent motifs - PAMs) από το σύμπλοκο Cas1-Cas2. Στη συνέχεια, ο διαχωριστής ενσωματώνεται στη συστοιχία CRISPR και παράλληλα η διατηρημένη επαναλαμβανόμενη αλληλουχία αντιγράφεται. Η αλληλουχία PAM δεν ενσωματώνεται στη συστοιχία και αποτελεί ένα από τα πρώτα μοτίβα αναγνώρισης που χρησιμοποιούνται για την εύρεση νουκλεϊκών οξέων-στόχων για αποικοδόμηση σε μετέπειτα νέα εισβολή.
- 2) Στο στάδιο της έκφρασης/ωρίμανσης, η συστοιχία CRISPR μεταγράφεται σε ένα μακρύ pre-CRISPR RNA μόριο (pre-crRNA). Το pre-crRNA υποβάλλεται σε επεξεργασία και

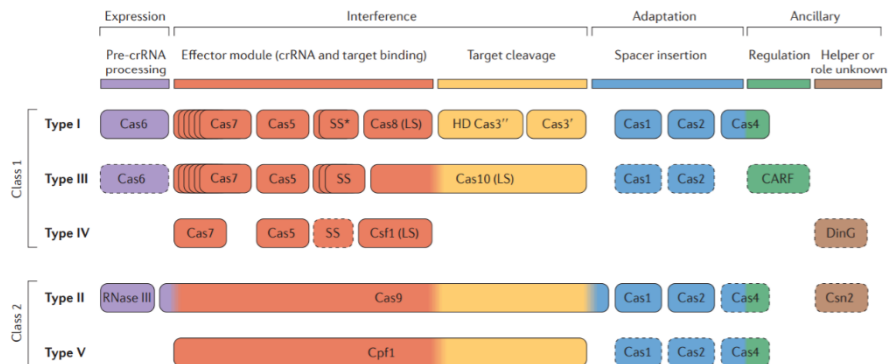
προκύπτουν μικρότερα μόρια crRNAs όπου το καθένα περιέχει ένα διαχωριστή και ένα μέρος της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας.

- 3) Τέλος, στο στάδιο της αλληλεπίδρασης παρατηρείται δημιουργία ενός συμπλόκου μεταξύ crRNA και πρωτεΐνης τελεστή, σχηματίζοντας μια λειτουργική RNA-καθοδηγούμενη ενδονουκλεάση. Αυτή η ενδονουκλεάση καθοδηγείται από το crRNA, το οποίο μετά την αναγνώριση του PAM υβριδίζεται με το DNA στόχο μέσω της αλληλουχίας του διαχωριστή και τελικά κόβει το DNA στόχο (Εικόνα 4) (Bijoya et al, 2019).



Εικόνα 4: Σύνοψη του μηχανισμού του CRISPR-Cas συστήματος. (Bhaya et al, 2012)

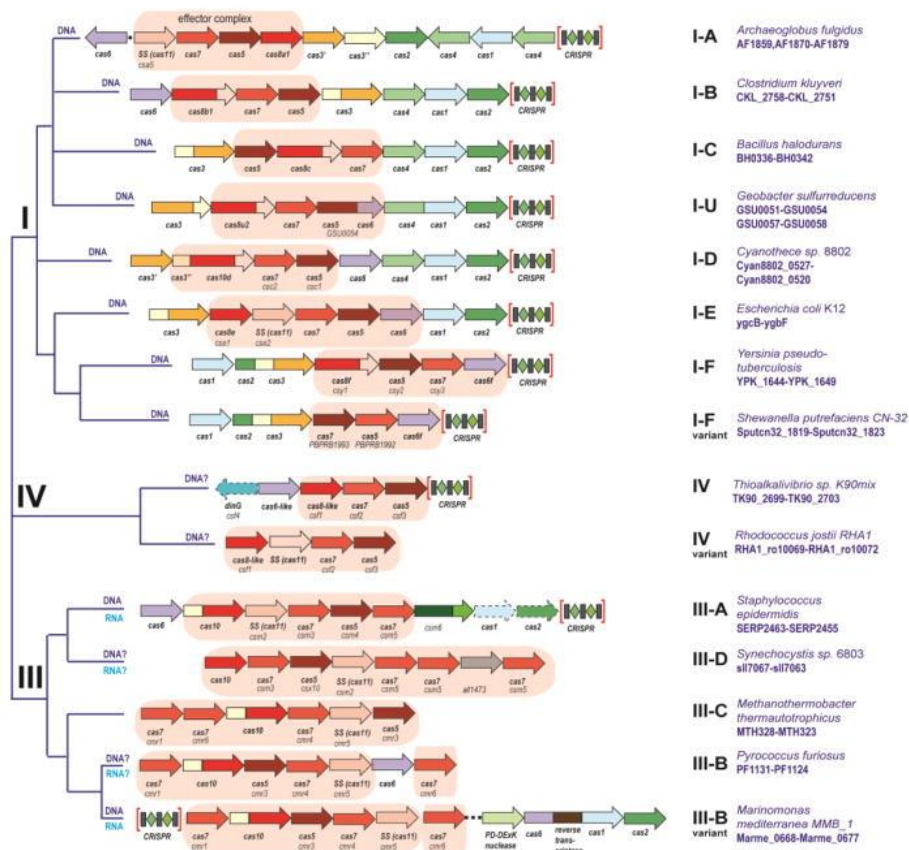
1.1.3 Ταξινόμηση των CRISPR/Cas συστημάτων



Εικόνα 5: Ταξινόμηση των πρωτεϊνών Cas βάσει της λειτουργίας τους

Οι CRISPR-Cas γονιδιωματικές περιοχές εμφανίζουν μεγάλη πολυπλοκότητα και ποικιλομορφία. Η ταξινόμηση των CRISPR-Cas παραλλαγών θα μπορούσε να αποτυπώσει τυχόν εξελικτικές σχέσεις μέσω σύγκρισης του γονιδιωματικού και λειτουργικού χαρακτηρισμού. Τα CRISPR/Cas συστήματα κατηγοριοποιήθηκαν σε 2 τάξεις, 6 τύπους και 20 τουλάχιστον υπότυπους. Ο διαχωρισμός των CRISPR/Cas συστημάτων σε 2 τάξεις, έγινε λαμβάνοντας υπόψιν τη σύνθεση των τελεστών των CRISPR-ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων (crRNP complexes) (Εικόνα 5) (Koonin et al, 2017).

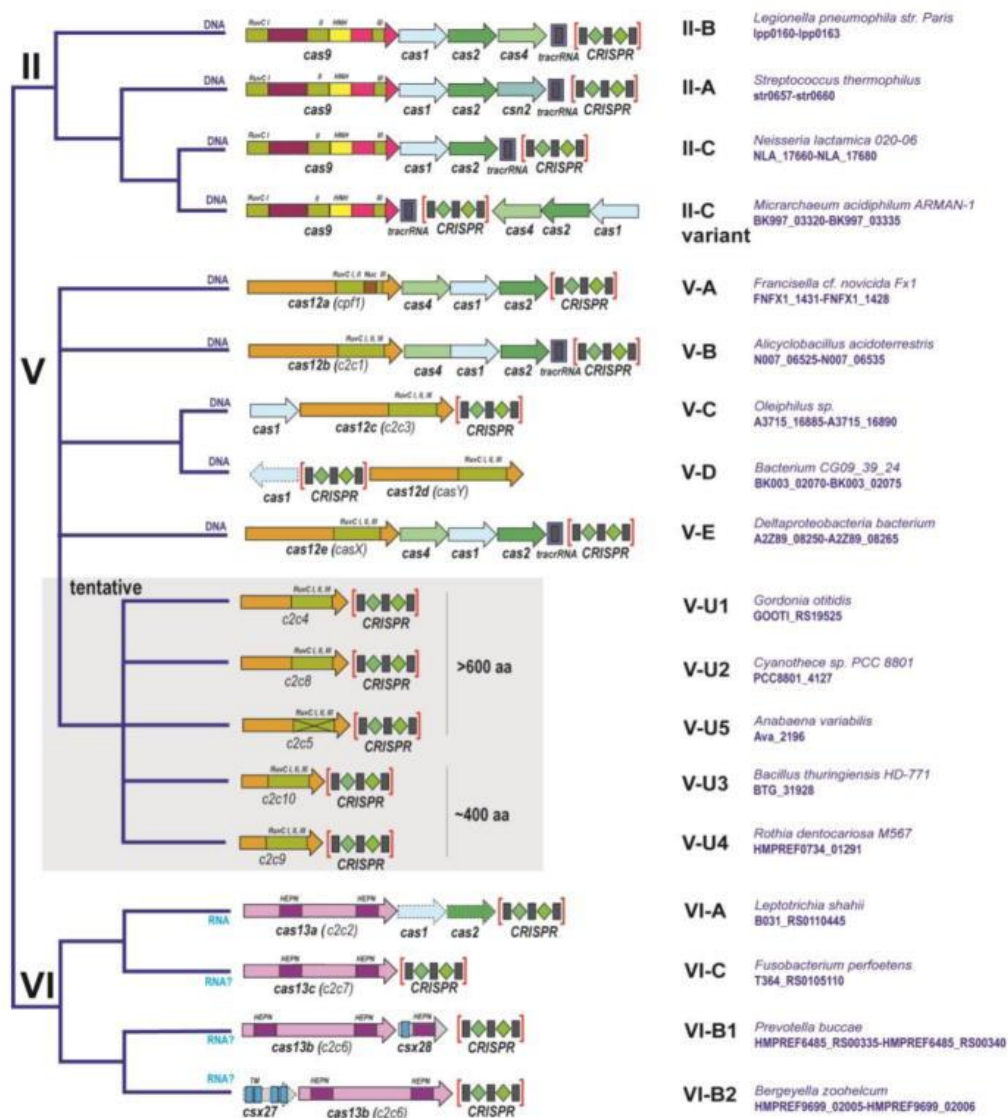
Στη Τάξη 1 ανήκουν crRNP σύμπλοκα πολλαπλών Cas πρωτεϊνών ως υπομονάδες (Εικόνα 6), με τους πιο κοινούς και διαφοροποιημένους τύπους I και III να παρατηρούνται περισσότερο σε αρχαία και λιγότερο σε βακτήρια. Ορισμένες Cas πρωτεΐνες είναι χαρακτηριστικές για ένα τύπο CRISPR/Cas συστήματος, όπως η πρωτεΐνη Cas3 για τον τύπο I (Makarova et al, 2015). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε ένα συγκεκριμένο είδος μικροοργανισμού μπορεί να βρεθούν CRISPR/Cas συστήματα τα οποία αν και είναι ίδια ως προς την τάξη και τον τύπο, ανήκουν σε διαφορετικό υπότυπο. Παράδειγμα αποτελεί η *P. aeruginosa* που, όπως αναφέρεται και παρακάτω (Ενότητα 1.3.1), έχουν βρεθεί στελέχη τα οποία έχουν διαφορετικά CRISPR/Cas συστήματα, τύπου I-C, I-E και I-F (Luz et al. 2019).



Εικόνα 6: Ανανεωμένη ταξινόμηση των CRISPR-Cas συστημάτων (Τάξη 1) (Koonin et al, 2017)

Από την άλλη, στη τάξη 2 ανήκουν crRNP σύμπλοκα αποτελούμενα από μία μεγάλη μονομερή Cas πρωτεΐνη, με αποτέλεσμα η οργάνωση των CRISPR/Cas τύπων να είναι πιο απλή

και ομοιόμορφη από αυτή της τάξης 1 (Εικόνα 7)(Koonin et al, 2017). Ο πιο γνωστός τύπος CRISPR/Cas συστήματος της τάξης 2 είναι ο τύπος II, ο οποίος φέρει μία πολλά υποσχόμενη σε μελλοντικές μελέτες πρωτεΐνη Cas9. Η Cas9 από μόνη της επαρκεί για crRNA καθοδηγούμενη διάσπαση του DNA στόχου, καθώς έχει αναφερθεί ότι εμπλέκεται και στη διαδικασία επιλογής του πρωτοδιαχωριστή κατά το στάδιο της προσαρμογής. Το τύπου II CRISPR/Cas σύστημα έχει βρεθεί σε μικροοργανισμούς, όπως τους *Campylobacter jejuni*, *Legionella pneumophila* και *Streptococcus pyogenes* (Makarova et al, 2015). Απομόνωση αυτού του μηχανισμού και ενσωμάτωσή του τόσο σε άλλους προκαρυώτες όσο και σε ευκαρυώτες μπορεί να συμβάλει σε εφαρμογές, όπως η γονιδιωματική επεξεργασία (genome editing). Για παράδειγμα, εφαρμογή του μηχανισμού αυτού μπορεί να υπάρξει για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας των βακτηρίων σε πληθώρα αντιβιοτικών, καταστρέφοντας τα αντίστοιχα γονίδια ανοχής που έχουν ενσωματώσει πολλά στελέχη βακτηρίων, και αποτελεί μείζον ζήτημα σήμερα στην ιατρική μικροβιολογία (Kim et al, 2016).



Εικόνα 7: Ανανεωμένη ταξινόμηση των CRISPR-Cas συστημάτων (Τάξη 2) (Koonin et al, 2017)

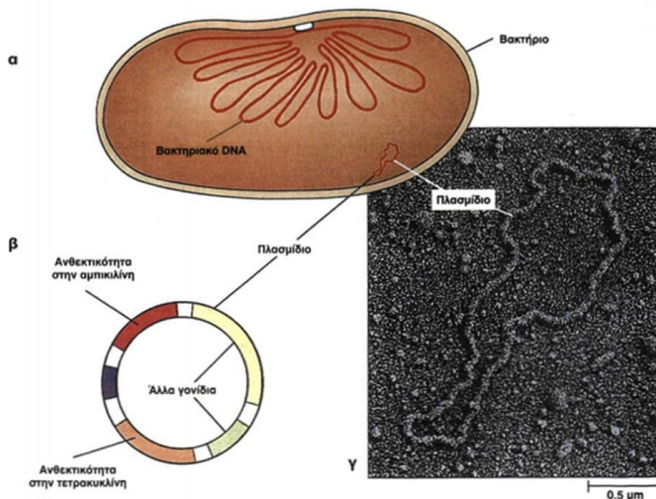
1.2 Κινητά Γενετικά Στοιχεία (Mobile Genetic Elements - MGEs)

1.2.1 Γενικές πληροφορίες

Κινητά γενετικά στοιχεία είναι ακολουθίες DNA οι οποίες μπορούν να μετακινηθούν από μία θέση σε άλλη ή από ένα μόριο DNA σε άλλο (“jumping genes”). Αυτά μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των γονιδιωμάτων. Τα κύρια κινητά γενετικά στοιχεία (Mobile Genetic Elements - MGEs) είναι τα πλασμίδια (plasmids), τα μεταθετόνια ή τρανσποζόνια (transposons) και τα ενσωματόνια ή ιντεγκρόνια (integrans) που φέρουν κασέτες (gene cassettes). Αυτοί οι τύποι στοιχείων αποτελούνται από δίκλωνο DNA, αλλά διαφέρουν ευδιάκριτα στο μέγεθος, τη δομή, τους τρόπους μεταφοράς καθώς επίσης και τις βιολογικές ιδιότητες (Frost et al, 2005).

Πλασμίδια: είναι ρεπλικόνια που διατηρούνται ως διακριτά, υπάρχουν στη φύση ως εξωχρωμοσωμικό γενετικό υλικό διαφόρων προκαρυωτικών και αντιγράφονται ανεξάρτητα από το χρωμόσωμα. Τα περισσότερα πλασμίδια είναι υπερελικομένα, κυκλικά, δίκλωνα μόρια DNA (υπάρχουν και αρκετά γραμμικά) και το μέγεθός τους κυμαίνεται από 5 kbp έως 2 Mbp. Επίσης, έντονο ενδιαφέρον μελέτης παρουσιάζει η ικανότητά τους να μεταφέρουν και να διασπείρουν νέα γονίδια, όπως γονίδια αντοχής έναντι των αντιβιοτικών.

Τα πλασμίδια μπορούν να κατηγοριοποιηθούν βάσει της δυνατότητας μεταφοράς τους σε συζευκτικά (> 30 kb) και μη-συζευκτικά πλασμίδια (< 10 kb). Τα συζευκτικά πλασμίδια φέρουν γονίδια που σχετίζονται με τον αυτόνομο πολλαπλασιασμό τους, τον αριθμό των αντιγράφων τους μέσα σε ένα κύτταρο, εξασφαλίζουν τη σταθερότητα τους κατά την κυτταρική διαίρεση καθώς και τους δίνουν τη δυνατότητα να μεταφέρονται μεταξύ βακτηρίων του ίδιου ή και διαφορετικού γένους, μέσω σύζευξης (Ενότητα 1.2.2). Αντίθετα, τα μη-συζευκτικά πλασμίδια δεν φέρουν περιοχές που κωδικοποιούν γονίδια που σχετίζονται με τη μεταφορά του DNA από ένα κύτταρο σε άλλο (Summers 1996). Επομένως, τα μη-συζευκτικά πλασμίδια για να μετακινηθούν απαιτούν τη συμβολή ενός συζευκτικού πλασμιδίου, που πιθανότατα υπάρχει μέσα στο ίδιο κύτταρο.

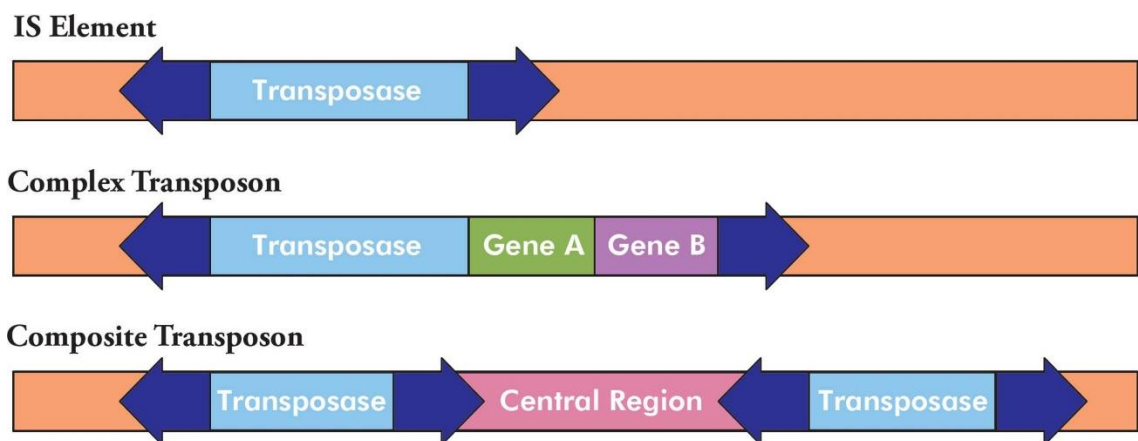


Εικόνα 8: Δομή πλασμιδίου και απεικόνιση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Madigan et al, 2018)

Μεταθετόνια ή Τρανσποζόνια: είναι αλληλουχίες γραμμικού DNA, μήκους 2,5-23 Kb, οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να μετακινούνται με δικούς τους μηχανισμούς σε άλλες θέσεις στο χρωμοσωμικό DNA ή σε πλασμίδια ή να δρουν ως μεσολαβητές για τη μεταφορά άλλων DNA αλληλουχιών. Τα τρανσποζόνια αποτελούνται από ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame-ORF) που κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη, την τρανσποζάση (μεταθετάση), υπεύθυνη για τη διαδικασία της μεταφοράς. Στα άκρα των μεταθετών στοιχείων υπάρχουν πανομοιότυπες, ανεστραμμένες επαναλήψεις (IR), καθώς σε αυτές θα συνδεθεί η τρανσποζάση (**Makatowski et al, 2019**). Τα μεταθετά στοιχεία μπορούν να χωριστούν σε 2 κατηγορίες :

α) αλληλουχίες εισδοχής (ISs). Έχουν μήκος 1-2 kb και αποτελούνται από τις τερματικές IRs περιοχές και ένα ORF, που κωδικοποιεί μόνο τη λειτουργία της μεταφοράς (**Mahillon et al, 1998**).

β) τρανσποζόνια. Με τον όρο αυτό περιγράφονται είτε τα σύνθετα μεταθετά στοιχεία (composite transposons) είτε τα πολύπλοκα μεταθετά στοιχεία (complex transposons). Τα σύνθετα μεταθετά στοιχεία αποτελούνται από 2 αλληλουχίες εισδοχής που αφορίζουν ένα τμήμα DNA που συχνά περιέχει γονίδιο ανοτοχής για κάποιο αντιβιοτικό. Οι αλληλουχίες εισδοχής παρέχουν την τρανσποζάση για τον μηχανισμό της DNA μετάθεσης, ενώ οι IRs των αλληλουχιών εισδοχής ορίζουν τα άκρα του σύνθετου μεταθετού στοιχείου. Όταν, ένα IS στοιχείο γίνεται μέρος ενός σύνθετου τρανσποζονίου, το IS στοιχείο δεν χάνει την ικανότητά του να λειτουργεί ανεξάρτητα (**Tansirichaiya et al, 2016**). Τα πολύπλοκα μεταθετά στοιχεία, με τη σειρά τους, περιγράφονται ως τρανσποζόνια που δεν ανήκουν στην κατηγορία των σύνθετων μεταθετών στοιχείων, καθώς στερούνται πρότυπης δομής και παρουσιάζουν πιο πολύπλοκη γενετική δομή. Τα πολύπλοκα τρανσποζόνια περικλείονται από βραχείες IRs αλληλουχίες, μήκους 15-40 bp, ανάλογα με το τρανσποζόνιο. Τα IRs δηλαδή περικλείουν γονίδια που κωδικοποιούν λειτουργίες απαραίτητες για τη μετάθεση, καθώς και γονίδια ανοτοχής σε αντιβιοτικά. Η μετάθεση πραγματοποιείται με τη μετακίνηση ολόκληρου του πολύπλοκου τρανσποζονίου και δεν μπορεί να μετακινηθεί κανένα τμήμα του ανεξάρτητα (Εικόνα 9) (**Babakhani et al, 2018**).



Εικόνα 9: Είδη Τρανσποζονίων (**SEM microbiologia 2018**)

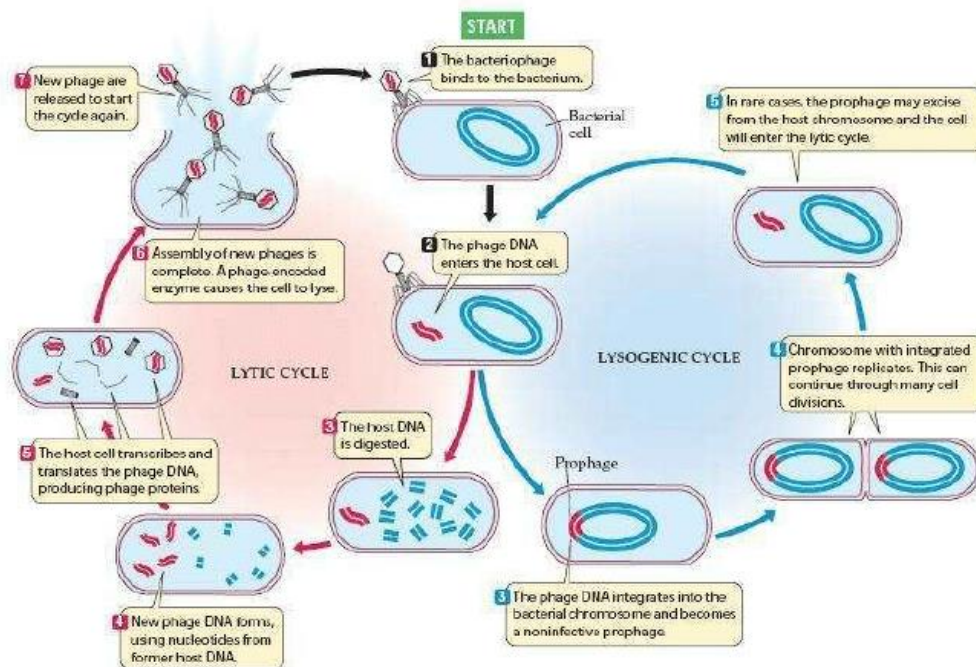
1.2.2 Οριζόντια μεταφορά γονιδίων – Μηχανισμοί

Ως οριζόντια μεταφορά ορίζεται η άμεση μεταφορά γονιδίων από ένα είδος στα αναπαραγωγικά κύτταρα ενός άλλου είδους. Για τα βακτήρια, η οριζόντια μεταφορά αποτελεί τον κυρίαρχο τρόπο προσαρμογής τους σε διάφορες καταστάσεις, όπως περιβαλλοντικές συνθήκες, συνεισφέροντας σημαντικά στην εξέλιξη και την αλλαγή του γονιδιώματος.

Στα βακτήρια παρατηρήθηκαν τρεις μηχανισμοί οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων:

Σύζευξη (Conjugation): πρόκειται για ένα μηχανισμό που κωδικοποιείται από πλασμίδιο, μέσω του οποίου μπορεί να γίνει μεταφορά DNA μεταξύ μη συγγενικών κυττάρων, ακόμη και μεταξύ διαφορετικών γενών. Για να πραγματοποιηθεί η σύζευξη απαιτείται άμεση επαφή των κυττάρων. Τα συζευκτικά πλασμίδια χρησιμοποιούν τούτο τον μηχανισμό για να μεταφέρουν σε νέα κύτταρα-ξενιστές αντίγραφα τους. Η διαδικασία της σύζευξης προϋποθέτει την ύπαρξη ενός κυττάρου-δότη, το οποίο περιέχει το συζευκτικό πλασμίδιο, και ενός κυττάρου-δέκτη, που δεν φέρει τέτοιο πλασμίδιο. Επιπλέον, γενετικά στοιχεία, όπως άλλα πλασμίδια που δεν είναι ικανά να μεταφέρουν τον εαυτό τους, μπορούν ορισμένες φορές να μεταφερθούν κατά τη σύζευξη (Madigan et al, 2018).

Μεταγωγή (Transduction): μία διαδικασία μεταφοράς γονιδίων από ένα βακτήριο-δότη σε ένα βακτήριο-δέκτη με τη συμβολή βακτηριοφάγων.

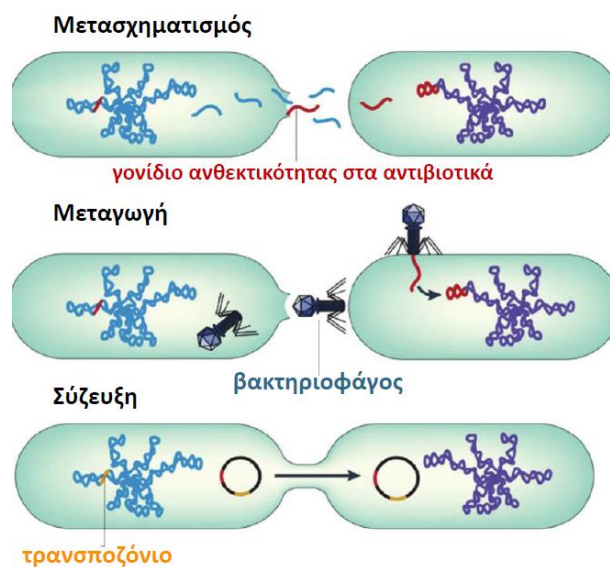


Εικόνα 10: Αντιγραφή φάγου – Λυτικός και Λυσιγονικός κύκλος (Aman et al, 2011)

Φάγοι (ή Βακτηριοφάγοι) είναι ιοί των βακτηρίων, ως γενετικό υλικό μπορεί να φέρουν διπλή έλικα DNA (dsDNA), μονή έλικα DNA (ssDNA) ή RNA και μπορούν να επιβιώνουν εξωκυττάρια διότι προστατεύονται από πρωτεϊνικό περίβλημα. Μολύνουν τα βακτήρια και είτε πολλαπλασιάζονται ενδοκυττάρια και απελευθερώνονται προξενώντας λύση του κυττάρου (λυτικός κύκλος), είτε το γονιδίωμα τους ενσωματώνεται στο χρωμόσωμα του βακτηρίου και

μεταβιβάζεται στα θυγατρικά του κύτταρα (λυσιγονικό στάδιο) (Εικόνα 10). Επιπλέον, ένας βακτηριοφάγος μπορεί να μεσολαβήσει στη μεταφορά ενός βακτηριακού γονιδίου ή ενός μέρους του βακτηριακού γονιδίου από το ένα κύτταρο στο άλλο, μέσω της διαδικασίας της μεταγωγής (Ενότητα 1.2.2) (Clokie et al, 2011).

Μετασηματισμός (Transformation): αποτελεί μία μορφή γενετικού ανασυδασμού κατά τον οποίο ένα τμήμα DNA, από ένα νεκρό, αποδομημένο βακτήριο εισέρχεται σε ένα δεκτικό βακτήριο δέκτη. Το νεοεισαχθέν τμήμα DNA ή θα ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του βακτηρίου ή θα καταστραφεί. Δεν είναι όλα τα βακτήρια δεκτικά στη πρόληψη γυμνού DNA (Εικόνα 11) (Madigan et al, 2018).



Εικόνα 11: Μηχανισμοί οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων.

1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Η *Pseudomonas* αποτελεί τον βασικότερο εκπρόσωπο των αζυμωτικών βακτηρίων και απομονώθηκε από τον Gessard, το 1882. Έως σήμερα, έχουν διαχωριστεί και ταυτοποιηθεί περισσότερα από 160 είδη ψευδομονάδων, αλλά ορισμένα από αυτά (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. alcaligenes* και *P. pseudoalcaligenes*) ενδιαφέρουν τη Κλινική Μικροβιολογία ως αποικιστές του ανθρώπινου σώματος, ως καθαροί παθογόνοι παράγοντες ή ως συμπαράγοντες νόσων (Κουμεντάκου 1974). Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι ένα είδος βακτηρίου, προαιρετικά αερόβιο, που εντοπίζεται συχνά στο περιβάλλον και, πιο συγκεκριμένα, αποτελεί την πιο συχνή αιτία μολύνσεων στο αίμα, στους πνεύμονες αλλά και σε διάφορα μέρη του σώματος μετά από χειρουργική επέμβαση. Το βακτήριο αυτό εμφανίζει ενδογενή ανθεκτικότητα σε πληθώρα αντιβιοτικών και γι' αυτό συσχετίζεται και με σοβαρές ασθένειες (CDC government, 2019). Η *P. aeruginosa* καταστρέφεται στην θερμοκρασία των 55°C σε μία ώρα. Αντέχει και ζει στο νερό για πολλούς μήνες. Διατηρείται και πολλαπλασιάζεται στις μικρές υγρές συλλογές και στις υγρές επιφάνειες, στα διάφορα θεραπευτικά υγρά, ακόμη και στα διαλύματα των περισσότερων αντισηπτικών ουσιών. Διατηρείται στη θερμοκρασία του κοινού ψυγείου (Αρσένη 1994).

Χαρακτηριστικές ιδιότητες του *P. aeruginosa* είναι οι εξής:

1. παράγει οξειδάση
2. παράγει καταλάση
3. δεν ζυμώνει τη γλυκόζη
4. δεν παράγει H₂S
5. δεν διασπά τη λακτόζη
6. διασπά, χωρίς να παράγει κάποιο αέριο και μέσω οξείδωσης, τη γλυκόζη
7. διασπά το γλυκονικό κάλιο μέσω οξείδωσης
8. το 96-98% των στελεχών υδρολύει την αργινίνη

Η λέξη *Pseudomonas* αποτελεί μία σύνθετη λέξη (*pseudēs* + *monas*) με ελληνική ρίζα (ψευδής + μονάς[μονάδα]) ενώ η λέξη *aeruginosa* έχει λατινική προέλευση και σημαίνει «σκουριά χαλκού», αναφερόμενη στο χρώμα των βακτηρίων αυτών σε καλλιέργεια (**Hendry 2012**). Το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* φέρει επίσης τις ονομασίες «βακτήριο του κυανού» και «ψευδομονάς η πυοκυανική» και αυτό γιατί το χρώμα των αποικιών οφείλεται στη συνδυαστική παραγωγή των χρωστικών πυοκυανίνη (pyocyanine) και πυοβερδίνη (pyoverdine) (**Brown 1956**).



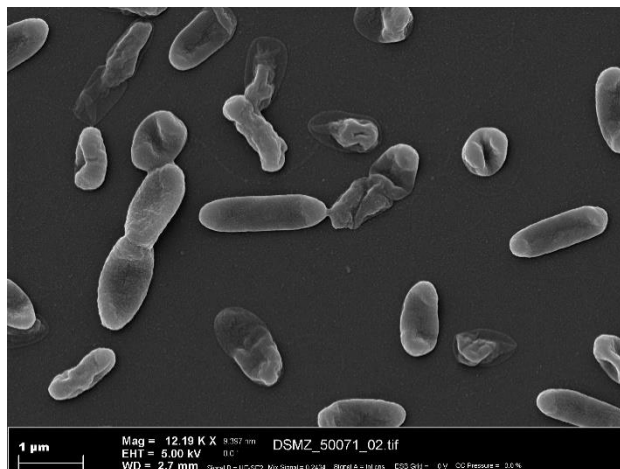
Εικόνα 12: Αποικίες *Pseudomonas aeruginosa* σε θρεπτικό άγαρ MacConkey

Επιστημονική ταξινόμηση <i>P. aeruginosa</i>	
Βασίλειο	<i>Bacteria</i>
Φύλο	<i>Proteobacteria</i>
Κατηγορία	<i>Gamma</i> proteobacteria
Τάξη	<i>Pseudomonadales</i>
Οικογένεια	<i>Pseudomonadaceae</i>
Γένος	<i>Pseudomonas</i>
Είδος	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Συνώνυμο	<i>Bacterium aeruginosum</i>

Πίνακας 1: Η επιστημονική ταξινόμηση της *P. aeruginosa* (**NCBI taxonomy, 2017**)

Όσο αφορά τη μορφολογία, οι *P. aeruginosa* είναι κινητά Gram-αρνητικά βακτηρίδια, με σώμα ραβδοειδές ελαφρώς κεκαμμένο, μήκους 0,2-0,6μm, διατεταγμένα είτε το καθένα

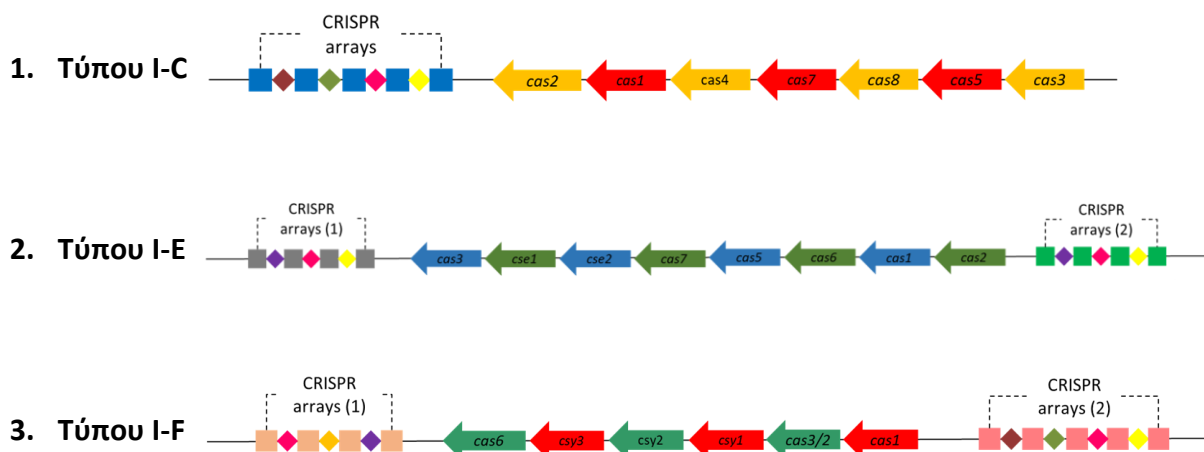
χωριστά είτε σε ζεύγη. Μπορούν και κινούνται χρησιμοποιώντας τις πολικές βλεφαρίδες που φέρουν (Παπαπαναγιώτου 2001). Το γονιδίωμα της *P.aeruginosa* έχει μήκος 5,5–7 Mbp (εκ του οποίου το 65-67% είναι G-C) και αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα καθώς και μία ποικιλία σε πλασμίδια (Remier et al, 2019).



Εικόνα 13: *Pseudomonas aeruginosa* – εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Remier et al, 2019)

Το βακτήριο αυτό μπορεί να καλλιεργηθεί σε διάφορα θρεπτικά μέσα όπως σε MacConkey agar, Mueller-Hinton (MH) agar και Αιματούχο (Blood) agar. Το εύρος της θερμοκρασίας που παρατηρείται ανάπτυξη της καλλιέργειας είναι 7°C (minimum) - 44°C (maximum), με ιδανική τους 37°C, ενώ το εύρος του pH είναι 5-9 (Remier et al, 2019).

1.3.1 *Pseudomonas aeruginosa* και CRISPR/Cas συστήματα

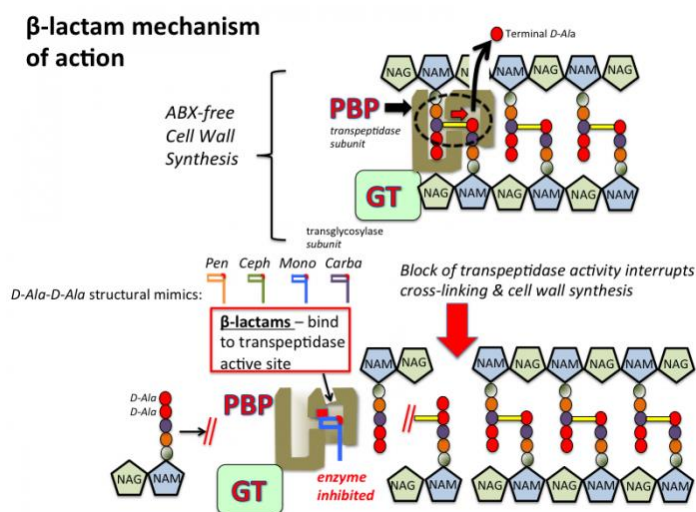


Εικόνα 14: CRISPR/Cas συστήματα στην *P. aeruginosa*

Έως σήμερα έχουν βρεθεί και ταξινομηθεί πολλά διαφορετικά CRISPR/Cas συστήματα όπως ήδη έχει αναφερθεί. Πιο συγκεκριμένα, στη *P. aeruginosa* έχουν βρεθεί τρία διαφορετικά CRISPR/Cas συστήματα τα οποία είναι: τύπου I-C, τύπου I-E και τύπου I-F (Luz et al. 2019).

1.3.2 *Pseudomonas aeruginosa* και αντοχή στα αντιβιοτικά

Για την αντιμετώπιση παθογόνων βακτηρίων, όπως τα *P. aeruginosa*, γίνεται εδώ και πάρα πολλά χρόνια η χρήση αντιβιοτικών. Ωστόσο, η θεραπεία των μολύνσεων από αυτό το βακτήριο σήμερα αποτελεί μία μεγάλη πρόκληση λόγω της ικανότητάς του να αντιστέκεται σε πληθώρα αντιβιοτικών που είναι διαθέσιμα σήμερα στην αγορά, όπως τα β-λακταμικά αντιβιοτικά.

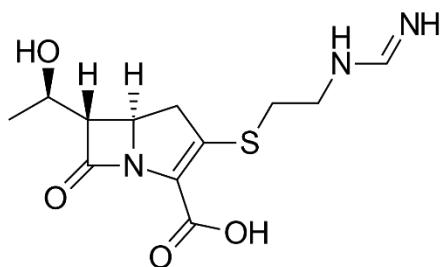


Εικόνα 15: Μηχανισμός δράσης των β-λακταμικών αντιβιοτικών (Zango et al. 2019)

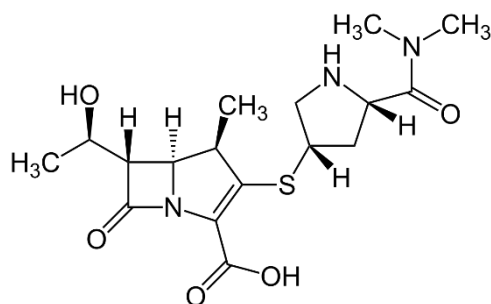
Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά φέρουν ένα δακτύλιο β-λακτάμης που περιέχει άζωτο και στόχο έχουν να εμποδίσουν τη δράση των πενικιλινοδοδεσμευτικών πρωτεϊνών (Penicillin Binding proteins-PBPs). Οι PBPs σχετίζονται με τη σύνθεση των πεπτιδογλυκάνων και πιο συγκεκριμένα δρουν ως τρανσπεπτιδάσες και καταλύουν την τρανσπεπτιδίωση της πεπτιδογλυκάνης. Έτσι, λοιπόν, τα β-λακταμικά αντιβιοτικά οδηγούν σε θανάτωση τα βακτήρια καθώς καταφέρνουν τελικά τη λύση τους (Εικόνα 15). Συνολικά, τα β-λακταμικά αντιβιοτικά αντιπροσωπεύουν πάνω από το 50% του συνόλου των αντιβιοτικών που παράγονται και χρησιμοποιούνται παγκοσμίως (Zango et al. 2019).

Δύο γνωστές ομάδες β-λακταμικών αντιβιοτικών στα οποία εμφανίζονται όλο και περισσότερα ανθεκτικά στελέχη *P. aeruginosa* είναι οι κεφαλοσπορίνες και οι καρβαπενέμες. Οι καρβαπενέμες κατέχουν το ευρύτερο φάσμα αντιμικροβιακής δράσης μεταξύ των β-λακταμικών αντιβιοτικών. Σε αντίθεση με άλλα β-λακταμικά αντιβιοτικά, οι καρβαπενέμες, ιμιπενέμη (Imipenem) και μεροπενέμη (Meropenem), εμποδίζουν τη δράση των PBP-2 και PBP-1 ή PBP-2 και PBP-3 με αποτέλεσμα την ταχεία λύση του βακτηριακού κυττάρου (Zhanel et al. 2007). Οι κεφαλοσπορίνες με τη σειρά τους είναι κι αυτές βακτηριοκτόνα αντιβιοτικά και

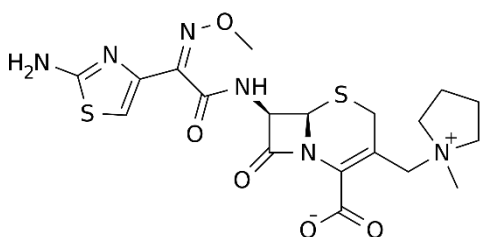
παράγονται από το μύκητα *Cephalosporium sp.* Δρουν κι αυτές δεσμευόμενες μη αντιστρεπτά στις RBPs και παρεμποδίζουν τη διασύνδεση της πεπτιδογλυκάνης. Οι κεφαλοσπορίνες είναι κατά κανόνα πιο ανθεκτικές στις β-λακταμάσες, τα ένζυμα που καταστρέφουν τους δακτυλίους β-λακτάμης. Τα αντιβιοτικά αυτής της κατηγορίας κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις γενιές. Η κεφταζιδίμη (Ceftazidime-3^{ης} γενιάς) και η κεφεπίμη (Cefepime-4^{ης} γενιάς) αποτελούν από τα πιο πολυχρησιμοποιημένα αντιβιοτικά για την αντιμετώπιση λοιμώξεων των κεφαλοσπορινών (Madigan et al. 2018).



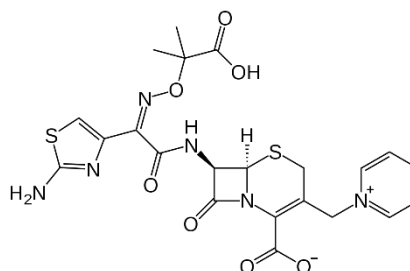
Εικόνα 16: Ιμιπενέμη



Εικόνα 17: Μεροπενέμη



Εικόνα 18: Κεφεπίμη

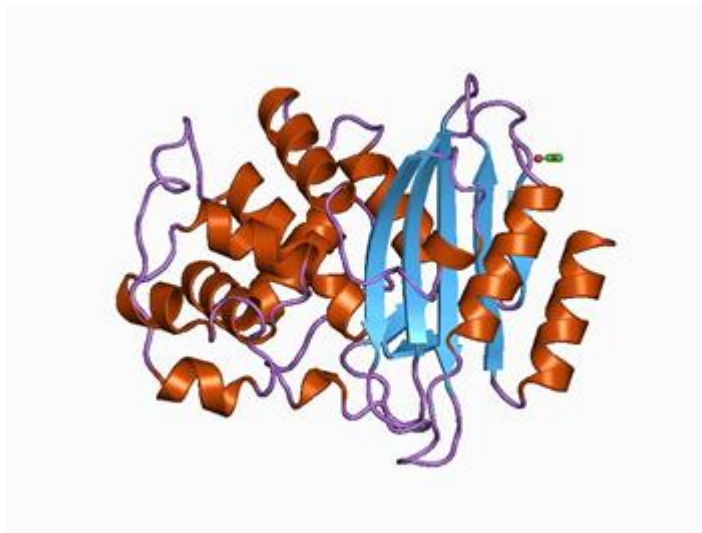


Εικόνα 19: Κεφταζιδίμη

1.4 β-λακταμάσες

Η βιοσύνθεση των β-λακταμασών είναι ο κύριος μηχανισμός των Gram-αρνητικών βακτηρίων, κατά των β-λακταμικών αντιβιοτικών. Περισσότερες από 800 β-λακταμάσες έχουν ταυτοποιηθεί σε Gram-αρνητικά βακτήρια (Zhao et al, 2010). Με βάση την αμινοξική αλληλουχία, οι β-λακταμάσες χωρίζονται σε 4 τάξεις, A-D. Οι β-λακταμάσες της κλάσης B φέρουν ιόντα ψευδαργύρου στο ενεργό κέντρο τους και γι' αυτό λέγονται αλλιώς και ως μέταλλο-β-λακταμάσες (MBLs). Οι μέταλλο-β-λακταμάσες είναι μία ραγδαία εξελισσόμενη ομάδα των β-λακταμασών που υδρολύει τα περισσότερα β-λακταμικά αντιβιοτικά, όπως τις καρβαπενέμες (Walsh et al, 2005). Οι μέταλλο-β-λακταμάσες με τη σειρά τους χωρίζονται σε 8 οικογένειες: IMPs, VIMs, SPM-1, GIM-1, AIM-1, SIM-1, NDM-1 και DIM-1, με τις 2 πρώτες να παρατηρούνται πιο συχνά στα Gram-αρνητικά βακτήρια. Η ραγδαία αύξηση της επικράτησης των MBLs, έχει οδηγήσει τους επιστήμονες να ερευνούν τρόπους προκειμένου να

αντιμετωπίσουν την ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα β-λακταμικά αντιβιοτικά (Zhao et al, 2011).



Εικόνα 20: Δομή της β-λακταμάσης

2 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η εξέταση διαφόρων πειραματικών πρωτοκόλλων για τη διερεύνηση της διασποράς των CRISPR/Cas συστημάτων σε κλινικά στελέχη του μικροοργανισμού *Pseudomonas aeruginosa* αλλά και η βιοπληροφορική ανάλυση των διαχωριστών (spacers) των οποίων θα βρίσκαμε. Η ανάλυση αυτή θα μας βοηθούσε να μελετήσουμε το ιστορικό των γενετικών στοιχείων με τα οποία έχει έρθει σε επαφή (ή θα αλληλοεπιδράσουν σε μία «νέα εισβολή») και πιθανή αξιοποίηση της πληροφορίας αυτής σε μετέπειτα μελέτες. Κίνητρο για την πραγματοποίηση αυτής της μελέτης υπήρξε το γεγονός ότι τα CRISPR/Cas συστήματα στα βακτήρια έχει βρεθεί ότι λειτουργούν ως μηχανισμοί άμυνας έναντι διαφόρων κινητών γενετικών στοιχείων, καθώς και η ελλιπής γνώση που υπάρχει σχετικά με τη δράση αυτών των συστημάτων.

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Λήψη δειγμάτων από ασθενείς

Σε συνεργασία με το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας συλλέξαμε 100 διαφορετικά κλινικά δείγματα από ασθενείς (Πίνακας 2) διαφόρων κλινικών, τη χρονική περίοδο 2019-2020.

Αριθμός δειγμάτων	Προέλευση δειγμάτων
29 (29%)	Αίμα
18 (18%)	Ούρα
1 (1%)	Πλευριτικό υγρό
13 (13%)	Πτύελο
11 (11%)	Πύον
4 (4%)	Ιστός
5 (5%)	Ωτικό έκκριμα
1 (5%)	Υγρό (νευροχειρουργική)
2 (2%)	Τραύμα
1 (1%)	Καθετήρας
8 (8%)	Βρογχικές εκκρίσεις
1 (1%)	Δείγμα επιφανειών
1 (1%)	Φαρυγγικό
2 (2%)	Τραχειοσωλήνας
1 (1%)	K.F.G.
1 (1%)	Οφθαλμικό έκκριμα
1 (1%)	Υγρό παροχέτευσης

Πίνακας 2: Διασπορά των στελεχών *P.aeruginosa* ανά είδος κλινικού δείγματος

3.2 Καλλιέργεια κλινικών δειγμάτων από τα οποία έγινε απομόνωση των στελεχών *P. aeruginosa*

Σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα και συγκεκριμένα σε MacConkey άγαρ, Mueller-Hinton (MH) άγαρ και Αιματούχο (Blood) άγαρ καλλιεργήσαμε τα παραπάνω κλινικά δείγματα. Μετά τον εμβολιασμό οι καλλιέργειες επώαστηκαν σε κλίβανο για 18-24h σε θερμοκρασία 37°C σε αερόβιες συνθήκες. Έπειτα, αφού παρατηρήσαμε την ύπαρξη ανάπτυξης αποικιών, όλα τα στελέχη συντηρήθηκαν σε θρεπτικό ζωμό (tryptic soy broth) με περιεκτικότητα 20% γλυκερόλης και διατηρήθηκαν σε βαθιά κατάψυξη στους -80°C.

3.3 Ταυτοποίηση των στελεχών και μελέτη της ευαισθησίας τους

Η ταυτοποίηση όλων των υπό μελέτη στελεχών τόσο σε επίπεδο είδους όσο και ο προσδιορισμός της ευαισθησίας τους έναντι διαφόρων αντιμικροβιακών παραγόντων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος VITEK 2 (BioMerieux, Inc). Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει μία εκτεταμένη βάση δεδομένων αναγνώρισης, όπου μία αυτοματοποιημένη πλατφόρμα επιτυγχάνει γρήγορα αποτελέσματα, με αρκετά μεγάλο βαθμό αξιοπιστίας. Τα MICs (Minimum Inhibitory Concentrations) δεδομένα ερμηνεύτηκαν σύμφωνα

με τα κριτήρια (έκδοση 11.0) της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για τη δοκιμή ευαισθησίας σε αντιμικροβιακά φάρμακα (EUCAST) (www.eucast.org)

3.4 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA (DNA extraction)

Σε αυτό το στάδιο έγινε απομόνωση του γενωμικού υλικού ενός βιολογικού δείγματος. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε λύση κυττάρων, απομάκρυνση πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων ώστε στο τέλος να απομονωθεί το DNA. Το όνομα του kit το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση ονομάζεται DNA-Sorb-A (Sacace-Biotechnologies) και τα υλικά-μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- a. Lysis Solution
- b. Washing Solution
- c. Sorbent
- d. DNA-eluent
- e. Transport medium

Τα βήματα τα οποία ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

- 1) Αρχικά, βάλαμε για θέρμανση τα διαλύματα λύσης και πλύσης (lysis and washing solutions) στους 60-65°C προκειμένου να ζεσταθούν και να διαλυθούν τυχόν κρύσταλλοι πάγου.
- 2) Ετοιμάσαμε τα 1,5ml αποστειρωμένα σωληνάρια πολυπροπυλενίου που θα χρησιμοποιούσαμε.
- 3) Σε κάθε σωληνάριο προσθέσαμε 1ml φυσιολογικού ορού (Φ.Ο.) και αναδιαλύσαμε τα βακτήρια που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία. Η αναδιάλυση στην αρχή έγινε με τη χρήση vortex και στη συνέχεια μέσω φυγοκέντρησης στις 5.000-6.000 στροφές για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε προσεκτικά και πετάχτηκε με τη χρήση πιπέτας.
- 4) Ακολούθησε ανασύσταση του ιζήματος με 100μl φυσιολογικού ορού και επιπλέον προστέθηκαν 300μl διάλυμα λύσης (lysis solution).
- 5) Έπειτα, έγινε ανάδευση των σωληναρίων με τη χρήση vortex και επώαση των δειγμάτων για 5 λεπτά στους 65°C.

!!! Τα δείγματα τα οποία δεν έχουν διαλυθεί πλήρως προτείνεται να φυγοκεντρηθούν για 5 λεπτά σε μέγιστο αριθμό στροφών (12.000-16.000 g) και να μεταφερθεί το υπερκείμενο σε νέα σωληνάρια για απομόνωση του DNA.

- 6) Αναδεύσαμε με vortex το Sorbent και προσθέσαμε 20μl από αυτό σε κάθε δείγμα.
- 7) Αναδεύσαμε ξανά με vortex για 5-7 δευτερόλεπτα και αφήσαμε για επώαση όλα τα σωληνάρια για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια επαναλάβαμε αυτό το βήμα.

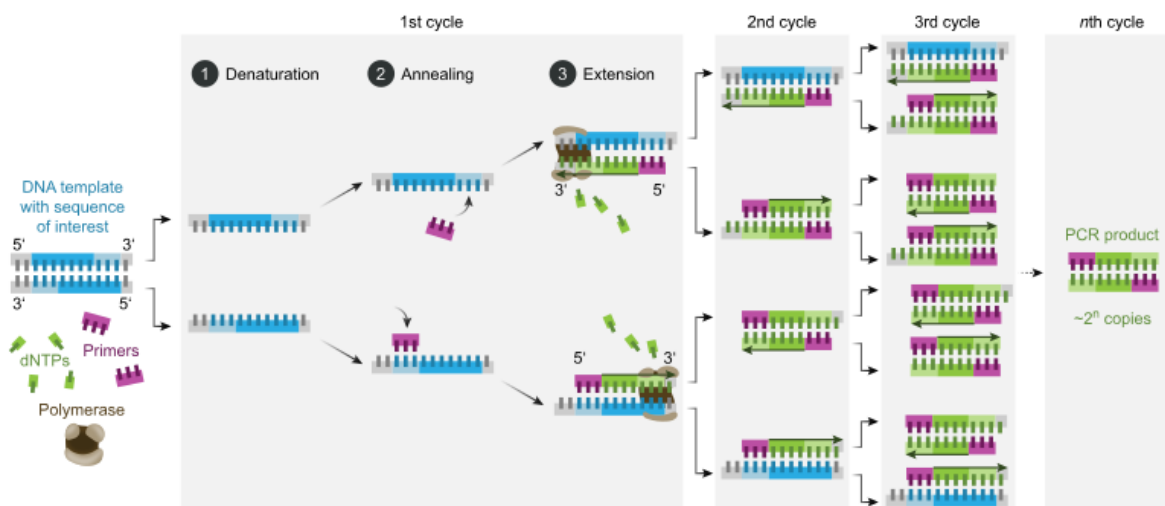
- 8) Φυγοκεντρήσαμε όλα τα σωληνάρια για 30 δευτερόλεπτα στις 5.000 στροφές και με τη βοήθεια μικροπιπέτας, αφαιρέσαμε και πετάξαμε το υπερκείμενο από κάθε σωληνάριο χωρίς να διαταράξουμε το ίζημα.
- 9) Προσθέσαμε 500μl διαλύματος πλύσης σε κάθε σωληνάριο. Αναδεύσαμε ελαφρά με vortex και φυγοκεντρήσαμε για 30 δευτερόλεπτα στις 10.000 στροφές. Αφαιρέσαμε και πετάξαμε το υπερκείμενο.
- 10) Επαναλάβουμε το προηγούμενο βήμα και επώασαμε όλα τα δείγματα με το καπάκι ανοιχτό για 5-10 λεπτά στους 65°C.
- 11) Επαναδιαλυτοποιήσαμε το ίζημα σε 100μl DNA-eluent και επώασαμε για 5 λεπτά στους 65°C και αναδεύουμε με vortex περιοδικά και μετά φυγοκεντρήσαμε τα σωληνάρια για 1 λεπτό στις 12.000 στροφές.
- 12) Τέλος, με τη χρήση πιπέτας αφαιρέσαμε το υπερκείμενο, το οποίο περιείχε το απομονωμένο DNA, και το μεταφέραμε σε νέα σωληνάρια τα οποία τα αποθηκεύσαμε στους -20°C για μελλοντική χρήση.

3.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction) είναι μία *in vitro* τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως από το 1983 και σκοπό έχει την ενίσχυση-παραγωγή των αντιγράφων μίας περιοχής του γονιδιώματος, ενός οργανισμού, όπως ένα γονίδιο, μέσα στο οποίο βρίσκονται διάφορα μόρια DNA. Ο μεγάλος αριθμός αντιγράφων που παράγεται, χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανού οργανισμού, καθιστά δυνατή την ανάλυση του DNA. Η PCR εξελίσσεται σε συγκεκριμένους κύκλους αντιδράσεων, όπου κάθε κύκλος περιλαμβάνει τρία στάδια, τα οποία είναι τα εξής (Εικόνα 20):

1. Αποδιάταξη του DNA (DNA denaturation): πραγματοποιείται θέρμανση του μίγματος μέχρι περίπου τους 95°C ώστε να αποδιαταχθεί το δίκλωνο DNA (δηλαδή και το DNA-στόχος) και να προκύψει μονόκλωνο DNA.
2. Αναδιάταξη ή υβριδισμός των εκκινητών (primer annealing): στο στάδιο αυτό μειώνεται η θερμοκρασία του μίγματος, σε εύρος 40-70°C, για να πραγματοποιηθεί η πρόσδεση των εκκινητών πάνω στα μονόκλιωνα πλέον εκμαγεία του DNA και πιο συγκεκριμένα το 3' άκρο της συμπληρωματικής αλυσίδας, της κάθε αλληλουχίας.
3. Επιμήκυνση του DNA (DNA extension): κατά το στάδιο αυτό αυξάνεται η θερμοκρασία στους 72°C, ιδανικές συνθήκες προκειμένου να δράσει η DNA πολυμεράση (Taq πολυμεράση) και να πραγματοποιήσει την επιμήκυνση των εκκινητών με την προσθήκη ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs) μέσω ενός ενζύμου, της DNA πολυμεράσης.

Μετά το πέρας του πρώτου κύκλου τα μόρια του DNA-στόχου έχουν διπλασιαστεί και στη συνέχεια, αυτά τα τρία στάδια θα επαναληφθούν, για 30 με 40 φορές, ώστε να προκύψει ικανοποιητικός αριθμός αντιγράφων.



Εικόνα 21: Απεικόνιση του μηχανισμού της PCR

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί με επιτυχία αυτή η τεχνική οφείλουμε να ακολουθήσουμε μία σειρά βημάτων:

- 1) Σε ένα σωληνάριο κωνικό 1,5ml τύπου Eppendorf με πώμα προσθέτουμε μια σειρά αντιδραστηρίων απαραίτητα για την αντίδραση (εκτός του DNA των δειγμάτων), προκειμένου να δημιουργήσουμε το Master Mix, με την σειρά και τις ποσότητες που αναγράφονται παρακάτω, πολλαπλασιασμένες σύμφωνα με τον αριθμό των δειγμάτων που πρόκειται να δημιουργήσω, προσθέτοντας 1. [πχ. αν θέλω να δημιουργήσω για 15 δείγματα (συμπεριλαμβανομένου και τον αρνητικό μάρτυρα) Master Mix, τότε όλες οι ποσότητες είναι πολλαπλασιασμένες επί 16]:

- a. Απιονισμένο dH₂O → 18,3 μl
- b. Buffer 10x → 2,5 μl
- c. DNTPs 5 mmol → 0,5 μl
- d. MgCl₂ → 1,5 μl
- e. Primer Forward → 0,25 μl
- f. Primer Reverse → 0,25 μl
- g. Πολυμεράση Taq → 0,2 μl

!!! Επειδή η πολυμεράση Taq είναι ευαίσθητη σε θερμοκρασία δωματίου τη βγάζουμε από την κατάψυξη μόνο τη στιγμή που είναι να την χρησιμοποιήσουμε.

- 2) Αφού δημιουργήσουμε το Master Mix, το αναδεύουμε απαλά με μία πιπέτα προκειμένου να ομογενοποιηθεί καλά το μείγμα και στη συνέχεια το μοιράζουμε σε

μικρότερα σωληνάρια (0,2ml) που μπαίνουν στον θερμικό κυκλοποιητή PCR. Η ποσότητα που βάζουμε σε καθένα από αυτά τα σωληνάρια είναι 23,5 μl.

- 3) Στη συνέχεια προσθέτουμε 1,5 μl των DNA δειγμάτων στα αντίστοιχα σωληνάρια που έχουμε σημειώσει.

!!! Παρατηρούμε ότι μετά την προσθήκη αυτή ο τελικός όγκος σε κάθε σωληνάριο είναι 25 μl.

- 4) Έπειτα, αναλόγως με το ζευγάρι των εκκινητών που έχουμε προσθέσει, δημιουργούμε τον κατάλληλο προγραμματισμό στον θερμικό κυκλοποιητή όσο αφορά τις θερμοκρασίες, τους χρόνους, τον αριθμό των κύκλων-επαναλήψεων αλλά και του όγκου του που περιέχει το κάθε σωληνάριο.

!!! Σημαντικοί παράγοντες που λαμβάνουμε υπόψη είναι το T_m των εκκινητών καθώς και το μήκος της γονιδιωματικής αλληλουχίας που θέλουμε να ενισχύσουμε. Για τον υπολογισμό του T_m (υπολογισμός θερμοκρασίας κατάλληλης για τον υβριδισμό των εκκινητών), χρησιμοποιούμε τον παρακάτω μαθηματικό τύπο:

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

ενώ η εύρεση του μήκους της αλληλουχίας μέσου blast, θα μας δώσει την πληροφορία για το πόσο χρόνο θα χρειαστεί η πολυμεράση Taq να αντιγράψει-επιμηκύνει το κλώνο αυτό. Αυτό βέβαια θα εξαρτηθεί και με τη πολυμεράση που χρησιμοποιούμε, ποσό γρήγορα δηλαδή «τρέχει» την αλληλουχία.

- 5) Αφού συμπληρωθεί ο απαιτούμενος χρόνος του προγράμματος και ολοκληρωθεί η διαδικασία, τα δείγματα θα αναλυθούν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (μια διαδικασία που θα αναλυθεί στη συνέχεια) ή θα αποθηκευτούν στην κατάψυξη στους -18°C για μετέπειτα επεξεργασία.

3.5.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση γονιδίων βασικής κυτταρικής λειτουργίας (MLST)

Η PCR στη μελέτη μας χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την ανίχνευση γονιδίων βασικής κυτταρικής λειτουργίας της *P. aeruginosa* που χρησιμοποιούνται για Πολυτοπική Νουκλεοτιδική Ανάλυση (Multilocus Sequence Typing-MLST).

Με τη χρήση της μεθόδου MLST, τα στελέχη ταυτοποιούνται σύμφωνα με τις διάφορες αλληλουχίες σε έναν αριθμό επιλεγμένων γενετικών τόπων. Οι DNA αλληλουχίες 7 διαφορετικών γονιδίων (house-keeping genes) ενισχύονται με PCR και στη συνέχεια αλληλουχούνται. Για κάθε γονίδιο-στόχο, σε έκαστη μοναδική αλληλουχία (αλληλόμορφο) αποδίδεται ένας αριθμός. Έτσι, λοιπόν, σε κάθε στέλεχος, με βάση το συνδυασμό των 7

γονιδίων με τα διάφορα αλληλόμορφα που έχουν προκύψει, θα προσδιοριστεί και ο τύπος της αλληλουχίας (ST) στον οποία ανήκει κάθε βακτηριακό στέλεχος (Jolley et al. 2018).

Πιο συγκεκριμένα, τα γονίδια τα οποία μελετήθηκαν ήταν τα ακόλουθα: *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* και *trpE*.

Οι εκκινητές οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για την PCR ενίσχυση των γονιδίων αυτών είναι:

ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΙΟΝΤΟΣ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ
acsA:F	ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC	842bp	El-Shazly et al. (2015), Breidenstein EBM (2011)
acsA:R	GACATAGATGCCCTGCCCCCTTGAT	842bp	El-Shazly et al. (2015), Breidenstein EBM (2011)
aroE:F	TGGGGCTATGACTGGAAACC	1052bp	El-Shazly et al. (2015), Breidenstein EBM (2011)
aroE:R	TAACCCGGTTTTGTGATTCCTACA	1052bp	El-Shazly et al. (2015), Breidenstein EBM (2011)
guaA:F	CGGCCTCGACGTGTGGATGA	897bp	El-Shazly et al. (2015), Breidenstein EBM (2011)
guaA:R	GAACGCCTGGCTGGTCTTGTCTA	897bp	El-Shazly et al. (2015), Breidenstein EBM (2011)
mutL:F	CCAGATCGCCGCCGGTGAGGTG	898bp	El-Shazly et al. (2015), Breidenstein EBM (2011)
mutL:R	CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC	898bp	El-Shazly et al. (2015), Breidenstein EBM (2011)
nuoD:F	ACCGCCACCCGTA CTG	1042bp	El-Shazly et al. (2015), Breidenstein EBM (2011)
nuoD:R	TCTCGCCCATCTTGACCA	1042bp	El-Shazly et al. (2015), Breidenstein EBM (2011)
ppsA:F	GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG	989bp	El-Shazly et al. (2015), Breidenstein EBM (2011)
ppsA:R	GGGTTCTCTTCTCCGGCTCGTAG	989bp	El-Shazly et al. (2015), Breidenstein EBM (2011)
trpE:F	GCGGCCAGGGTCGTGAG	811bp	El-Shazly et al. (2015), Breidenstein EBM (2011)
trpE:R	CCCGGCGCTTGTTGATGGTT	811bp	El-Shazly et al. (2015), Breidenstein EBM (2011)

Πίνακας 3: Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της MLST.

Το Master Mix που δημιουργήσαμε για κάθε housekeeping γονίδιο ήταν το εξής:

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

Πίνακας 4: Master Mix για τα housekeeping γονίδια.

!!! Το συγκεκριμένο buffer που χρησιμοποιούμε σε αυτή την αντίδραση περιέχει 20 mM MgCl₂, γι' αυτό δεν προσθέτουμε χωριστά MgCl₂ αλλά προκειμένου να επιτύχουμε τελικό όγκο σε κάθε σωληνάριο (0,2ml) 25 μl, προσθέτουμε 19,8 μl αντί για 18,3 μl dH₂O.

Όσο αφορά τον προγραμματισμό του θερμικού κυκλοποιητή PCR, το πρόγραμμα που δημιουργήσαμε ήταν το εξής:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	96°C	1 min
Αποδιάταξη του DNA (denaturation)	96°C	60 s
Προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing)	55°C	60 s
Επιμήκυνση των εκκινητών (extension)	72°C	60 s
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min

} x 35 κύκλοι

Πίνακας 5: Συνθήκες διεξαγωγής PCR, των housekeeping γονιδίων.

3.5.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση γονιδίων που σχετίζονται με CRISPR/Cas συστήματα

Προκειμένου να καταφέρουμε να εντοπίσουμε ποιο από τα 3 διαφορετικά CRISPR/Cas συστήματα υπάρχουν στα υπό μελέτη στελέχη *P. aeruginosa*, εξετάσαμε για την ύπαρξη συγκεκριμένων CRISPR-συσχετιζόμενων (cas) γονιδίων. Πιο συγκεκριμένα, ασχοληθήκαμε με την εύρεση των γονιδίων *cas1*, *cse1* και *cas8* καθώς από μελέτες βρήκαμε ότι αυτά τα γονίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ταυτοποίηση των τύπων I-F, I-E και I-C των CRISPR/Cas συστημάτων, αντίστοιχα (Essoh et al. 2013).

Πιο συγκεκριμένα, οι αλληλουχίες των εκκινητών για τα γονίδια *cas1* και *cse1* είναι ίδιες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν από τον Essoh (2013), ενώ οι εκκινητές για τον εντοπισμό του γονιδίου *cas8* σχεδιάστηκαν από εμάς (Πίνακας 6). Το *cas8* επιλέχθηκε επειδή ήταν ειδικό για τύπου I-C συστήματα. Για την κατασκευή των εκκινητών αυτών χρησιμοποιήσαμε την αλληλουχία του *cas8* γονιδίου, του τύπου IC, που βρήκαμε αναρτημένη, μέσω του προγράμματος CRISPRCasFinder [online]. Οι εκκινητές αυτοί φροντίσαμε να προσδένονται σε μία ειδική θέση μέσα στο γονίδιο αυτό.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR ενίσχυση αυτών των γονιδίων είναι:

ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ
cas1:F	GACATTTCTCCAGCGAACTGA	Essoh et al. (2013)
cas1:R	CTTCTTCGGTCAGTAGATGCTC	Essoh et al. (2013)
cse1:F	ATGACTGAACACTACAACCTGC	Luz et al. (2019)
cse1:R	GGTCATAGGAATGGTCGAACAC	Luz et al. (2019)
cas8:F	ATGATCCTTTTCGGCTCTCAAT	This study
cas8:R	TCATTCTTGTCTTCCTTGCTC	This study

Πίνακας 6: Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση των *cas1*, *cse1* και *cas8* γονιδίων.

i. Γονίδιο *cas1*

Το Master Mix που δημιουργήσαμε για την ενίσχυση του συγκεκριμένου γονιδίου είναι το εξής:

Master Mix	Mix για x1 αντίδραση (μl)
10X DreamTaq Green Buffer (includes 20 mM MgCl ₂)	2,5
dNTPs 5 mmol	0,5
MgCl ₂	-
Primer F (<i>cas1</i>)	0,25
Primer R (<i>cas1</i>)	0,25
DreamTaq DNA Polymerase (500 U , 5 U/μL)	0,2
dH ₂ O	19,8
DNA	1,5
Συνολικός όγκος αντίδρασης	25

Πίνακας 7: Master Mix για το *cas1* γονίδιο.

Όσο αφορά τον προγραμματισμό του θερμικού κυκλοποιητή PCR, το πρόγραμμα που δημιουργήσαμε ήταν το εξής:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min
Αποδιάταξη του DNA (<i>denaturation</i>)	95°C	30 s
Προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (<i>annealing</i>)	60°C	30 s
Επιμήκυνση των εκκινητών (<i>extension</i>)	72°C	60 s
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min

x 35 κύκλοι

Πίνακας 8: Συνθήκες διεξαγωγής PCR, του *cas1* γονιδίου.

ii. Γονίδιο *cse1*

Το Master Mix που δημιουργήσαμε για την ενίσχυση του συγκεκριμένου γονιδίου είναι το εξής:

Master Mix	Mix για x1 αντίδραση (μl)
10X DreamTaq Green Buffer (includes 20 mM MgCl ₂)	2,5
dNTPs 5 mmol	0,5
MgCl ₂	-
Primer F (<i>cse1</i>)	0,25
Primer R (<i>cse1</i>)	0,25
DreamTaq DNA Polymerase (500 U , 5 U/μL)	0,2
dH ₂ O	19,8
DNA	1,5
Συνολικός όγκος αντίδρασης	25

Πίνακας 9: Master Mix για το *cse1* γονίδιο.

Όσο αφορά τον προγραμματισμό του θερμικού κυκλοποιητή PCR, το πρόγραμμα που δημιουργήσαμε ήταν το εξής:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min
Αποδιάταξη του DNA (<i>denaturation</i>)	95°C	30 s
Προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (<i>annealing</i>)	60°C	30 s
Επιμήκυνση των εκκινητών (<i>extension</i>)	72°C	60 s
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min

x 35 κύκλοι

Πίνακας 10: Συνθήκες διεξαγωγής PCR, του *cse1* γονιδίου.

iii. Γονίδιο *cas8*

Το Master Mix που δημιουργήσαμε για την ενίσχυση του συγκεκριμένου γονιδίου είναι το εξής:

Master Mix	Mix για x1 αντίδραση (μl)
10X DreamTaq Green Buffer (includes 20 mM MgCl ₂)	2,5
dNTPs 5 mmol	0,5
MgCl ₂	-
Primer F (<i>cas8</i>)	0,25
Primer R (<i>cas8</i>)	0,25
DreamTaq DNA Polymerase (500 U , 5 U/μL)	0,2
dH ₂ O	19,8
DNA	1,5
Συνολικός όγκος αντίδρασης	25

Πίνακας 11: Master Mix για το *cas8* γονίδιο.

Όσο αφορά τον προγραμματισμό του θερμικού κυκλοποιητή PCR, το πρόγραμμα που δημιουργήσαμε ήταν το εξής:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min
Αποδιάταξη του DNA (<i>denaturation</i>)	95°C	30 s
Προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (<i>annealing</i>)	56°C	30 s
Επιμήκυνση των εκκινητών (<i>extension</i>)	72°C	120 s
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min

x 35 κύκλοι

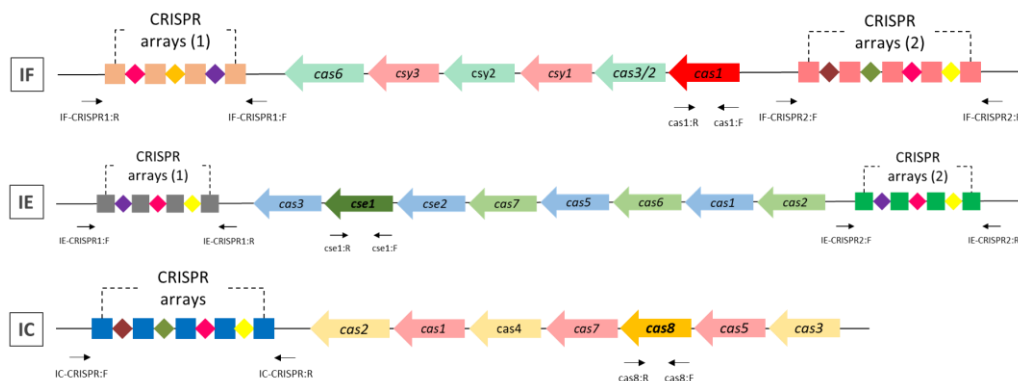
Πίνακας 12: Συνθήκες διεξαγωγής PCR, του *cas8* γονιδίου.

3.5.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση CRISPR/Cas συστοιχιών

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της PCR ενίσχυσης των γονιδίων *cas1*, *cse1* και *cas8*, περάσαμε σε μία ακόμη σειρά πειραμάτων ενίσχυσης PCR, αυτή τη φορά όμως όχι γονιδίων, αλλά περιοχών του γονιδιώματος που αντιστοιχούν σε CRISPR περιοχές. Από τη βιβλιογραφία γνωρίζαμε ότι τα I-E και I-F συστήματα περιλαμβάνουν 2 CRISPR συστοιχίες, ενώ τα I-C συστήματα φέρουν μόνο 1 CRISPR συστοιχία (Essoh et al. 2013). Πιο συγκεκριμένα, για δείγματα που βγήκαν θετικά για την ύπαρξη του γονιδίου *cas1* προχωρήσαμε στην ενίσχυση

των IF CRISPR1 και CRISPR2 συστοιχιών, για θετικά *cse1* δείγματα θέλαμε να ενισχύσουμε τις IE CRISPR1 και CRISPR2 συστοιχίες και για θετικά *cas8* δείγματα της IC CRISPR συστοιχίες.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των IF CRISPR1 και CRISPR2 συστοιχιών είναι ίδιες με αυτές που αναφέρει και ο Essoh (2013). Οι αλληλουχίες των λοιπών εκκινητών, για τις IE CRISPR1 και CRISPR2 και IC CRISPR συστοιχίες, σχεδιάστηκαν από εμάς (Πίνακας 13). Οι εκκινητές για την εύρεση και ενίσχυση των CRISPR συστοιχιών προσδένονται πάνω στο γονιδίωμα της *P. aeruginosa* εξωτερικά των συστοιχιών, σε περιοχές που συνορεύουν και είναι συντηρημένες (εικόνα 22).



Εικόνα 22: Απεικόνιση του μηχανισμού της PCR

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση PCR των CRISPR περιοχών είναι οι παρακάτω:

ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ
IF-CRISPR1:F	CTTGACGACCTATGTGGCAG	Essoh et al. (2013)
IF-CRISPR1:R	GTCGCTGCAAAAAGAGGGTT	Essoh et al. (2013)
IF-CRISPR2:F	TTTTCGTCTGTGTGAGGAGC	Essoh et al. (2013)
IF-CRISPR2:R	AGCAAGTTACGAGACCTCGA	Essoh et al. (2013)
IE-CRISPR1:F	GCTGCTCTATCCATGCCAAAG	This study
IE-CRISPR1:R	ACCGTCGACATCCAGTGTTG	This study
IE-CRISPR2:F	CTGGTGATCACGCCACTGG	This study
IE-CRISPR2:R	GATGCGGGTAGGTTTCGACT	This study
IC-CRISPR:F	CTGCGTGTGCGACGAGCA	This study
IC-CRISPR:R	GTTCGCAATTCTCTAGCTGATTG	This study

Πίνακας 13: Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση CRISPR συστοιχιών.

i. IF-CRISPR1 περιοχή

Το Master Mix που δημιουργήσαμε για την ενίσχυση της συγκεκριμένης περιοχής του γονιδιώματος του *P. aeruginosa* είναι το εξής:

Master Mix	Mix για x1 αντίδραση (μl)
10X DreamTaq Green Buffer (includes 20 mM MgCl ₂)	2,5
dNTPs 5 mmol	0,5
MgCl ₂	-
Primer F (IF-CRISPR1)	0,25
Primer R (IF-CRISPR1)	0,25
DreamTaq DNA Polymerase (500 U , 5 U/μL)	0,2
dH ₂ O	19,8
DNA	1,5
Συνολικός όγκος αντίδρασης	25

Πίνακας 14: Master Mix για το την IF-CRISPR1 περιοχή.

Όσο αφορά τον προγραμματισμό του θερμικού κυκλοποιητή PCR, το πρόγραμμα που δημιουργήσαμε ήταν το εξής:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min
Αποδιάταξη του DNA (<i>denaturation</i>)	95°C	30 s
Προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (<i>annealing</i>)	60°C	30 s
Επιμήκυνση των εκκινητών (<i>extension</i>)	72°C	120 s
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min

x 35 κύκλοι

Πίνακας 15: Συνθήκες διεξαγωγής PCR, της IF-CRISPR1 περιοχή.

ii. IF-CRISPR2 περιοχή

Το Master Mix που δημιουργήσαμε για την ενίσχυση της συγκεκριμένης περιοχής του γονιδιώματος του *P. aeruginosa* είναι το εξής:

Master Mix	Mix για x1 αντίδραση (μl)
10X DreamTaq Green Buffer (includes 20 mM MgCl ₂)	2,5
dNTPs 5 mmol	0,5
MgCl ₂	-
Primer F (IF-CRISPR2)	0,25
Primer R (IF-CRISPR2)	0,25
DreamTaq DNA Polymerase	0,2

(500 U , 5 U/μL)	
dH ₂ O	19,8
DNA	1,5
Συνολικός όγκος αντίδρασης	25

Πίνακας 16: Master Mix για το την IF-CRISPR2 περιοχή.

Όσο αφορά τον προγραμματισμό του θερμικού κυκλοποιητή PCR, το πρόγραμμα που δημιουργήσαμε ήταν το εξής:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min	
Αποδιάταξη του DNA (<i>denaturation</i>)	95°C	30 s	} x 35 κύκλοι
Προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (<i>annealing</i>)	60°C	30 s	
Επιμήκυνση των εκκινητών (<i>extension</i>)	72°C	120 s	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min	

Πίνακας 17: Συνθήκες διεξαγωγής PCR, της IF-CRISPR2 περιοχή.

iii. IE-CRISPR1 περιοχή

Το Master Mix που δημιουργήσαμε για την ενίσχυση της συγκεκριμένης περιοχής του γονιδιώματος του *P. aeruginosa* είναι το εξής:

Master Mix	Mix για x1 αντίδραση (μl)
10X DreamTaq Green Buffer (includes 20 mM MgCl ₂)	2,5
dNTPs 5 mmol	0,5
MgCl ₂	-
Primer F (IE-CRISPR1)	0,25
Primer R (IE-CRISPR1)	0,25
DreamTaq DNA Polymerase (500 U , 5 U/μL)	0,2
dH ₂ O	19,8
DNA	1,5
Συνολικός όγκος αντίδρασης	25

Πίνακας 18: Master Mix για το την IE-CRISPR1 περιοχή.

Όσο αφορά τον προγραμματισμό του θερμικού κυκλοποιητή PCR, το πρόγραμμα που δημιουργήσαμε ήταν το εξής:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min
Αποδιάταξη του DNA (<i>denaturation</i>)	95°C	30 s
Προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (<i>annealing</i>)	60°C	30 s
Επιμήκυνση των εκκινητών (<i>extension</i>)	72°C	120 s
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min

x 35 κύκλοι

Πίνακας 19: Συνθήκες διεξαγωγής PCR, της IE-CRISPR1 περιοχή.

iv. IE-CRISPR2 περιοχή

Το Master Mix που δημιουργήσαμε για την ενίσχυση της συγκεκριμένης περιοχής του γονιδιώματος του *P. aeruginosa* είναι το εξής:

Master Mix	Mix για x1 αντίδραση (μl)
10X DreamTaq Green Buffer (includes 20 mM MgCl ₂)	2,5
dNTPs 5 mmol	0,5
MgCl ₂	-
Primer F (IE-CRISPR2)	0,25
Primer R (IE-CRISPR2)	0,25
DreamTaq DNA Polymerase (500 U , 5 U/μL)	0,2
dH ₂ O	19,8
DNA	1,5
Συνολικός όγκος αντίδρασης	25

Πίνακας 20: Master Mix για το την IE-CRISPR2 περιοχή.

Όσο αφορά τον προγραμματισμό του θερμικού κυκλοποιητή PCR, το πρόγραμμα που δημιουργήσαμε ήταν το εξής:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min
Αποδιάταξη του DNA (<i>denaturation</i>)	95°C	30 s
Προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (<i>annealing</i>)	64°C	30 s
Επιμήκυνση των εκκινητών (<i>extension</i>)	72°C	120 s
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min

x 35 κύκλοι

Πίνακας 21: Συνθήκες διεξαγωγής PCR, της IE-CRISPR2 περιοχή.

v. IC-CRISPR περιοχή

Το Master Mix που δημιουργήσαμε για την ενίσχυση της συγκεκριμένης περιοχής του γονιδιώματος του *P. aeruginosa* είναι το εξής:

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

Πίνακας 22: Master Mix για το την IC-CRISPR περιοχή.

Όσο αφορά τον προγραμματισμό του θερμικού κυκλοποιητή PCR, το πρόγραμμα που δημιουργήσαμε ήταν το εξής:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min
Αποδιάταξη του DNA (<i>denaturation</i>)	95°C	30 s
Προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (<i>annealing</i>)	64°C	30 s
Επιμήκυνση των εκκινητών (<i>extension</i>)	72°C	120 s
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min

x 35 κύκλοι

Πίνακας 23: Συνθήκες διεξαγωγής PCR, της IC-CRISPR περιοχή.

3.5.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση του *bla_{VIM}* γονιδίου

Η τελευταία PCR που πραγματοποιήσαμε ήταν για να εντοπίσουμε αν τα δείγματα μας έφεραν γονίδιο που σχετίζεται με την παραγωγή της VIM-τύπου μέταλλο-β-λακταμάσης.

Οι εκκινητές οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό και την ενίσχυση του συγκεκριμένου γονιδίου ήταν οι παρακάτω:

ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ
bla_{VIM}:F	GATGGTGTGGTTCGCATA	Ellington et al. (2007)
bla_{VIM}:R	CGAATGCGCAGCACCAG	Ellington et al. (2007)

Πίνακας 24: Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση του *bla_{VIM}* γονιδίου.

Το Master Mix που δημιουργήσαμε για την ενίσχυση της συγκεκριμένης περιοχής του γονιδιώματος του *P. aeruginosa* είναι το εξής:

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

Πίνακας 25: Master Mix για το *bla_{VIM}* γονίδιο.

Όσο αφορά τον προγραμματισμό του θερμικού κυκλοποιητή PCR, το πρόγραμμα που δημιουργήσαμε ήταν το εξής:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min
Αποδιάταξη του DNA (<i>denaturation</i>)	95°C	30 s
Προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (<i>annealing</i>)	52°C	40 s
Επιμήκυνση των εκκινητών (<i>extension</i>)	72°C	50 s
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min

x 35 κύκλοι

Πίνακας 26: Συνθήκες διεξαγωγής PCR, το *blavim* γονίδιο.

3.6 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Προκειμένου να εξετάσουμε αν όλες οι PCRs και τα καθαρισμένα προϊόντα της PCR έδωσαν τα αναμενόμενα προϊόντα ενίσχυσης (ενότητα 3.7), πραγματοποιήσαμε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων αυτών σε πήκτωμα 1,5% αγαρόζης. Ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιήσαμε TBE (X10) και προσθέσαμε βρωμιούχο αιθίδιο. Ως ladder στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήσαμε το Invitrogen™ 100bp DNA Ladder. Πριν την ηλεκτροφόρηση, στα προς εξέταση προϊόντα, προστέθηκε επιπλέον 1,5μl 6X DNA Gel Loading Dye (εκτός από τις PCRs όπου χρησιμοποιούσαμε την DreamTaq polymerase με το DreamTaq Green Buffer). Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν για 35' στα 95V.

3.7 Καθαρισμός προϊόντος

Το επόμενο βήμα είναι ο καθαρισμός των προϊόντων που διαπιστώσαμε θετικά, δηλαδή παρατηρήσαμε ενίσχυση του τμήματος του γονιδιώματος που επιζητούσαμε σε κάθε PCR. Σκοπός αυτής της διαδικασίας καθαρισμού είναι να απομονώσουμε το DNA, από τυχόν άλλες ουσίες που περιέχονται είτε από το Master Mix είτε από το πήκτωμα αγαρόζης (αν η απομόνωση DNA γίνει από αυτό), και να αποστείλουμε τα καθαρισμένα πλέον PCR προϊόντα για αλληλούχηση και στη συγκεκριμένη περίπτωση αλληλούχηση Sanger.

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήσαμε 2 διαφορετικά kit καθαρισμού. Το ένα kit απευθύνεται στον καθορισμό των PCR προϊόντων (PureLink™ PCR Purification Kit) και το άλλο kit απευθύνεται στον καθαρισμό PCR προϊόντων, όπως και στο πρώτο kit, μόνο που αυτά περιέχονται μέσα σε πήκτωμα αγαρόζης (PureLink™ Quick Gel Extraction Kit).

!!! Στη χρήση του καθαρισμού PCR προϊόντων από πήκτωμα προχωρήσαμε καθώς δεν έβγαине μία διακριτή ζώνη για αυτά που τρέχαμε στο πήκτωμα και έτσι φροντίσαμε να απομονώσουμε,

με αυτό τον τρόπο τη πιθανή ζώνη που στην αλληλούχηση θα μας έδινε την επιθυμητή πληροφορία.

3.7.1 Καθαρισμός PCR προϊόντων

Το συγκεκριμένο kit που χρησιμοποιήσαμε περιέχει:

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

!!! Στα ρυθμιστικά διαλύματα B2 και W1, πριν χρησιμοποιηθούν, προσθέτουμε 10ml ισοπροπανόλης και 64ml αιθανόλης αντίστοιχα.

Η διαδικασία για τον καθαρισμό των PCR προϊόντων είναι η εξής:

1. Προσθέτουμε το διάλυμα B2 (που περιέχει ισοπροπανόλη) σε αναλογία 4:1 του όγκου του PCR δείγματος και αναμιγνύουμε καλά. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, μετά την ηλεκτροφόρηση, έχει μείνει περίπου 20μl σε κάθε PCR δείγμα, άρα σε καθένα από αυτά προσθέτουμε 80μl B2.
2. Στη συνέχεια, φορτώνουμε όλη την ποσότητα του δείγματος στη στήλη απομόνωσης και φυγοκεντρούμε τη στήλη σε >10.000 στροφές για 1 λεπτό και απορρίπτουμε το υγρό από το σωλήνα συλλογής.
3. Έπειτα, εισάγουμε ξανά τη στήλη στο σωλήνα συλλογής και προσθέτουμε 650μl διαλύματος W1 (που περιέχει αιθανόλη). Φυγοκεντρούμε ξανά σε >10.000 στροφές για 1 λεπτό, πετάμε ξανά το υγρό που μαζεύτηκε στο σωλήνα και τοποθετούμε τη στήλη ξανά στο σωλήνα συλλογής. Πραγματοποιούμε άλλη μία φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα (π.χ. 13.000 στροφές) για 2-3 λεπτά.
4. Τέλος, για την έκλουση, τοποθετούμε τη στήλη στους αποστειρωμένους σωλήνες έκλουσης (1,7ml) που περιέχει το kit και προσθέτουμε 35μl E1 στο κέντρο της στήλης. Αφήνουμε για 1 λεπτό να εμποτιστεί η στήλη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και φυγοκεντρούμε σε μέγιστη ταχύτητα για 2 λεπτά. Έτσι, λοιπόν, ο σωλήνας έκλουσης θα περιέχει πλέον το καθαρισμένο PCR προϊόν το οποίο πρέπει να αποθηκευτεί στην κατάψυξη (-20°C) για μελλοντική χρήση (2^η ηλεκτροφόρηση και αλληλούχηση).

!!! Όταν πραγματοποιήσουμε τη δεύτερη φυγοκέντρηση στη πλύση θα πρέπει να έχουμε στο νου μας ότι μπορεί να υπάρξει υγρό στο σωλήνα συλλογής και αυτό είναι κυρίως αιθανόλη που αν παραμείνει θα αναστείλει περαιτέρω αναλύσεις που κάνουν χρήση ενζύμων.

3.7.2 Καθαρισμός PCR προϊόντων από πήκτωμα

Το συγκεκριμένο kit που χρησιμοποιήσαμε περιέχει:

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

Η διαδικασία για τον καθαρισμό των PCR προϊόντων από πήκτωμα είναι η εξής:

1. Σε πήκτωμα αγαρόζης φορτώνουμε όλη την ποσότητα του προϊόντος της PCR που θέλουμε να απομονώσουμε και στη συνέχεια «τρέχουμε» το πήκτωμα. Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, φωτογραφίζουμε το πήκτωμα και με νυστέρι κόβουμε το μέρος του πηκτώματος που φέρει τις επιθυμητές ζώνες.
2. Με ένα νυστέρι και πάνω από μία λάμπα ακτινοβολίας UV κόβουμε τη ζώνη που θέλουμε να καθαρίσουμε, καθενός δείγματος ξεχωριστά, ζυγίζουμε αυτά τα κομματάκια του πηκτώματος που δημιουργούνται και τα τοποθετούμε σε σωληνάρια κωνικά 1,5ml τύπου Eppendorf με πώμα.
3. Έπειτα, προσθέτουμε ποσότητα 3:1 (300μl) διαλύματος L3 σε κάθε σωληνάριο και βάζουμε τα σωληνάρια αυτά σε ένα heat block στους 50°C για 10 λεπτά (ανά 3 λεπτά αναδεύουμε με vortex το μείγμα για να βεβαιωθούμε ότι το πήκτωμα θα διαλυθεί πλήρως).
4. Στη συνέχεια, προχωρούμε στον καθαρισμό του DNA φορτώνοντας τα διαλυμένα κομμάτια πηκτώματος, που προκύπτουν από το προηγούμενο βήμα, σε ειδικές στήλες απομόνωσης με σωλήνα συλλογής.
5. Μετά, φυγοκεντρούμε τις στήλες σε >12.000 στροφές για 1 λεπτό. Πετάμε το υγρό που συλλέγεται στους σωλήνες συλλογής και τους επανατοποθετούμε στις στήλες μέσα σε αυτούς.

6. Το επόμενο βήμα είναι να προσθέσουμε 500μl διαλύματος W1 (που περιέχει αιθανόλη), να φυγοκεντρήσουμε τις στήλες σε >12.000 στροφές για 1 λεπτό και να πετάξουμε το υγρό που μαζεύεται στο σωλήνα συλλογής.
7. Επανατοποθετούμε τις στήλες στη φυγόκεντρο, σε μέγιστη ταχύτητα αυτή τη φορά για 1-2 λεπτά (προκειμένου να απομακρυνθούν όλα τα υπολείμματα από τις στήλες, όπως η αιθανόλη) και πετάμε τους σωλήνες συλλογής.
8. Τοποθετούμε τις στήλες σε σωληνάρια ανάκτησης, προσθέτουμε 35μl από το διάλυμα E5 στο κέντρο της κάθε στήλης και αφήνουμε για 1 λεπτό τις στήλες σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Τέλος, φυγοκεντρούμε τους σωλήνες σε >12.000 στροφές για 1 λεπτό. Έτσι, λοιπόν, ο σωλήνας έκλουσης θα περιέχει πλέον το καθαρισμένο PCR προϊόν το οποίο πρέπει να αποθηκευτεί στην κατάψυξη (-20°C) για μελλοντική χρήση (2^η ηλεκτροφόρηση και αλληλούχηση).

3.8 Αλληλούχηση με μέθοδο Sanger

Έχοντας καθαρίσει τα PCR προϊόντα και ελέγξει με ηλεκτροφόρηση ότι όντως υπάρχει DNA μέσα στο διάλυμα έκλουσης, του κάθε δείγματος, το επόμενο βήμα ήταν να τα στείλουμε για αλληλούχηση με τη μέθοδο Sanger.

I. Αρχή της μεθόδου

Η αλληλούχηση του DNA αποτελεί μία από τις πλέον θεμελιώδεις τεχνολογίες καθώς μας επιτρέπει να αποκρυπτογραφήσουμε την νουκλεοτιδική αλληλουχία ενός τμήματος DNA. Έως σήμερα έχουν επινοηθεί πολλές διαφορετικές μεθόδους αλληλούχησης με την πιο διαδεδομένη να είναι η μέθοδος Sanger καθώς όλες οι σύγχρονες τεχνικές βασίζονται σε αυτή. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στη χρήση διδεόξυ-τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (ddNTPs) κατά την αντίδραση επέκτασης εκκινητή, τα οποία μόλις εισαχθούν σταματούν την επέκταση της αλληλουχίας, σε διαφορετικό σημείο, καθώς δεν περιέχουν την υδροξυλ-ομάδα που είναι απαραίτητη για την προσθήκη του επόμενου dNTP. Στη μέθοδο αυτή απαιτείται μονόκλωνο DNA που χρησιμοποιείται ως μήτρα για τη σύνθεση ραδιοσημασμένης συμπληρωματικής αλυσίδας *in vitro*. Η αντίδραση πραγματοποιείται με τη χρήση DNA πολυμεράσης με παρουσία τεσσάρων διαφορετικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dATP, dTTPs, dGTPs και dCTPs), ένα από τα οποία είναι ραδιοσημασμένο και ενός συνθετικού ολιγονουκλεοτιδίου (εκκινητής) που είναι συμπληρωματικό στο μητρικό DNA και το οποίο χρησιμεύει ως εκκινητής. Το

ολιγονουκλεοτίδιο αυτό θα επεκτείνεται με τη διαδοχική προσθήκη νουκλεοτιδίων. Αυτή η αντίδραση συνιστά επίσης τη βάση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Αυτή η αντίδραση τελικά θα παράξει ένα μείγμα θραυσμάτων διαφορετικού μήκους καθένα από τα οποία καταλήγει σε ένα «τροποποιημένο» νουκλεοτίδιο (Lesk et al, 2017)

Σήμερα η μέθοδος Sanger είναι πλήρως αυτοματοποιημένη. Γίνεται χρήση ddNTPs που έχουν επισημανθεί με φθορίζουσες χρωστικές διαφορετικού χρώματος το καθένα, έτσι ώστε να μπορούν να εντοπιστούν εύκολα από έναν ανιχνευτή φθορισμού. Η μέθοδος δεν χρειάζεται ραδιενέργεια, και μετά την ηλεκτροφόρηση ένας ανιχνευτής φθορισμού περνά πάνω από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και καταγράφει ποιο διεδόξυνουκλεοτίδιο υπάρχει. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατό να προσδιοριστούν και αλληλουχίες που περιέχουν και 500 bp. Ωστόσο, η κατασκευή νέων αυτοματοποιημένων συσκευών που χρησιμοποιούν ένα σύνολο από τριχοειδή κανάλια (τριχοειδής ηλεκτροφόρηση), αντί του πηκτώματος ακρυλαμιδίου, δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού αλληλουχιών μέχρι και 1000bp (El-Shazly et al. 2015).

II. Πειραματική διαδικασία

Προκειμένου να στείλουμε τα προϊόντα για αλληλούχηση στην εταιρία (CeMIA SA) προετοιμάσαμε τα δείγματα σε πιατάκια 96 θέσεων. Κάθε δείγμα προστέθηκε σε 2 θέσεις σε ποσότητα 9,5μl. Στη μία από αυτές τις 2 θέσεις είχε είτε το Forward primer (5pmol/μl) και στην άλλη το Reverse primer (5pmol/μl) σε ποσότητα 1,5μl, με τελική ποσότητα σε κάθε θέση να ανέρχεται στα 11μl.

3.9 Χρήση βιοπληροφορικών προγραμμάτων για ανάλυση των αποτελεσμάτων

3.9.1 BioEdit

Το πρόγραμμα BioEdit χρησιμοποιείται προκειμένου να μπορέσουμε να διαβάσουμε τα αρχεία τύπου .ab1 που μας έχει στείλει η εταιρία που έκανε την αλληλούχηση Sanger. Το πρόγραμμα αυτό μας δίνει τη δυνατότητα να δούμε την ποιότητα και πιστότητα της κάθε αλληλουχίας, μέσω αξιολόγησης των κορυφών των νουκλεοτιδίων (peaks). Επίσης το πρόγραμμα μας παρέχει τη δυνατότητα να προβούμε σε μικροεπεξεργασίες της κάθε αλληλουχίας (π.χ. να μας βρει την συμπληρωματική της).



Εικόνα 23: Πρόγραμμα BioEdit

Τα βήματα που ακολουθούμε είναι τα εξής:

1. Ανοίγοντας το εκάστοτε αρχείο που μας έχει σταλεί από την αλληλούχηση Sanger, αξιολογούμε τις κορυφές των βάσεων. Προκειμένου να προχωρήσουμε σε περαιτέρω βήματα πρέπει η κάθε κορυφή να είναι ευδιάκριτη και να αντιστοιχίζεται πλήρως με μία βάση. (Σε διαφορετική περίπτωση προβαίνουμε σε επανάληψη της διαδικασίας, στέλνοντας νέα δείγματα για αλληλούχηση.)
2. Μέσω BioEdit αξιολογούμε τόσο τις Forward, όσο και τις Reverse αλληλουχίες DNA και προβαίνουμε στη σύγκριση της αλληλοεπικάλυψής τους.
3. Τέλος, το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιείται για επεξεργασίες των αλληλουχιών που μπορεί να χρειαστεί να κάνουμε όπως, να διορθώσουμε βάσεις, να ενώσουμε αλληλουχίες, να βρούμε συμπληρωματικές αλληλουχίες.

3.9.2 PubMLST (<https://pubmlst.org/>)

Το PubMLST είναι ένας ελεύθερος σε πρόσβαση διαδικτυακός ιστότοπος που μας δίνει την δυνατότητα για συγκεκριμένο είδος μικροοργανισμού να βρούμε τον αριθμό του αλληλομόρφου για κάθε γονίδιο (housekeeping genes), χρησιμοποιώντας τη προσδιορισμένη αλληλουχία. Επίσης, στη συνέχεια μπορούμε να προσδιορίσουμε, μέσω του προγράμματος αυτού, σε ποιο τύπο αλληλουχίας (sequence type-ST) ανήκουν τα υπό μελέτη στελέχη μέσω πολυτοπικής αλληλούχησης (MLST).

Housekeeping genes:

1. Αρχικά επιλέγουμε τον οργανισμό τον οποίο μας ενδιαφέρει (*P. aeruginosa*) και στη συνέχεια «τυποποίηση ενιαίας ακολουθίας» (typing single sequence).
2. Στο καινούριο παράθυρο που ανοίγει καταθέτουμε την υπό μελέτη αλληλουχία και πατάμε «υποβολή» (submit).
3. Αν όλα έχουν γίνει σωστά, ως αποτέλεσμα θα μας βγάλει το αναμενόμενο γονίδιο που ενισχύσαμε μέσω PCR, καθώς και τον αριθμό του αλληλομόρφου του γονιδίου αυτού.

Sequence Type-ST:

1. Έχοντας μελετήσει όλα τα «housekeeping genes» και κατά συνέπεια, έχοντας βρει τους αριθμούς των αλληλομόρφων τους, προβαίνουμε σε κατηγοριοποίηση του στελέχους με βάση το αλληλομορφικό προφίλ (MLST allelic profile).
2. Ως αποτέλεσμα παίρνουμε τον Τύπο Αλληλουχίας (Sequence Type-ST) κάθε δείγματος, δηλαδή τον κλώνο στον οποίο ανήκει.

3.9.3 Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Το βιοπληροφορικό πρόγραμμα blastn μας δίνει τη δυνατότητα, έχοντας μία νουκλεοτιδική αλληλουχία, να βρούμε το ποσοστό ταύτισής της με ήδη χαρακτηρισμένες αλληλουχίες, οι οποίες έχουν κατατεθεί σε μία βάση δεδομένων (GenBank database) ή/και να συγκρίνουμε δύο ή περισσότερες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες μεταξύ τους.

Ταυτοποίηση αλληλουχίας σύμφωνα με την GenBank βάση δεδομένων:

1. Στο παραπάνω link βάζουμε την αλληλουχία που θέλουμε να συγκρίνουμε με τη βάση δεδομένων και στην επιλογή «program selection» επιλέγουμε το «Highly similar sequences», για να αυστηροποιήσουμε τις παραμέτρους του προγράμματος στην εύρεση ομόλογων αλληλουχιών. Τέλος, πατάμε Blast.
2. Το Blastn βρίσκει πλήθος αλληλουχιών που συσχετίζονται με τη δικιά μας αλληλουχία. Διάφορα κριτήρια που χρησιμοποιούμε για να αξιολογήσουμε τις αλληλουχίες που βρίσκουμε είναι όπως το «ποσοστό κάλυψης» (query coverage) [100%] και το «ποσοστό ταυτοποίησης» (percentage of identity) [75-98%].

Σύγκριση δύο ή περισσότερων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών:

1. Το πρώτο βήμα είναι ίδιο με το βήμα 1 της ταυτοποίησης αλληλουχίας με τη βάση δεδομένων, με τη μόνη προσθήκη της επιλογής για την προσθήκη νέας αλληλουχίας.
2. Στη συνέχεια, το Blastn συγκρίνει τις αλληλουχίες αυτές μεταξύ τους και μας δείχνει αν υπάρχει κάποια ταύτιση.
3. Εκτός από την σύγκριση, έπειτα, μπορούμε να προβούμε και στην συνένωση τμημάτων βάσεων, χρησιμοποιώντας παράλληλα και το BioEdit.

3.9.4 CRISPRCasFinder [online]

(<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder/Index>)

Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιείται προκειμένου να εξετάσουμε την ύπαρξη CRISPR/Cas συστημάτων σε μία νουκλεοτιδική αλληλουχία και να αναλύσουμε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που ανήκουν σε CRISPR συστοιχίες. Από την ανάλυση αυτή θα μάθουμε πληροφορίες όπως τον τύπο του CRISPR/Cas συστήματος, την αλληλουχία και τον αριθμό των βάσεων των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (repeats) αλλά και τον αριθμό και την αλληλουχία των spacers.

Τα βήματα που ακολουθούμε για την εύρεση και μελέτη των CRISPR/Cas περιοχών είναι τα εξής:

1. Στο παραπάνω link, αρχικά, ανεβάζουμε την εκάστοτε αλληλουχία σε FASTA μορφή.
2. Ορίζουμε το μέγεθος των αλληλουχιών που γειτνιάζουν με τις CRISPR συστοιχίες σε 10 βάσεις, καθώς οι εκκινητές είχαν σχεδιαστεί με μικρότερη απόσταση των 100 βάσεων από τις CRISPR συστοιχίες.
3. Αποεπιλέγουμε την επιλογή για την εύρεση Cas γονιδίων καθώς δεν περιέχονται στις αλληλουχίες μας και πατάμε «Run».
4. Τέλος, λαμβάνουμε διάφορες πληροφορίες για την κάθε CRISPR συστοιχία όπως φαίνεται και στην Εικόνα 22.

CRISPRCasFinder [online]

Viewing Result

- Submission date : 02/09/2022 13:00:40
- Job ID : 637800084405745110
- File name : Pae2209.fasta
- Job name : No name provided
- 1 analysed sequence(s)
- 1 sequence(s) with CRISPR

Download Results

- Hide CRISPR with evidence level = 1
- Hide sequence without Cas
- Display all spacers (fasta)*
- Display all Direct repeats (fasta)*
- * Evidence level 3 or 4

Sequence Pae2209 [1366 bp] [1 CRISPR] [20 spacers] [4 evidence level]

Summary Details

Element	CRISPR Id / Cas Type	Start	End	Spacer / Gene	Repeat consensus / cas genes	Direction	Evidence Level
CRISPR	Pae2209_1	1	1356	20	GTTTCAATCCACGGCCCGGTGCGGGGCGCGAC	-	4

Regions

Start 1 End 1356

DR Consensus GTTTC AATCCACGGCCCGGTGCGGGGCGCGAC

DR Length 32

Spacers Count 20

Direction -

Potential Orientation (AT%) ND

Evidence Level 4

Conservation DR 97.41 %

Conservation Spacer 0.00 %

Evidence level re-evaluation

Blast score on DR4 database 0.00

Regions -9 UNKNOWN

1 CACTGGCCGGCCATCCGCCAGCGGACCGT

66 GTTTC AATCCACGGCCCGGTGCGGGGCGCGAC

182 GTTTC AATCCACGGCCCGGTGCGGGGCGCGAC

198 GTTTC AATCCACGGCCCGGTGCGGGGCGCGAC

254 GTTTC AATCCACGGCCCGGTGCGGGGCGCGAC

329 GTTTC AATCCACGGCCCGGTGCGGGGCGCGAC

395 GTTTC AATCCACGGCCCGGTGCGGGGCGCGAC

461 GTTTC AATCCACGGCCCGGTGCGGGGCGCGAC

527 GTTTC AATCCACGGCCCGGTGCGGGGCGCGAC

595 GTTTC AATCCACGGCCCGGTGCGGGGCGCGAC

661 GTTTC AATCCACGGCCCGGTGCGGGGCGCGAC

728 GTTTC AATCCACGGCCCGGTGCGGGGCGCGAC

794 GTTTC AATCCACGGCCCGGTGCGGGGCGCGAC

860 GTTTC AATCCACGGCCCGGTGCGGGGCGCGAC

927 GTTTC AATCCACGGCCCGGTGCGGGGCGCGAC

992 GTTTC AATCCACGGCCCGGTGCGGGGCGCGAC

1059 GTTTC AATCCACGGCCCGGTGCGGGGCGCGAC

1126 GTTTC AATCCACGGCCCGGTGCGGGGCGCGAC

1192 GTTTC AATCCACGGCCCGGTGCGGGGCGCGAC

1259 GTTTC AATCCACGGCCCGGTGCGGGGCGCGAC

1325 GTTTC AATCCACGGCCCGGTGCGGGGCGCGAC

1367 UNKNOWN

Εικόνα 24: Πρόγραμμα CRISPRCasFinder [online]

3.9.5 Geneious 7.1.9 (<https://www.geneious.com/>)

Το Geneious (έκδοση 7.1.9) είναι μια βιοπληροφοριακή πλατφόρμα που παρέχει πλήθος εργαλείων τα οποία μπορούμε να τα χρησιμοποιήσουμε για διεργασίες όπως ευθυγράμμισης, συναρμολόγησης και ανάλυσης αλληλουχιών DNA, RNA και πρωτεϊνών. Ένα από αυτά τα εργαλεία, επίσης, είναι και η κατασκευή φυλογενετικών δέντρων (**National Cancer Institute, 2022**). Στη συγκεκριμένη μελέτη τα φυλογενετικά δέντρα κατασκευάστηκαν με τη μέθοδο Neighbor-Joining. Στη μέθοδος Neighbor-Joining (MJ), ως λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (operational taxonomic units-OTUs) ορίζονται ένα ζεύγος «φύλλων» (“leaves”) με ένα κόμβο που τα συνδέει. Η αρχή αυτής της μεθόδου είναι να βρούμε ζεύγη OTUs που ελαχιστοποιούν το συνολικό μήκος των κλαδιών με κάθε στάδιο ομαδοποίησης (**Saitou et al, 1987**).

Τα στάδια που ακολουθούμε για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων τύπου Neighbor-Joining είναι τα εξής:

1. Αρχικά, κατεβάσαμε τις αλληλουχίες των στελεχών που μας ενδιαφέρουν και επιλέξαμε αυτές που σχετίζονται με CRISPR συστοιχίες.
2. Για την κατασκευή των δέντρων, τύπου I-F και I-E CRISPR/Cas συστημάτων, χρησιμοποιήσαμε, για κάθε στέλεχος, μία ενιαία αλληλουχία που αποτελούνταν από τη συνένωση των CRISPR1 και CRISPR2 συστοιχιών.
3. Στη συνέχεια, επιλέξαμε τις αλληλουχίες που αντιστοιχούν για κάθε τύπο CRISPR/Cas συστήματος και ορίσαμε στο Geneious τη δημιουργία φυλογενετικών δέντρων μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining για κάθε τύπο χωριστά.

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από ένα σύνολο 100 κλινικών δειγμάτων που ερευνήθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης μας, 18 προερχόταν από παθολογικές κλινικές, 15 από Μονάδες Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ), 11 από καρδιολογικές κλινικές, 10 από χειρουργικές, 10 από πνευμονολογικές, 10 από Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών (ΤΕΠ), 6 από ουρολογικές και τα υπόλοιπα 20 από λοιπές κλινικές του ΠΓΝΛ (Εικόνα 27).

ΚΛΙΝΙΚΗ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ	18 (18%)
ΜΕΘ	15 (15%)
ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΕΣ	11 (11%)
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΕΣ	10 (10%)
ΠΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΕΣ	10 (10%)
ΤΕΠ	10 (10%)
ΟΥΡΟΛΟΓΙΚΕΣ	6 (6%)
ΛΟΙΠΕΣ	20 (20%)
ΣΥΝΟΛΟ	100

Πίνακας 27: Διασπορά των στελεχών *P. aeruginosa* ανά κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (ΠΓΝΛ)

4.1 Έλεγχος ευαισθησίας

Από τα 100 κλινικά στελέχη *P. aeruginosa*, μετά την αξιοποίηση του αυτοματοποιημένου συστήματος Vitek-2, τα 23 (23%) στελέχη βρέθηκαν να μη είναι ανθεκτικά σε κεφαλοσπορίνες και σε καρβαπενέμες, ενώ να υπόλοιπα 77 (77%) στελέχη παρουσίασαν αντοχή σε τουλάχιστον μία από αυτές. Επιπλέον, τα στελέχη αυτά εμφάνισαν αντοχή και σε άλλα αντιβιοτικά όπως: 35 (35%) στελέχη εμφάνισαν αντοχή στη αμικασίνη, 51 (51%) στην τομπραμυκίνη, 62 (62%) στη σιπροφλοξασίνη και 34 (34%) στη αζτρεονάμη. Τα MICs δεδομένα ερμηνεύτηκαν σύμφωνα με τα κριτήρια της EUCAST, τα οποία φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Αντιμικροβιακός Παράγοντας	MIC breakpoints (mg/L)		Αντιμικροβιακός Παράγοντας	MIC breakpoints (mg/L)	
	S ≤	R >		S ≤	R >
Κεφαλοσπορίνες			Αμινογλυκοσίδες		
Κεφεπίμη (Cefepime)	0.001	8	Αμικασίνη (Amikacin)	16	16
Κεφταζιδίμη (Ceftazidime)	0.001	8	Γενταμυκίνη (Gentamicin)	IE	IE
			Τομπραμυκίνη (Tobramycin)	2	2
Καρβαπενέμες					
Ιμιπενέμη (Imipenem)	0.001	4	Πενικιλίνες		
Μεροπενέμη (Meropenem)	2	8	Πιπερακιλλίνη (Piperacillin)	0.001	16

			Piperacillin/Tazobactam	0.001	16
Φθοροκινολόνες			Τικαρκιλλίνη (Ticarcillin)	0.001	16
Σιπροφλοξασίνη (Ciprofloxacin)	0.001	0.5	Ticarcillin/Clavulanic Acid	0.001	16
Λεβοφλοξασίνη (Levofloxacin)	0.001	1			
			Μονοβακτάμες		
Κολιστίνη (Colistin)	2	2	Αζτρεονάμη (Aztreonam)	0.001	16

Πίνακας 28: Η ευαισθησία των *P. aeruginosa* σε κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες και διάφορα άλλα αντιβιοτικά.

Αξίζει επιπλέον να σημειωθεί ότι από τα 77 στελέχη *P. aeruginosa* τα οποία εμφάνισαν ανοχή σε κεφαλοσπορίνες ή καρβαπενέμες τα 34 στελέχη βρέθηκαν θετικά στην ύπαρξη του γονιδίου bla_{VIM}, το οποίο ευθύνεται για την παραγωγή VIM-τύπου μέταλλο-β-λακταμάση. Οι VIM έχουν την ικανότητα υδρόλυσης όλων των β-λακταμών (με εξαίρεση τις μονοβακτάμες), συμπεριλαμβανομένων των καρβαπενεμών.

4.2 Τυποποίηση στελεχών με MLST

Η τυποποίηση στελεχών *P. aeruginosa*, με τη μέθοδο MLST, έγινε μέσω του βιοπληροφοριακού ιστοτόπου PubMLST όπου εισήχθησαν τα προφίλ των αλληλομόρφων των στελεχών. Ο σύνδεσμος ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για αυτό το σκοπό είναι :

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

Τα αποτελέσματα που πήραμε τα καταγράψαμε στον παρακάτω πίνακα:

ST	Αρ. Στελεχών	bla _{VIM} -θετικά	Ανθεκτικά σε αντιβιοτικά			
			Κεφεπίμη (Cefepime)	Κεφταζιδίμη (Ceftazidime)	Ιμιπενέμη (Imipenem)	Μεροπενέμη (Meropenem)
10 new	1	-	-	-	-	-
16	1	-	-	-	1	-
17	2	1	2	2	2	2
110	1	-	-	-	-	-
111	25	17	19	21	22	15
112	4	3	3	3	4	4
155	1	1	1	1	1	-
235	9	2	7	4	6	5
242	2	-	2	2	2	-
244	5	-	-	-	2	-
253	3	1	1	1	1	1
274	5	-	2	3	4	1
277	3	-	3	3	3	3
304	12	6	5	5	8	7
309	8	-	2	2	4	3

317	1	1	1	1	1	1
323	2	2	2	2	2	2
351	1	-	-	-	-	-
395	1	1	1	1	1	1
554	1	-	1	-	-	-
650	1	1	-	-	-	-
774	1	-	-	-	-	-
932	3	-	1	-	-	-
1009	1	-	-	-	-	-
1327	1	-	-	-	-	-
1621	1	-	-	-	-	-
2293	1	-	-	-	-	-
3160	1	-	-	-	-	-
3191	2	-	-	-	2	-

Πίνακας 29: Αντιστοίχιση των στελεχών σε STs.

Συνοπτικά, λοιπόν, μπορούμε να πούμε ότι βρέθηκαν 29 διαφορετικοί κλώνοι (STs) με τα περισσότερα στελέχη να ανήκουν στους κλώνους 111 (n=25), 304 (n=12), 235 (n=9) και 309 (n=8).

4.3 Έλεγχος ύπαρξης CRISPR/Cas συστημάτων στα στελέχη *P. aeruginosa*

Από τα 100 στελέχη *P. aeruginosa*, λοιπόν, θετικά για CRISPR/Cas συστήματα βρέθηκαν τα 36 στελέχη, εκ των οποίων τα 9 δεν ήταν ανθεκτικά σε καρβαπενέμες σε σχέση με τα υπόλοιπα 27 στελέχη (10 στελέχη από αυτά βρέθηκαν θετικά για το *bla_{VIM}* γονίδιο). Πιο συγκεκριμένα, στα στελέχη που διαθέταμε, εντοπίσαμε και τα τρία διαφορετικά CRISPR/Cas συστήματα. Από 9 στελέχη τύπου I-C CRISPR/Cas συστημάτων [ST235 (n=5), ST304 (n=3) και ST323 (n=1)], βρέθηκαν όλα ανθεκτικά για καρβαπενέμες εκ των οποίων τα 4 ήταν και θετικά για την ύπαρξη του γονιδίου *bla_{VIM}*, από 8 στελέχη τύπου I-E CRISPR/Cas συστημάτων [ST112 (n=3), ST395 (n=1), ST554 (n=1), ST1327 (n=1), ST1621 (n=1) και ST3160 (n=1)], βγήκαν τα 4 ανθεκτικά σε καρβαπενέμες και επίσης 4 παρουσίαζαν το *bla_{VIM}* γονίδιο και τέλος, από τα 19 στελέχη τύπου I-F CRISPR/Cas συστημάτων [ST244 (n=4), ST253 (n=3), ST274 (n=3), ST242 (n=2), ST3191 (n=2), ST16 (n=1), ST17 (n=1), ST309 (n=1), ST317 (n=1) και ST774 (n=1)], τα 14 ήταν ανθεκτικά για τις καρβαπενέμες και μόνο 2 στελέχη διέθεταν το γονίδιο *bla_{VIM}* (Πίνακας 30).

CRISPR/Cas σύστημα	Αριθμός στελεχών	STs	Καρβαπενέμες		<i>bla_{VIM}</i> -θετικά
			Ευαίσθητα	Ανθεκτικά	
I-C	9	235 (n=5) 304 (n=3) 323 (n=1)	-	9	4
I-E	8	112 (n=3) 395 (n=1)	4	4	4

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

Πίνακας 30: Ταξινόμηση των CRISPR/Cas-θετικών στελεχών *P. aeruginosa*.

Θα αποτελούσε παράληψη να μη γίνει αναφορά και στα υπόλοιπα 64 στελέχη τα οποία βρέθηκαν αρνητικά για τα CRISPR/Cas συστήματα και τα οποία ανήκαν σε 17 διαφορετικούς κλώνους (STs). Το 46,9% (n=30) αυτών των στελεχών ανήκαν στον κλώνο ST111. Είκοσι-τρία στελέχη αρνητικά για CRISPR/Cas συστήματα κατηγοριοποιούνται στους κλώνους 235 (n=2), 274 (n=2), 277 (n=3), 304 (n=7), 309 (n=6), και 932 (n=3), ενώ τα έντεκα εναπομείναντα στελέχη *P. aeruginosa* ανήκαν σε διαφορετικούς κλώνους [ST10 (n=1), ST17 (n=1), ST110 (n=1), ST112 (n=1), ST155 (n=1), ST244 (n=1), ST323 (n=1), ST351 (n=1), ST650 (n=1), ST1009 (n=1) και ST2293 (n=1)]. Επίσης, παρατηρήσαμε ότι σε ορισμένους κλώνους, όπως οι 244, 274, 235, 304 και 323, υπήρχαν στελέχη τα οποία κάποια ήταν θετικά και κάποια άλλα αρνητικά για CRISPR/Cas συστήματα, ενώ υπήρξε και κλώνος (ST111) του οποίου όλα τα στελέχη ήταν αρνητικά για τα συστήματα αυτά.

4.4 Ανάλυση των CRISPR συστοιχιών

Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα BioEdit, πήραμε τις Forward και Reverse νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των CRISPR συστοιχιών κάθε δείγματος. Έπειτα μέσω του προγράμματος Blastn, προσπαθήσαμε να «δημιουργήσουμε» αλλά και να «επιδιορθώσουμε» όσο το δυνατόν το μεγαλύτερο μέρος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, δηλαδή βρήκαμε πού υπάρχει ταύτιση μεταξύ Forward και Reverse του ίδιου δείγματος και στη συνέχεια ενώσαμε τις δύο αλληλουχίες.

Στη συνέχεια, έχοντας τη διορθωμένη πλέον νουκλεοτιδική αλληλουχία, χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα CRISPRfinder program online προκειμένου να βρούμε πληροφορίες σχετικά με τις αλληλουχίες που διαθέταμε, όπως το μήκος και την αλληλουχία των direct repeats αλλά και των spacers.

CRISPR id: tmp_1_Crispr_1

- CRISPR start position: 124 ----- CRISPR end position : 641 ----- CRISPR length : 517
- DR consensus : CGGTTTCATCCCCACACCCCGTGGGGAACAC
- DR length: 29 Number of spacers : 8

124	CAGCTCATCCCCACGCCCGTGGGGAACAC	CCCCACCCCTGGCCGCGGGTTGGGTCTTCCAT	184
185	CGGTTTCATCCCCACACCCCGTGGGGAATAC	CCCAGTCCGTTGGAATTGCTGCCCTGGAGCAG	245
246	CGGTTTCATCCCCACACCCCGTGGGGAACA	CGCCCGCGTGAAGGAGGCCGCATCTGATGCAGG	307
308	CGGTTTCATCCCCACACCCCGTGGGGAACAC	ATGCACTGGTGCAGCGATATCCGCCAGGACTA	368
369	CGGTTTCATCCCCACACCCCGTGGGGAACAC	CCGACGTAGGGGTTTCGGGGTGTGTCCGCGAG	429
430	CGGTTTCATCCCCACACCCCGTGGGGAACAC	GACTTTCACGACAGTTGCAAAGCTCGGGTTGC	490
491	CGGTTTCATCCCCACACCCCGTGGGGAACAC	GCAAAGTGGGCCCGTGCCATGCACGTCGCCGTC	551
552	CGGTTTCATCCCCACACCCCGTGGGGAACAC	CGGGTCGGTGGTCAGGGCGGTCATAGCGCCTC	612
613	CGGTTTCATCCCCACACCCCGTGGGGAACAC		641

Εικόνα 25: Πρόγραμμα CRISPRFinder online

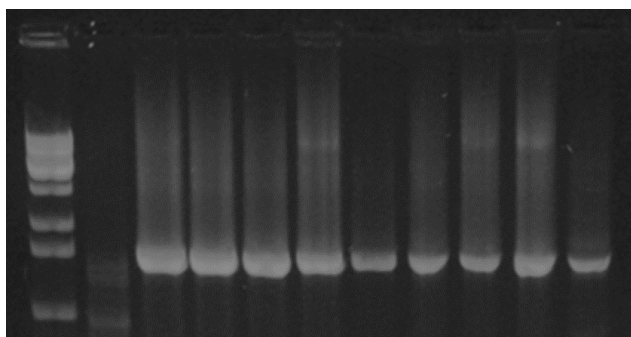
Έπειτα, μέσω του προγράμματος Blastn αναλύθηκαν οι αλληλουχίες spacers προκειμένου να προσδιοριστεί η προέλευση της πληροφορίας αυτής (αλληλουχία από χρωμόσωμα του *P. aeruginosa*, φάγο, πλασμίδιο κ.α.). Τα spacers που λάβαμε υπόψιν παρουσίαζαν όλα υψηλό αποτέλεσμα πιστότητας (identity scores) [100% coverage, ≥90% identity].

Συνολικά 198 (46,6%) spacers βρέθηκαν να ταιριάζουν με χρωμοσωμικές αλληλουχίες της *P. aeruginosa* ή ήδη χαρακτηρισμένες CRISPR συστοιχίες αυτής (n=104). Εξήντα-εννέα (16,2%) spacers δεν βρέθηκαν να έχουν κάποια ομοιότητα με αλληλουχίες που είναι κατατεθειμένες στη βάση δεδομένων GenBank, υποθέτοντας ότι ένας σημαντικός αριθμός γενετικών χαρακτηριστικών δεν έχει χαρακτηριστεί ακόμα. Μέσω BLASTn παρατηρήσαμε ότι 138 (32,5%) spacers ταιριάζουν με αλληλουχίες φάγων, όπως οι MD8 (GenBank accession no. NC_031091), phi (GenBank accession no. KT887558), PP9W (GenBank accession no. MZ773939), D3 (GenBank accession no. AF165214), phiCTX (GenBank accession no. AB008550) και UMP151 (GenBank accession no. MK934841) (Πίνακες 31, 32 & 33). Επιπλέον, ταιριάξαμε άλλα 15 spacers με αλληλουχίες πλασμιδίων, όπως οι pMS14403A (GenBank accession no. CP049162), pSE5419-1 (GenBank accession no. CP081347) και pJHX613 (GenBank accession no. CP020602), οι οποίοι βρέθηκαν να έχουν χαρακτηριστεί ήδη από στελέχη *P. aeruginosa*, και πλασμίδια όπως το pL902 από το στέλεχος L90-1 *Proteus mirabilis* (GenBank accession no. CP045255) και το pEC743_4 από το στέλεχος Ecol_743 της *E. coli* (GenBank accession no. CP015073) (Πίνακες 31,32 & 33). Τέσσερα από τα τελευταία spacers ταυτοποιήθηκαν με περιοχές που σχετίζονται με την αντιγραφή του πλασμιδίου (plasmid replication), ενώ άλλοι 3 βρέθηκαν να ταιριάζουν με περιοχές που εμπλέκονται με τη συζευκτική μεταφορά (conjugative transfer). Ωστόσο, κανένα από αυτά τα χαρακτηρισμένα πλασμίδια μεταφέρει γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Μόνο 3 spacers ταυτίζονται με γενωμικές νησίδες της *P. aeruginosa* (*P. aeruginosa* genomic islands - PAGI), όπως PAGI-6 και νησίδες παθογονικότητας της *P. aeruginosa* (PAGI-598) (GenBank accession no. MT074675). Τέλος, ένα spacer βρέθηκε να ταιριάζει με θραύσμα του γονιδίου *TraD* ενός ενσωματούμενου συζευκτικού στοιχείου (integrative conjugative element - ICE) (GenBank accession no. MK497171).

4.4.1 Τύπου I-C CRISPR/Cas συστήματα

Όπως ήδη έχει αναφερθεί από ένα σύνολο 100 *P. aeruginosa*, 9 στελέχη βρέθηκαν να φέρουν τύπου I-C CRISPR/Cas σύστημα. Αυτά τα 9 στελέχη βρέθηκαν ότι ανήκουν σε τρεις STs (235 (n=5), 304 (n=3) και 323 (n=1)). Όλα τα στελέχη ανήκαν στο ίδιο κλωνικό σύμπλοκο (Clonal complex 235 - CC235) και είχαν ακριβώς το ίδιο μήκος CRISPR συστοιχίας, τόσο από την ανάλυση της ίδιας της αλληλουχίας όσο και από την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 23). Επιπλέον μέσω του CRISPRFinder προγράμματος είδαμε ότι όλες αυτές οι αλληλουχίες ήταν και ταυτόσημες σε όλη τους την έκταση (ίδια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία και ίδια spacers).

Πιο αναλυτικά, η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (DR consensus) ήταν σε όλες τις I-C συστοιχίες η 5'-GTTTCAATCCACGCGCCCGTGCGGGGCGCGAC-3'. Ο αριθμός των διαφορετικών spacers σε κάθε τέτοια συστοιχία ήταν 20, με μήκος spacers 34-35 bp και το μήκος γενικότερα της συστοιχίας ήταν περίπου 1500bp (Εικόνα 26).



Εικόνα 26: Τύπου I-C CRISPR συστοιχίες

Από ένα σύνολο, λοιπόν, 20 διαφορετικών spacers βρήκαμε ότι τα 6 (30%) προέρχονται από χρωμοσωμικές αλληλουχίες *P. aeruginosa*, 12 (60%) πιθανότατα από αλληλουχία φάγων και 2 (10%) από αλληλουχία πλασμιδίων.

Spacer sequence	Origin
CGCCAGTTTCCAAGTTGAAGCGTTGTCGGTGTACG	chromosome (-)
ACGGTCTACGGCTTTGCCGGCTTCGTGCCTGAGTG	chromosome (-)
GCGTGCTGCGCGAAACCCCGAAAGCGCACATCGT	chromosome (-)
CAAGTCAGGCCGAAGAAAGAGACGATATAGCTGG	chromosome (-)
GGTAGGTTTCATAACTGAAAATCTAGAAAACCGT	plasmid CP081288
ACCTCGCCGGTGCAGATCGAAAACGCCGGTAG	chromosome (hypothetical protein)
CTTCTTGAGATTGTGCAAGACGAATCCCCACTTG	chromosome (hypothetical protein)
GCTTCTGACGTAGCGAGTTGCTGACTGGCGCGTGA	phage (AlpA family phage regulatory protein CP029089.1)
TTCGCGGGCTCGCCATCTTCGGCTCCTGAGGCT	phage (hypothetical protein MZ089728.1)
TCTTCGCATCTGGCGATCCGCGCGGCGAACCGAA	phage (hypothetical protein MK511013.1) plasmid (hypothetical protein CP029091.1)

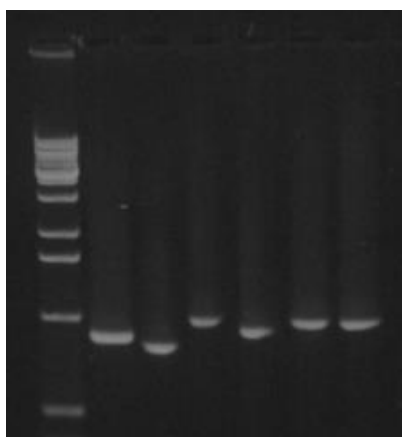
ACGGTCGCGCTGGCGGGATGCGCCGGCCAGGTG	phage (hypothetical protein) AP009624.1
AGCGGCTCATGGCTCCTGCTGTTGCGGAACCT	phage (hypothetical protein) KX198612.1
TATCGCCAGTGAAAACCAGTTTCCACACTGTTCC	phage (hypothetical protein) LN610576.1
TACCGACGCCGGATGTGCCGGACAGGGATGGCGGAG	phage (hypothetical protein) MK511032.1
TTTTGCTCGGCTACGACTGTTGCTCGAGCACGG	phage (hypothetical protein) MN096267.1
TGGTCTGGTGGATTCTGGCACGAAGGTGTGCTGG	phage (hypothetical protein) MZ089728.1
CGCATCCGCGTCGCTTAACCCAACCAGGCGGGGC	phage (major capsid protein) NC_053013.1
ACGATCTCGCAGCAGTAAGCCAGTGCCGGGGTC	phage (replicative DNA helicase) MK511015.1
AGCGCGAAATCCCGTTGGGAGAGAGTTTACACCT	phage (tail length tape measure protein) NC_053013.1
GGCTACACGTTCTTCGCACCCCTCGTTAGAGGAAG	plasmid (hypothetical protein) CP049162.1

Πίνακας 31: Αλληλουχία spacers και πιθανή προέλευση στις I-C CRISPR συστοιχίες

4.4.2 Τύπου I-E CRISPR/Cas συστήματα

Οκτώ στελέχη βρέθηκαν να είναι θετικά για τύπου I-E CRISPR/Cas συστήματα, τα οποία ανήκαν σε 6 διαφορετικούς κλώνους, με τους κλώνους 112 (n=2) και 395 (n=2) να αριθμούν 4 από τα στελέχη αυτά. Όπως ήδη έχουμε αναφέρει, για τα τύπου I-E και I-F CRISPR/Cas συστήματα υπάρχουν 2 CRISPR συστοιχίες για το κάθε τύπο.

Σε αυτή την περίπτωση, και οι 2 συστοιχίες, είχαν ακριβώς την ίδια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (DR consensus) 5'-CGGTTTCATCCCCACGCATGTGGGGAACAC-3' με τον αριθμό των spacers σε κάθε συστοιχία να κυμαίνεται μεταξύ 9-12 για την CRISPR1 συστοιχία και 6-9 για την CRISPR2 συστοιχία και το μήκος των συστοιχιών περίπου 750-900bp και 700-850bp, αντίστοιχα (Εικόνα 27). Επιπρόσθετα, τα στελέχη τα οποία ομαδοποιούνταν στο ίδιο κλωνικό σύμπλοκο 395 (CC395; ST112 και ST395) έφεραν παρομοιότυπες CRISPR συστοιχίες, ενώ τα υπόλοιπα στελέχη, τα οποία ανήκαν σε διαφορετικά STs, εμφάνιζαν ποικιλομορφία στις συστοιχίες αυτές.



Εικόνα 27: Τύπου I-E CRISPR συστοιχίες

Σε αυτή την περίπτωση, από ένα σύνολο 80 διαφορετικών spacers, τα 39 (49%) βρήκαμε να προέρχονται από χρωμοσωμικές αλληλουχίες *P. aeruginosa*, 23 (29%) πιθανότατα από φάγους, και 6 (7%) από πλασμίδια. Επίσης, 1 (1%) βρέθηκε να ταιριάζει με νησίδα παθογονικότητας της *P. aeruginosa* (*P. aeruginosa* pathogenicity island-PAGI) και 1 (1%) με ενσωματούμενο συζευκτικό στοιχείο (integrative conjugative element-ICE). Αξίζει να σημειωθεί ότι 10 (13%) αλληλουχίες spacers δεν μας έδωσαν κάποιο αποτέλεσμα μέσω του προγράμματος Blastn καθώς δεν υπήρχε καμία ομοιότητα με τις ήδη υπάρχουσες πληροφορίες αλληλουχιών που βρίσκονται κατατεθειμένες στη βάση δεδομένων.

Spacer sequence	Origin
ATCGTCTCCAGCAGCACGCGGACGCGGTCTT	chromosome (-)
CTTCAGCGCGGGTCAATGGCGCCGATGGTGCC	chromosome (-)
GATGATGGCCTGGCTGGTGAATCCCTCGGATG	chromosome (-)
GTGACCTCGCCAGTGGCGTCCGGCACGAGCAC	chromosome (-)
GCCCCGCCGTTCTGTGCTGTTGTAGAACGAGAA	chromosome (-)
CACCCCCACCCCTGGCCGCGGGTTGGGTCTTCAT	chromosome (-)
ACACGCCCGCTGAAGGAGGCCGCATCTGATGCAGG	chromosome (-)
CACATGTCTCGTACCGGGCTGGAGTCTCGCATCGA	chromosome (-)
CTGACCTTCGATGAAATCAAGCAGTCGCCTGA	plasmid (conjugal TraL) CP077998
TGAGTAGGCTACCTGGATACAAGGTGCGTCGT	chromosome (-)
CGCCCGCTGAAGGAGGCCGCATCTGATGCAGG	chromosome (-)
CTGGCGCTGGCGGGTAGGAGGCAGTCCGAGG	chromosome (-)
CAGGCAGCCAGTGCAGCCGCCACGATCGATGA	chromosome (-)
GGCGTGCTCCTGGCCAAGGGCAAGGAATACCT	chromosome (-)
TCTGCGGTGCTCGGGGCGGTCCGCTCCATCAC	chromosome (-)
CTGGTCAGCAACTGCAGCCAGGTGGCCCGCTG	chromosome (-)
CTATCTCGTAGGCCAGTCGCCGCTCTGCTGTT	chromosome (-)
CCCCACCCCTGGCCGCGGGTTGGGTCTTCAT	chromosome (-)
ATGCACTGGTGACGCGATATCCGCCAGGACTA	chromosome (-)
ATCACGATCATTTTTCGCGATCCGATCCGGCT	chromosome (acetyltransferase) LR134309.1
TTCGGCTACGCCGCAGCTCGCAGATCACCTG	chromosome (DEAD/DEAH box helicase family protein) CP050335.1
TGCACATTCCTGACCATGAGCACCTGAAAAA	chromosome (DNA polymerase III beta subunit, central domain protein) CP027172.1
GGCCGAGCGCTGAGGCTCGATCAACTGCGGTC	chromosome (DUF159 family protein) CP043328.1
ACCTGACCAGTTGGGTTTAGCCCTTCTACTA	chromosome (hypothetical protein)
GTACTIONCAGCAGGATTTTCGCCACCTTGTCGG	chromosome (hypothetical protein)
CAATGAGCCGAGGCCACCCCTCAGCCAATTCA	chromosome (hypothetical protein)
TACCCAGTCCGTTGGAATTGCTGCCCTGGAGCAG	chromosome (hypothetical protein)
CACCTCGTCCAAGCCTGTACGACGATTCGTGCCA	chromosome (hypothetical protein)
CGGAGGAATGTGTGATGGCCGTTTTCGAACTC	chromosome (hypothetical protein)
TGTTGACGGTCCACCCGAACGAATGAGCCG	chromosome (hypothetical protein)
CCCAGTCCGTTGGAATTGCTGCCCTGGAGCAG	chromosome (hypothetical protein)

TCATGCGAGGCGGCGGGGGCGCAGCAGACCCA	chromosome (hypothetical protein)
TGCAAAGACACAAGCGGCCATTGCGTTCCAG	chromosome (hypothetical protein)
TGGCGCTTCTCCCCTGGCGCTGGGCGTTGGT	chromosome (hypothetical protein)
GCCGAGCAGCATTGGCCGTTGCGGCCAGCGC	chromosome (hypothetical protein)
TCTTCAGGTGCCGGTAGGTGCTGCTCAGCGGC	chromosome (IcR family transcriptional regulator CP034908.2) (helix-turn-helix domain-containing protein CP046405.1)
GCTGGCACGATCAGCGGCGGCCTTGGTCTG	chromosome (methyl-accepting chemotaxis protein) CP050324.1
GCCGGCGGCGATCAGCTCGCGGATGCGGGCT	chromosome (phosphoadenosine phosphosulfate reductase CP050332.1) (DNA sulfur modification protein DndC CP058331.1)
CCATCGAATCGGCTGAGCTACAAGCGCATCGC	chromosome (Putative SOS response-associated peptidase YedK CP012901.1) (DUF159 family protein CP028959.1)
ATCGGCAATCCACTGCACAATGCCCCGCAAGA	chromosome (right-handed parallel beta-helix repeat-containing protein) CP080518.1
ATCATGTTGCGCGGGATGTTCTTCTCGTTGAG	ICE (Type IV conjugative transfer system coupling protein TraD) MK497171.1
TTCCCGGCTTGCCTGTGTGCGAGAAGACCAA	No significant similarity found
CTTCTCTTACTCATTCCCCACCTCCCATAGA	No significant similarity found
ATGCGCGCCATTCTGCGGGCAGGGTGGCCGC	No significant similarity found
TCGCCACGGCGAACGCCGCGCCAGGTCGGTTTC	No significant similarity found
TGAAGTTCAGAGCGAATCTGGTTGTTACGA	No significant similarity found
ACCACCGAGGCCATTGAAACAATCAATGGGC	No significant similarity found
TGGACCAGTCCATACAGGTCCTGCAGATGCGG	No significant similarity found
TCCCGTTGTTGCTCTGAAACGCCTCCCAT	No significant similarity found
GACTTTCACGACAGTTGCAAAGCTCGGGTTGC	No significant similarity found
GCAAAGTGGGCCGTGCCATGCACGTCGCCGTG	No significant similarity found
AGCGCCTTGGGTACGTTTGCCTGGCGCCAC	pathogenicity island crpP (integrating conjugative element) MT074675.1
CCGGATGGCTACCGCTGATCCGCCTCGAACA	phage (hypothetical protein) AB910393.1
CAGTTCAGCGCGGACAAACGCCGTTGCCATC	phage (hypothetical protein) MK510993.1
TTCACGCGACGATAGCGAGACATGGCTTACTC	phage (hypothetical protein) MK511016.1
GGTGTGGTTGGGGTTCTCAGCAGTGATCGTGA	phage (hypothetical protein) MK511036.1
CACAGGTCCATGCGGTGCGGCCATTCGATGATCGC	phage (hypothetical protein) MK511038.1
CACGACTTGGCGCGATCATGGCCTCCAACCTCCTC	phage (hypothetical protein) MZ285879.1
TTCAGACGCGCCGCGCTGGCCGCCTATCGCCA	phage (hypothetical protein) NC_031091.1
CCGACGTAGGGGTTGCGGGTGTGTCCGCGAG	phage (major head subunit protein MK144667.1) (major capsid protein MK511038.1)
CAAGGCGGTGTCATCATGATGCGCCGCTCTA	phage (N-deoxyribosyltransferase-like protein) NC_031091.1
GATCGCCGCTTATCTCAGCAAACGAAGACT	phage (PBSX family phage terminase large subunit) CP050324.1
CAAGGAGGCAATGGAGTTCGGCCCGGTCAAGT	phage (phage tail protein) CP033084.1
TCGCACGAACCCTCGGGTATCAGCTGATGAA	phage (prophage PSPPH05, DNA-binding protein) LR134309.1
ACCTCGCCGGTCGTGAGGTTGCGTACTTGAC	phage (putative host-nuclease inhibitor protein)

	KU199708.1
AGCTTCTGTGCGCCATCGGCGCATCGTTGGT	phage (putative phage-related membrane protein LR134309.1) (zonular occludens toxin family protein CP029097.1)
GAAGCTGTCTACGTCATCCGCCTGGATGACCA	phage (repressor MK511038.1) plasmid (XRE family transcriptional regulator CP029714.1)
TTGCTAACGGTGTTCGGTGCAAGGCTGAACAC	phage (site-specific integrase MK819239.1) (shufflon-specific DNA recombinase MK511014.1)
GCGACTTCGCGGATCGCATCGCCGAGTTTAC	phage (tail fiber protein) KU199710.1
AGGTCCATGCGGTGCGGCCATTTCGATGATCGC	phage (terminase large subunit) KM233689.1
CCAGGGGCGATACCCATGCGCCGCGCGACTTC	phage (transcriptional regulator) NC_031091.1
CGGATGTCCTGGAGCACGTCCAGGCGTGCCGC	phage (virion morphogenesis protein) MK511038.1
TCGTAGAACCAGACCCGAGCCCCGGCCAGATG	phage (Virion structural protein) JQ067085.2
GCGGTGCGGTGGTCAGGGCGGTTCATAGCGCCTC	phage (virion structural protein) KM233689.1
CAGCCGTTCCCGCACGTTGTGAGTCCTGG	phage (zonular occludens toxin) CP030912.1
GAACTCGCTGTTGTCGCGTAGGTTACCCAGCGC	plasmid (DNA topoisomerase 3) CP089066.1
GACGGACGGCAGCATTTGCGCGTGTCCGAGG	plasmid (fertility inhibition factor FiwA) CP045255.1
CACTTGAAGTCAGGGTCGATAACCCAAGTTTGGC	plasmid (hypothetical protein) CP049162.1
TCGGTGCCTCTCGGGAGGGCGACGCATTGAGG	plasmid (replication initiator protein A) CP077998.1
ACCAGTTCGGCGAAGTCGTCGCGGCTCGCTGC	plasmid (replication protein RepA) CP020602.1

Πίνακας 32: Αλληλουχία spacers και πιθανή προέλευση τους στις I-E CRISPR συστοιχίες

4.4.3 Τύπου I-F CRISPR/Cas συστήματα

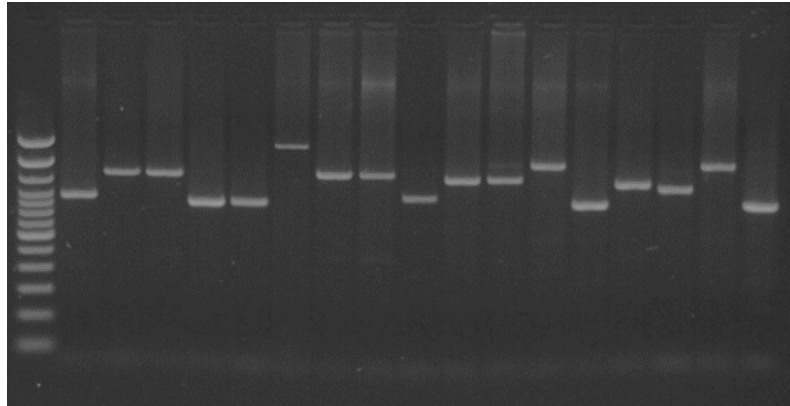
Τα περισσότερα στελέχη, 19 σε αριθμό, από τα θετικά σε CRISPR/Cas συστήματα, βρέθηκαν να φέρουν τύπου I-F συστήματα και να ταξινομούνται σε 9 διαφορετικούς κλώνους. Δεκαπέντε από τα τύπου I-F θετικά στελέχη ομαδοποιούνται στους κλώνους 244 (n=4), 253 (n=4), 242 (n=3), 274 (n=2) και 3191 (n=2). Τα 4 στελέχη που υπολείπονται, ανήκουν το καθένα σε διαφορετικούς κλώνους.

Και σε αυτή την περίπτωση, η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία και στις δύο συστοιχίες των I-F συστημάτων ήταν ακριβώς η ίδια : 5'-TTTCTTAGCTGCCTATACGGCAGTGAAC-3'. Κάθε συστοιχία είχε αριθμό spacers που κυμαίνονταν από 12-27 για την CRISPR1 συστοιχία και 3-28 για την CRISPR2 συστοιχία, με μήκος spacers περίπου 32 bp και μήκος συστοιχίας περίπου 900-2000bp και 600-2000bp, αντίστοιχα (Εικόνα 28).

Αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα στελέχη με ST242 εμφάνισαν πανομοιότυπες CRISPR1 και CRISPR2 περιοχές. Παρόμοιες αλληλουχίες παρατηρήθηκαν επίσης για την CRISPR1 περιοχή των στελεχών που ανήκουν στους κλώνους 244 και 253, σε αντίθεση με την CRISPR2 περιοχή που διέφερε. Η CRISPR1 περιοχή του στελέχους Rae2542 ήταν ίδια με την αντίστοιχη περιοχή του στελέχους Rae2488. Αν και τα δύο αυτά στελέχη ανήκαν στον κλώνο 3191, η CRISPR1 περιοχή του Rae2488 περιελάμβανε 5 επιπλέον spacers, υποδηλώνοντας πιθανό εξελικτικό απόκτημα. Επίσης, τα πρώτα 12 spacers της CRISPR2

περιοχής, των στελεχών Pae2542 και Pae 2488, ήταν ίδια. Τα στελέχη Pae2154 και Pae2486 τα οποία ήταν στον κλώνο 274 εμφάνισαν 8 και 9 spacers, τα οποία ήταν κοινά στην CRISPR1 και CRISPR2 περιοχή αντίστοιχα. Τέλος, σε τα υπόλοιπα στελέχη, οι CRISPR1 και CRISPR2 περιοχές διέφεραν τόσο στον αριθμό όσο και στην αλληλουχία των spacers.

Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν τη συνεχή εξέλιξη των CRISPR/Cas συστημάτων, μέσω της απόκτησης νέων spacers, τα οποία μπορεί να υποδηλώνουν την εμπειρία των στελεχών με κινητά γενετικά στοιχεία.



Εικόνα 28: Τύπου I-E CRISPR συστοιχίες

Έτσι, λοιπόν, από ένα σύνολο 325 διαφορετικών spacers βρήκαμε, με τη χρήση του Blastn λογισμικού, ότι τα 153 (47%) προέρχονται από το χρωμόσωμα του *P. aeruginosa*, 103 (32%) πιθανότατα από φάγους και 8 (2%) από πλασμίδια, 2 (1%) με νησίδια παθογονικότητας της *P. aeruginosa* ενώ τα υπόλοιπα 59 (18%) spacers δεν παρουσίαζαν ομοιότητα με γνωστές αλληλουχίες.

Spacer sequence	Origin
AAAAAGCCCAGCTCGAAGGCTGGGCTTTTTCT	chromosome (-)
AACCAGCGTGTGATGCCGAAGCGAAGGCCCG	chromosome (-)
AACCAGGGCGGATAAAAATCTGCCCTTCTGGATT	chromosome (-)
AAGAGGCTCACATCGCTCATAGCGTCCTGGGC	chromosome (-)
AAGAGTCGCGGCGACAACCTACCAGACGTCCGC	chromosome (-)
AAGGACTCTGATCTCTTGACTCACCATTTCT	chromosome (-)
AATCGTGCTCGAGATACCAGCCATCCGCGCAC	chromosome (-)
AATCTGAAACGCATTGGCGAAATACACCACCG	chromosome (-)
AATGCGGTCCTGCGCATCCGAACTGGTAAGTG	chromosome (-)
AATGGAGAGCAGTTCAGGTGCCGAGCAATCA	chromosome (-)
ACAACATCAATCGCCTGATGCTGGGGCACCTG	chromosome (-)
ACAGGTGATCCAGCACCAGGCCGTGAGGTATC	chromosome (-)
ACCAGCTGCTGCGTGCTGGTTTCGCGCTGGC	chromosome (-)
ACCCAGTCAAATCAGTCCCCGCGCTCGTATCG	chromosome (-)
ACGCTACAAAGTCGACGTTGGCACTTTTATGC	chromosome (-)
ACGTCAATGCAGAACTCGAACGTCGTGTGCAT	chromosome (-)

ACTGATCGGGTACTACTGCGGGCCATCGGCT	chromosome (-)
ACTGGAGATACGTGCACAGATCGGACGACACG	chromosome (-)
AGCAATGGAAAGCAGCGATGTGACCCGACCCG	chromosome (-)
AGCCCCCTCGGTTGGTGGAGCACCTGGCGCA	chromosome (-)
AGCCGATGGCCCGCAGTAGTACCCCGATCAGT	chromosome (-)
AGCTGGCCAGCTCGGTGAACGCCGGGCTGTCA	chromosome (-)
AGGAATCGCCACGCGGTAACACACTTCATAC	chromosome (-)
AGGCACTGCAGGCCTACCGGCGTACCCTGCGC	chromosome (-)
AGGCAGACGAGTACGCGCGGTCTCGGAAGTG	chromosome (-)
AGGGGTTCTGCAATTACTCGCTGCGAAGTACT	chromosome (-)
AGGTGATGCCCACTGTGCAGTCAACTCTTTTC	chromosome (-)
AGTGCGGGGTTGAAAAGTGGCTGGGGCGTGAT	chromosome (-)
ATATCGTGCCTGTCTTGCAGTCCTATCACCCC	chromosome (-)
ATCCCCACCGTCTCCACCGTCGCCCGGATCAG	chromosome (-)
ATGCGGATAAGGCCCGCAGGCGCCGAATTGGC	chromosome (-)
CAAATGCTGGTCTCGGCTGACAAAATTGAGGA	chromosome (-)
CAAGTTCGGGTGAGAGCTGGCAGCACACAC	chromosome (-)
CACGACGCCCTGTGATCGCAGTACGCGGCCA	chromosome (-)
CACGGCATCACACGCGAGACGCACTACTGCGC	chromosome (-)
CAGCAGCGGCTCCAGGAAGAGGGGCGTGCCT	chromosome (-)
CAGGTAGACGCGGACATCAAGCCCGCGTGAA	chromosome (-)
CAGGTGCCGGAGCAGTTCGACCCGTCGATGTT	chromosome (-)
CAGGTGTCGGGAACCCGTGGCCGGGGATGGT	chromosome (-)
CCAGTTCGAGCTGCGCGCTGATCAGAGTGCCA	chromosome (-)
CCCTCTATTGCGGGATTTTTCCCCCTTCGA	chromosome (-)
CCGCCGGCGCCGGAGGCCAGTTGACCTTGAT	chromosome (-)
CCGGTGGCTGTTGTGGCCGAGGTGGGTTGAG	chromosome (-)
CGAAAGCCCCGAGGACAATGACTTGATATC	chromosome (-)
CGCTGCCATCCGGCGATTTCCCTTCATAGC	chromosome (-)
CGGAGATCGAGGAGCCACTGCCGATTTGTTC	chromosome (-)
CGGCGGTCTGGCTGCTGCGGCGGCTGTGACT	chromosome (-)
CGGGCGCTTGCGCCGGATCGGCGAATTGGATG	chromosome (-)
CGTCGCGGGTGGTTCGATCCATCCCCGACCT	chromosome (-)
CGTCTCGATGCTGCGTCGATGAGCGTCTGT	chromosome (-)
CGTGCCGGCTGGTTTCCGCATGTGCGGAGAC	chromosome (-)
CTTTGGACCCGCTACTATCACGGGCATATACA	chromosome (-)
GAAATGCTGGTCTCGGCTGACAAAATTGAGGA	chromosome (-)
GAAGCAGCCCTTGAGTCATTTGCGACCGGTT	chromosome (-)
GAAGTGGGTCGAGTTCGATACGCCTGAGGAGT	chromosome (-)
GACAACCAGCTGGCTCAGCCGGTTGTGCTCAA	chromosome (-)
GACAAGAAACTGTTGGCCGAGCATCGGCACCG	chromosome (-)
GACAGCTACCAGTCCGACATATCAACGCGCA	chromosome (-)
GACGGCGATGCGGCAACCCTAGCGGCGTCGAA	chromosome (-)

GAGAACGATTCCGTCTTGTGGAGCTTTCTGT	chromosome (-)
GAGAGCCGCAGGGAGCGGGGCCGCAAACCTC	chromosome (-)
GAGAGCCGCAGGGAGCGGGGCCGCAAACCTCT	chromosome (-)
GAGATCATCCGGCGCAAGCGGGAACAGCTGCT	chromosome (-)
GAGATTGTCGGCGAGCTGATCCGTTTCATTTT	chromosome (-)
GAGCAGGTCAACACCGCGCTGGCCGCGCAACA	chromosome (-)
GAGTCCAATGGGTTTCGCTCCGGTTTCTGAGT	chromosome (-)
GAGTGTGAGGCCGGGCAAACGGATTTGT	chromosome (-)
GATCTGGGGCGGCATCATCACAGCAGAATCTA	chromosome (-)
GCCACCACATCGGAGTCATGCACGACCCTGAC	chromosome (-)
GCCAGCCGAATCGGTCGGCCTCGTCAGGGAAA	chromosome (-)
GCCCCCTCGGTTGGTGGAGCACCTGGCGCA	chromosome (-)
GCCTGGACGGGCCGAACAGGTCCAGGCCGCA	chromosome (-)
GCGACGGTCTTTGTCGGCGCCCTGGGCGTCAA	chromosome (-)
GCGGCCTCTGTGGGCGTTCCTGATGTCGATCA	chromosome (-)
GCGGCCTCTGTGGGCGTTCCTGATGTCGATCAT	chromosome (-)
GCGTGCTGTTCAACGACGGGCCGGTCATTCCA	chromosome (-)
GGCAGCAGCACGACATCACAATTGAACGCCAC	chromosome (-)
GGCGAGCTACCGCCGACGTGGGGCCACTACGA	chromosome (-)
GGCGGGGATGGAAGCTTGCCTCGGGGATGCC	chromosome (-)
GGGAAGTTTGATCAGCATGGCAATCTCCTTTA	chromosome (-)
GGGAGGGCATGTGATGCGAGCAGACGAGTACC	chromosome (-)
GGGATGCCCGGACATTGCTCTAGCAGTGTGAA	chromosome (-)
GGGCACGCCGTGGGTTGGTGTGATTCGGGT	chromosome (-)
GGGTCAGTCGGCGTCTTGACGCACGTCGTGCCT	chromosome (-)
GGGTTTTGACTATTGTGCGACCCGCTCTGGAG	chromosome (-)
GGTCCC CGGAAACGTCCCATGTCCGGCATCA	chromosome (-)
GTAGCAGAGAACTCAACAGCCCCGACTGGACG	chromosome (-)
GTATGGCTCTCTCATTGGGGTGGCGATACTC	chromosome (-)
GTGAAGCTGCCGCGGATCGACGCGCTGTGCAT	chromosome (-)
GTGGATCCCAACCGGCCCGAAGGCTCCGGTT	chromosome (-)
GTTGAGTGCAGCAAACACACAGAGCTTTG	chromosome (-)
GTTTGCAGGAAGCGGCGCTATCGACCGAACT	chromosome (-)
TACCGTTCGATCCAGCTTCGCCAGCAGGCGAG	chromosome (-)
TACTACGACGACGCTTTCGAGGCTGATATTCA	chromosome (-)
TACTACGCCGCGCCCGCCCGGGGCGACCGAGCA	chromosome (-)
TACTACGCCGCGCCCGCCCGGGGCGACCGAGCT	chromosome (-)
TACTGGAGGTGTCGGAGTTCGAGCCGAGCCAG	chromosome (-)
TCAAGTTCGGGTCCGAGCTGGCCGCACACCT	chromosome (-)
TCAGGCTCATTTCGTTGTCTCGATGCCCGG	chromosome (-)
TCATTCCAGACCATGGCCGCTCACTACTGAGC	No significant similarity found
TCCC GCGGATACATGATCTGGTGGTGTGCTC	chromosome (-)
TcCCTCGAACACGCCATCAGCAGCCTGGAGGT	chromosome (-)

TCCGGATCACCAGGGCGACAGATGGCCACCTC	chromosome (-)
TCCTTCGGCTCCGCCGGCCGGATCGCTGCAT	chromosome (-)
TCGAACATCGGCGgGAGAACGTCTGGCTCACA	No significant similarity found
TGCATAATGGGCATTACGTGTAATGCTCGC	chromosome (-)
TCGGGAAAGAGACCATGACCATCGGTGAAAAC	chromosome (-)
TCGGGCTGCGCGGGTAATGGTGCAGCGCTCCA	chromosome (-)
TCTGCTCTCCCGGCCAGCCGATATATCCAC	chromosome (-)
TCTGTCACTCCTGGGAGGGCGCCTCGGCCTG	chromosome (-)
TGAACGTTACGCATCACGCGCCTTCCGGCC	chromosome (-)
TGACCCCGGAAGATATCGACGCGGGATTGCC	chromosome (-)
TGAGATCAAAGCGGAGCAAACGTGCCTGGAC	chromosome (-)
TGATCAAGAAGAACCCGATGGCGCCACTTGAG	chromosome (-)
TGATCCATCACCGCTTACACCAACAAAGGC	chromosome (-)
TGATCCATCACCGCTTACACCAACAAAGGC	chromosome (-)
TGATCGGAGCCCTATTGCACACGCTCCAGCC	chromosome (-)
TGATTTCAAGGCCGCGGGCGACTGATCCGGA	chromosome (-)
TGCATGCACATCGGCGAACTGCTGACGTGCTT	chromosome (-)
TGCTCGTCGGGTTTCGAGTCGGCCCCGGGCAC	chromosome (-)
TGGAACGCATTGCCTGCCTGCGTAAAGAACTC	chromosome (-)
TGGAAGCAGGGCCAGGATGTCGAGTCCATCA	chromosome (-)
TGGAGGCGACCGAACCCGGGCTGTTGAGGAT	chromosome (-)
TGGAGGCGTCTTGTGAAGGCTCGCTGAGTCTT	chromosome (-)
TGGATCAAAGAACGCATTCTCGGCACGTCGAA	chromosome (-)
TGGATTCATGTATCAGGCATCGTACTCGGCAA	chromosome (-)
TGGTACCGCAAGCCTGTCGGTACCTGCAATT	chromosome (-)
TGTCAGAAGGGATTACCGCGACCTGGTCGCA	chromosome (-)
TGTCCGGTCCCGGAAAAGACCAACGCGGGAGT	chromosome (-)
TGTGCCGTCCGCGATCTGGCGGATTGCCGGCTA	chromosome (-)
TTACCTTTAAAAGGCTTTAAAAGGCCTTTTAG	chromosome (-)
TTATCAAGCGGCTGTGCTGGGCTGTTTCGTT	chromosome (-)
TTCCTCGAACACGCCATCAGCAGCCTGGAGGT	chromosome (-)
TTCGACGGCCACGCTCAGCCCGGCCAGGCC	chromosome (-)
TTGACGGCCAATGCCGGCTTCGACTTAGCTCG	chromosome (-)
TTGCCGCTCAGCGCTCAGGAACGACTGACCC	chromosome (-)
TTGCTGCGTGTTCAGCGACACCCGTTCAACA	chromosome (-)
TTGGGCAGTGCTGTTGGTTCGAAACCAGTACC	chromosome (-)
TTTCTTAGCTGCCTACACGGCAGTGAACCTACC	chromosome (-)
AAGACCCTGGTGGTGTGATGGCGGTGAACTGGT	phage (coat protein A of bacteriophage Pf1 LR134330.1) (attachment protein CP065966.1) (isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) CP034368.1) (iron dicitrate transport regulator FecR CP034368.1)
ATCACCGGAGGCCACGGATTGCTGTAGCTCA	chromosome (DNA cytosine methyltransferase) CP021380.2
GCTGATCGCCAAGCGGACAAGTCGACCGGCC	chromosome (DNA cytosine methyltransferase) CP024630.1
CGCACCAACGACCAGATGCGCCGCGACCTGCA	chromosome (endopeptidase) AP024513.1

TCGGGGTGGCGGGCCAGGTTCAACGCCAAAGC	chromosome (glycoside hydrolase family 19 protein) CP043328.1
ttCAATCCGGGCGATGGTGGCgGCGATGGTG	chromosome (hemagglutinin) CP031660.1
CACGCAGCCAGGCTCGAACATCGGCCCGGCTT	chromosome (hypothetical protein)
GCGTCGCGAGCGGTGTTGCACGCTACGCATGT	chromosome (Lar family restriction alleviation protein) CP065966.1
GCAACGTTGCTCGTCGAAACGACGTACCGGAT	chromosome (Membrane protein) CP030911.1
GGGAACAGCGTCTTGTCTTGCACCGCCGCAC	chromosome (NinB family protein) CP039988.1
CCTTGGCCTAAATCCGGCATCAATATCGATATA	chromosome (putative membrane protein) CP030327.1
ATCAGCGGATCGGCGCCATACGCTGCGCCAT	chromosome (recombinase RecT) CP041773.1
AAGCTTCGACCCTTGTGGGGCCCTCGGCGTTA	No significant similarity found
ACTTGATGAACTTGCCGACGCTGGGCGCGAAG	chromosome (Replication protein P) CP046441.1
AGCCACTCGCGGGCCAGCTCGGGCGATAGCAC	chromosome (SOS response-associated peptidase family protein) CP054572.1
AGGTGGCGGAGAAGATCCCGGGCGGCTGGGT	chromosome (tape measure protein) CP054472.1
ATGACCTGGGCCCGACCACCTCCAGCCCCTC	chromosome (toprim domain-containing protein CP053917.1) (virulence-associated E family protein LR134330.1) (conjugal transfer protein TraC CP022002.1)
GGAAGGCTGGCGCTCGAACGGATGTGTACAGG	chromosome (type II toxin-antitoxin system YhaV family toxin) CP061376.1
AACCACCCCGCTCCGGTTTGCCGGGGCATTGA	No significant similarity found
AACGAACAGTAGGCCACTGCCGGCTCTAACT	No significant similarity found
AAGGACACCAACTGGTGCCGGCAAACCTTCGT	No significant similarity found
AAGGGAGAGCAGGTTCCGTGGCGCAGCAACCG	No significant similarity found
AATGCTTGGTCTTGCCGGGGTAGTGACGGGTA	No significant similarity found
ACCGGAACTGGGCGACGGACCACAAGGCCCAT	No significant similarity found
ACCTTTCGATAGTTACAGTGCAGCTTTGCCAA	No significant similarity found
ACGATTTGCAGCGTCACGGGTGTGATGATCT	No significant similarity found
ACGCTACAAAGTCGACGTTGGGCACTTTTATG	No significant similarity found
AGCGGGGATGGAAGCTTGGGCTCGGGGATGCCA	No significant similarity found
AGTGAATCGGTGTTTCTCCGCACCTGCATGC	No significant similarity found
AGTGAATGGTGTCCGTGCGACATTCATGC	No significant similarity found
AGTGCGGGGTTGAAAAGCGGGCGGGGCGTGATT	No significant similarity found
ATACTTACCAGTcACTCCAGGCCCTTCTTTTC	No significant similarity found
ATCGGCGCCAGCATGGACGAGCGTATCCAGGG	No significant similarity found
ATGAACAGCGACAAGGCGCAAGGTAGTGGGC	No significant similarity found
aTGAAGGCCATGGGCGTGTAACaCGACGGCAG	No significant similarity found
ATGCAAGCGCTTATCATCGACAGGAACCTCCA	No significant similarity found
CAACTGGCGCGGGCGCGCGGGAGTCTATTCTT	No significant similarity found
CAATTGGCGGCCGGCGCTCGGCAGTCCATTC	No significant similarity found
CAGGTTGGGTACGGCGCTGTTTTCCATCACT	No significant similarity found
CATTCTAGCTGCATACGGCAGAGATCAGTC	No significant similarity found
CCGGGGATGTCCGAGGAACAACCTGCACAGAA	No significant similarity found
CCGTAGCCCCTTGATGCAATCCTCTGGAGGA	No significant similarity found
CGAAAGATCCGCTATGGGATTCAGCAATGCCA	No significant similarity found

CGCCCCAGTTCGCCGGGGCATCACCGAGGAAA	No significant similarity found
CGCGACATCGGTGTGGGGCGAGGACGTCTACCT	No significant similarity found
CGCGATCATCGGTGTGGGGCGAGGACGTCTACA	No significant similarity found
CGGAGATGGCGGAGCCACTGCCGCATTTGTTA	No significant similarity found
CGGGCGCTTGCGCCGGGATCGGCGAATTGGATG	No significant similarity found
CTGCTGGTGAAGTCTGCCTGCCACCCCCCT	No significant similarity found
CTTGGCTAAATCCGGCATCAATATCGTTATA	No significant similarity found
GACCAGATCCCGCCGAGTACTGGCAGGACCG	No significant similarity found
GAGGACGGTGAACCGTACCCTGAAGATGCA	No significant similarity found
GATCAGGGTATGAGAGACACCGCTAAAGTAA	No significant similarity found
GCAGTTGCGACGTGTCGGCACCCGCTTCGTTCA	No significant similarity found
GCCCATCGTCCCTGGAGCTACGCCAGCACTT	No significant similarity found
GGCCAGATCCCTCCGCCGGACTGCCAGGACTT	No significant similarity found
GGGTCAAGTCCGGCTGTGACGCACGTCGTGCC	No significant similarity found
GTAGACGCGGACATCAGCCCGTGA	No significant similarity found
GTCGGGGTTACCGGGGGTGGCGACCTTCAGCT	No significant similarity found
GTGACCAGGCGGGGGCTCCGTGACGGGCGAT	No significant similarity found
GTGATCAAGGCGGGGGCTCCGTGACGGGCGA	No significant similarity found
TACCTCTACGAACAGACCGAGTTGAAAGGACA	No significant similarity found
TCACGACGCGTGGATGCCACCGAATATCGTT	No significant similarity found
TCGACGACACGCGGATGGCACCGACTTATCC	No significant similarity found
TGAAGTCCGCGGATCGGCGCCCTGTGCAT	No significant similarity found
TGCAGATCGTATGCATCAGCAAATGCCGTTT	No significant similarity found
TGCAGGCCGCGTTCGAGCAATCCGCCGCGACG	No significant similarity found
TGGACATCCTACCGACCTGATCGCGCAGCAG	No significant similarity found
TGGGCCAGTAAGCGCATAGTACCCGCGTGA	No significant similarity found
TGGTCACTTGGCGtCCTGCTGGCGCTTCAAGT	No significant similarity found
TGTCGTTGTTATCGCTGTCTGCCATTCGTCC	No significant similarity found
TTGAAGCCATGGGCGTGAACCTGACGGCAG	No significant similarity found
TTGAGTCCCTTGAAGTCCGCGGCAACCTCGC	No significant similarity found
TtTGAGGGTATGACCATGAAGCAATCGACGA	No significant similarity found
ACCCAGGACGCCATCCGGCGCATGAGCGAACG	pathogenicity island (hypothetical protein) EF611302.1
CACATGTGCGCTTCGGCGATGGTGTGCGCCAG	pathogenicity island (putative tail sheath protein) EF611302.1
GTGGTCACCTGTCCCGGTGACTCGCTAAT	phage (-) HG798806.1
AATGCCCGACTTGCCGGGCTAATGAGGGGTA	phage (-) MK819239
TCACTGAACAAGCCGGTTCAGGACCACGCCATT	phage (baseplate assembly protein V) NC_055793
GGGTTGTTGTTGCGGATGCCGCGAGGTTGAAG	phage (capsid and scaffold protein) MK511038.1
ACCGGAACTGGGCGACGGACCAGAACCTCCT	phage (conserved hypothetical protein) AF165214.2
TCCAGCCAAGCCTCCATCTTGCTGATCGGCGA	phage (DNA transposition protein) MK511038.1
TGCTCGTGTGATGACCAGCCGACGCGCATGGTT	phage (DNA-binding protein) KT887558.1
AGAAAGCCAAGATCTACCGCTGGAGAAAGGCG	phage (DUF2800 domain-containing protein) NC_053013.1
AGCTGGTTGTAGACGGCGATGCACTGCTCGAT	phage (Gene II/X family phage/plasmid replication protein)

	CP051770.1
CGATGGCCGCGACGCGCCTCGATGCCGGTCTG	phage (head morphogenesis protein) MZ773939.1
TTCACGTCGAAATCGCTGCCGGTCAGTTCCGT	phage (hypothetical protein) MK934841
TGCAGGTCATAGGCGTATTCGAAGGACAGGCT	phage (hypothetical protein) AB008550.1
GCCTTCGGTGGTGATCTTCCGTTGTTTGCCT	phage (hypothetical protein) AP009624.1
CTCTGGCGGTAACCTTCCATGATCTGCGCAGCC	phage (hypothetical protein) HG798806
ATAGCTACGCCGAGCCAGTTGTAAGCTGACGC	phage (hypothetical protein) HQ711985.1
ATCTACTGCCGACAACAGGCCAGCGCATCGG	phage (hypothetical protein) HQ711985.1
AACCACCCCGCCCGTTCCCGGGGCATCGA	phage (hypothetical protein) KP340287.1
GTAGGGATTGTGAGCGTCGAGGAGCGCCAGGGC	phage (hypothetical protein) KT887558.1
TGGTCACTTGGCGGCCTGCTGGCGCTTCAAGT	phage (hypothetical protein) KT887558.1
TCGCTGACGATGACCGGCGGCGCCTCCGGCTC	phage (hypothetical protein) KU310943.1
AGGAAACCAGAGCAGGAGGATGGACTATGACC	phage (hypothetical protein) LT608331.1
CCGGGCTGGATGGACTCGAAGGGCGCCAGGCT	phage (hypothetical protein) MF490237.1
CCGGGCTGGATGGACTCGAAGGGCGCCAGGTT	phage (hypothetical protein) MF490237.1
GCTGGCGCCCTGGTCTGCGTCTTTGCGATCT	phage (hypothetical protein) MG707188.1
GCCCATCGCCCTGGAGCTACGCCGACCACAT	phage (hypothetical protein) MH643778.1
ATATCAGTTTGCATGGTTTGCTCCTACCAAGC	phage (hypothetical protein) MH719194.1
GCCCCCCCAAGAAGTACTGGTGACGACCTTG	phage (hypothetical protein) MH719194.1
GCCCACCAGCTCAGTCCAGGCGCTGCCGGAAT	phage (hypothetical protein) MH719195.1
TATCCGATGAACGTCCGCATCCCCGGGCTGT	phage (hypothetical protein) MK510990
GACCCCGGAGGACCAACCGTGGACAACGACA	phage (hypothetical protein) MK511012.1
TCCTTGCCGGGCGCGGCGGCGAGCAGTTCGCG	phage (hypothetical protein) MK511016.1
TGCCGGACCTGCTCCGCCACTGCGGACTCCAA	phage (hypothetical protein) MK511016.1
AACCTCTACGAGCAGACCGAGTTGAAAGGACA	phage (hypothetical protein) MK511029.1
TCTACGAGCAGACCGAGTTGAAAGGACAGGAG	phage (hypothetical protein) MK511029.1
AACCGCGCGAACAGCTGTGCATCGTACCTT	phage (hypothetical protein) MK511038.1
AACCGCGGCAACAGCTGTGCATCGTACCT	phage (hypothetical protein) MK511038.1
AGCTCGGCCAGCGCAGCCGGCGCGCTTCGCC	phage (hypothetical protein) MK511038.1
ATGCAGGCGCTTATCATCGACAGGAGCCGCAT	phage (hypothetical protein) MK511038.1
GCAGTGATCGAGCGCGCACGGTCCGCAAGAC	phage (hypothetical protein) MK511038.1
GgCCGGTCAACTGGCAGCCACTTGTTCGGGCG	phage (hypothetical protein) MK511038.1
GTACCGGGGTGCTGCCAACCATACGAGGCGTT	phage (hypothetical protein) MK511038.1
GTCCTCGATCAGTTCGCGGCGCGGGCGGTGTA	phage (hypothetical protein) MK511038.1
GTGACCAAGGCGGCGGGCTCCGTGACGGGCGA	phage (hypothetical protein) MK511038.1
GTGTCGCCAGCACCGTTACGCGCTACTTCAT	phage (hypothetical protein) MK511038.1
GCAGAGCGCGACGCCCTGGCCAGGGTCCGC	phage (hypothetical protein) MK511048.1
TGTCCGAGCAGGCCGGTAATCCGATAACTG	phage (hypothetical protein) MK819239.1
ACCGGCTCCTGCCTCTCCAGCTCCGCGACCCTG	phage (hypothetical protein) MN096267.1
ATGCAAAGCAAGCGGCTTGGAGTCCCGAATC	phage (hypothetical protein) MN096267.1
ACCCAGCGCCAGGGCGAGCGGGCTTACTGGAT	phage (hypothetical protein) MN585195.1
GCGCTGACGCCGATTCGGCGATCTGCTTCGT	phage (hypothetical protein) MN585195.1
ATCACCGGCGCGCTGGCCTTCGGCGCCAGGC	phage (hypothetical protein) MZ285879.1

AGAAGGCCGGGGTCCGTGTGTGGCGCATTGAC	phage (hypothetical protein) NC_053013.1
TGGGGGCCCTTCTAATGGCGAACTACGATGCTT	phage (hypothetical protein) OK041467.1
TTTGAGGGTATGACCATGAAGCGAATCGACGA	phage (II/X family phage/plasmid replication protein) CP030911.1
AGCAAGCCCTTTCCAAGTATCAGCGCCAGCA	phage (N-deoxyribosyltransferase-like protein) NC_031091.1
AGGGGTTCGTCCCTGGCCGAGGTGGCCCGCTC	phage (Ner-like protein) KM233689.1
AACAGAACCGCGCACCTCGATCAGCCTCGCAT	phage (phage BR0599 family protein CP061778.1) (DUF2163 domain-containing protein CP050323.1)
CCGCGCGATGAGCGTCAGGCCCCAGCAGTCAA	phage (Phage peptidoglycan hydrolase) MK111015.1
GGTAGACGCTGCCAGGTTAGCGGCCCGGCAGT	phage (phage portal protein) CP028959.1
CGACGAGCAACTGCGCTTGCAGCGTGCCTAAC	phage (phage protein CP014999.1) (baseplate J/gp47 family protein CP086064.1)
ATCCGGGCCTGCGCAGATCACCCGGCCAGCTT	phage (phage tail protein) CP039990.1
TGGCGCCGCCGATTTCACGTAGCTGCTCGAT	phage (phage tail protein) CP043328.1
AGCCTCCGGCGTGGGCGCCGGCACCTACCGTGC	phage (phage tail protein) CP089065.1
GGTCAGTTGCAGCAGCACAACGTCCAGTCGC	phage (phage tail protein) LR739071.1
CGGGTGGCCTTGGCTAGCACGTTGGACGCGTT	phage (phage tail tape measure protein) CP039990.1
CGTCTCGATGCTGCCGTCGATGAGCGTCTTGT	phage (portal (connector) protein) MN096267.1
TGATCTTCTGGTGCTGACCTCTGGCGCAAAT	phage (portal protein) MK819239.1
TGATCTTCTGGTGCTGACCTCTGGCGCAGAGT	phage (portal protein) MK819239.1
CGGAAGTGGGACACCTTCGATATCAGCGACAA	phage (PriCT-2 domain-containing protein) NC_053013.1
TCACGACCTTCTCGAACGTTCCAGGTACGTA	phage (putative DNA polymerase III beta subunit) MG707188.1
ATCGCCGGCGCCGAGCGGAGACCGTCTACGG	phage (putative DNA segregation ATPase FtsK/SpoIIIE) JX403939.1
GGGCCCCGACGGCTAGTAATTCGCGGAGGATGG	phage (putative DnaJ) LC105988.1
TCGGTCCGCGGGGCTTTGCTTTGCGGGTAGAT	phage (putative phage repressor) MN096267
TTTTCGTAGATCCCGACGTCGAGGCGCAGAGT	phage (putative phage repressor) MN096267
ACATCGACGGCGAGCGTGTGACGTTCTGGACG	phage (putative phage-related membrane protein LR134309.1) (zonular occludens toxin family protein CP029097.1)
TGTCCGACAACCCGCATAGCATCCCTGAGCAA	phage (Putative replication protein O) HG798806
GAGCAGATCCGCTATGGCATTAGCAATGCCA	phage (Putative replication protein P) HG798806.1
ACTTCGTGCGTGAAGTCCAGTCGAGGGGATAC	phage (putative terminase large subunit protein) OK041467.1
ACGAATTGCCGCCAGCCGTCGCTCCAGCTTCT	phage (putative terminase, small subunit) LN898172.1
ATCCTATCGACGACAAAGTGCTCGAGCATCTC	phage (putative transcriptional regulator) AF165214.2
AAGGTCAATCCAGGTGAAGCAACTGGTGGC	phage (replication protein O) NC_031091.1
AGTGAGCACGATCATCATGTGCGCCCTGTGGC	phage (replication protein O) NC_031091.1
AATCCGAGGCGGAGTTCAGCCACTTGGCATAG	phage (site-specific recombinase KT887557.1) (integrase MZ089728.1)
ACGACGCGACCAGAATCGCGATTTGCACCCAC	phage (tail assembly component) MN536027.1
AACATCCAGCCGAGCTGAGCGATATCCCCCG	phage (tail fiber protein) KU199710.1
GTCGACGACTATGTCGTGCAGCCCCGAGTCA	phage (tail fiber protein) NC_053013.1
AGAAGCGCATCCAGCGATACGAAGATGCACTC	phage (tail length tape measure protein) MH719189.1
ACCTTGCTGCGGTCGAGCATGTGCGCCTCGAA	phage (tail protein) NC_055793.1

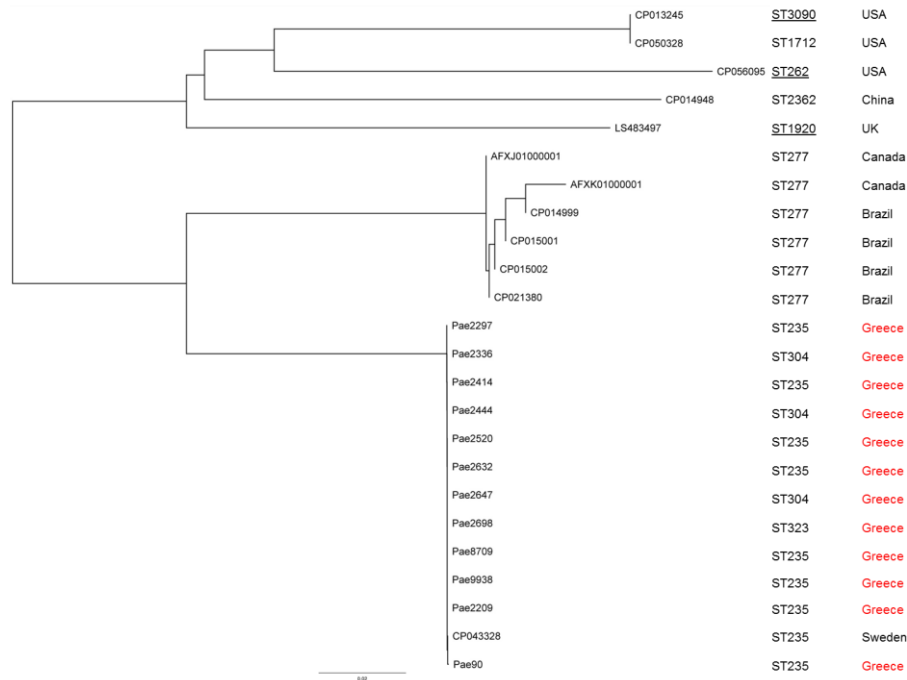
AGCTTCGGCACCTGATGCGCGCCGTCGAGGG	phage (tail tape measure protein) NC_048109.1
TTGCATCGCACCTCCTGCTCACCGACCAGGC	phage (terminase endonuclease subunit) NC_055793
TGCAGCGCCGCGAACGGCAACGGCGGCGACGG	phage (virion structural component) MN536027.1
CCATGCTGACCGTCCAAGTGC GTTCTTCCA	phage (virion structural protein) KM233689.1
GCCAATGCTGACCGTCCAAGTGC GTTCTTCCA	phage (virion structural protein) KM233689.1
TACCGTTGATGCGGAATTGGCCGGGCGGATAC	phage (virion structural protein) KM233689.1
TGATATCCAGCTGCTCCAGGAACCGCTGGCGG	phage (virion structural protein) KM233689.1
GGAATGGCTTTGTCAACGCGCCGACGGCTACT	phage (virion structural protein) MH719189.1
ATCGATCATCGCCGCGAGCCACCTCGACCT	phage (virion structural protein) MH719191.1
AGACGATCCGCGCATTGACGACGGGCGGGCCG	phage (virion structural protein) MH719192.1
TACTGGTTCTTCGCCAACGGCCGGCGCTTCTG	phage (virion structural protein) MH719192.1
GCCTGGACGGGCCGAACAGGTCCAGGCCGCT	phage (virion structural protein) MH719194.1
AGGGATCGCCGTCGAACGGCGACTTGCCCGGAA	phage (virion structural protein) MH719195.1
TCGACGACACGCGGATGCCACCGACTTATGCC	phage (zonular occludens toxin) CP054473.1
TTATCAGTAAATACGTGGCGACTTGGCCACCC	plasmid (conjugal transfer protein TrbD) CP020602
TCGTCGTGGTTGTAGGCCGCTGCCACGTCTT	plasmid (conjugal transfer protein TrbL) CP020602
GTCGCGCGGGTGGTTCGATCCATCCCCGACCT	plasmid (hypothetical protein) CP081347.1
ATACTCGGGCAGGTGCTTGGCGTCGATCAGC	plasmid (replication protein) CP020602
GAGGTGGCTATCAACGACGCCAAGTCGGGATT	plasmid (transporter) CP015073.1
TCATCGCGTGGCGCAACGCTGATCTGGGGC	plasmid (TrbC/VirB2 family protein) CP077998.1
ACTGTTGAGTCGCGAATGACTCGGTGAACTA	plasmid (type IV secretory system conjugative DNA transfer family protein) CP089066.1
GGCTTCCGAATCGGAAATCTCGACCAGTACGA	plasmid CP030914

Πίνακας 33: Αλληλουχία spacers και πιθανή προέλευση τους στις I-F CRISPR συστοιχίες.

4.5 CRISPR-βαιζόμενη φυλογένεση

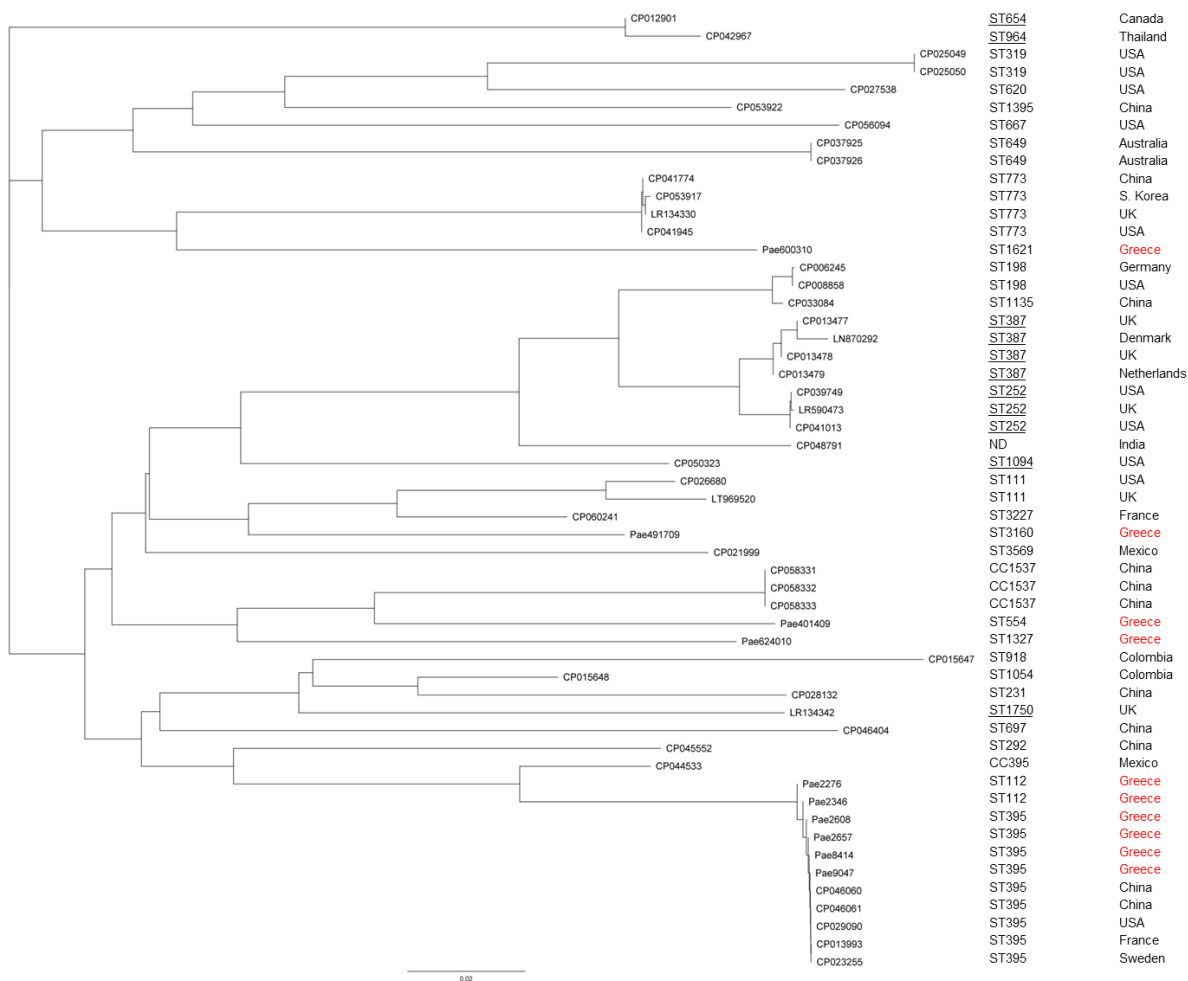
Από την βάση δεδομένων CRISPRCasdb κατεβάσαμε CRISPR αλληλουχίες για όλα τα CRISPR/Cas-θετικά στελέχη *P. aeruginosa*. Στη συνέχεια, αξιοποιήσαμε αυτές τις πληροφορίες και τις CRISPR συστοιχίες που προσδιορίστηκαν από τα δικά μας στελέχη, για την κατασκευή τριών φυλογενετικών δέντρων, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Neighbor-Joining μέσω του προγράμματος Geneious 7.1.9. Για την κατασκευή των δέντρων, τύπου I-F και I-E CRISPR/Cas συστημάτων, χρησιμοποιήσαμε, για κάθε στέλεχος, μία ενιαία αλληλουχία που αποτελούνταν από τη συνένωση των CRISPR1 και CRISPR2 συστοιχιών.

Το φυλογενετικό δέντρο στελεχών *P. aeruginosa* για τύπου I-C CRISPR/Cas σύστημα περιείχε 24 στελέχη και αποτελούνταν από δύο κύριες ομάδες (Εικόνα 29). Η πρώτη ομάδα αποτελούνταν κυρίως από στελέχη τα οποία ανήκουν στο ίδιο κλωνικό σύμπλοκο 235 (CC235) [Ελλάδα, Σουηδία], ενώ η δεύτερη ομάδα περιελάμβανε στέλεχη ST277 [Βραζιλία, Καναδά].



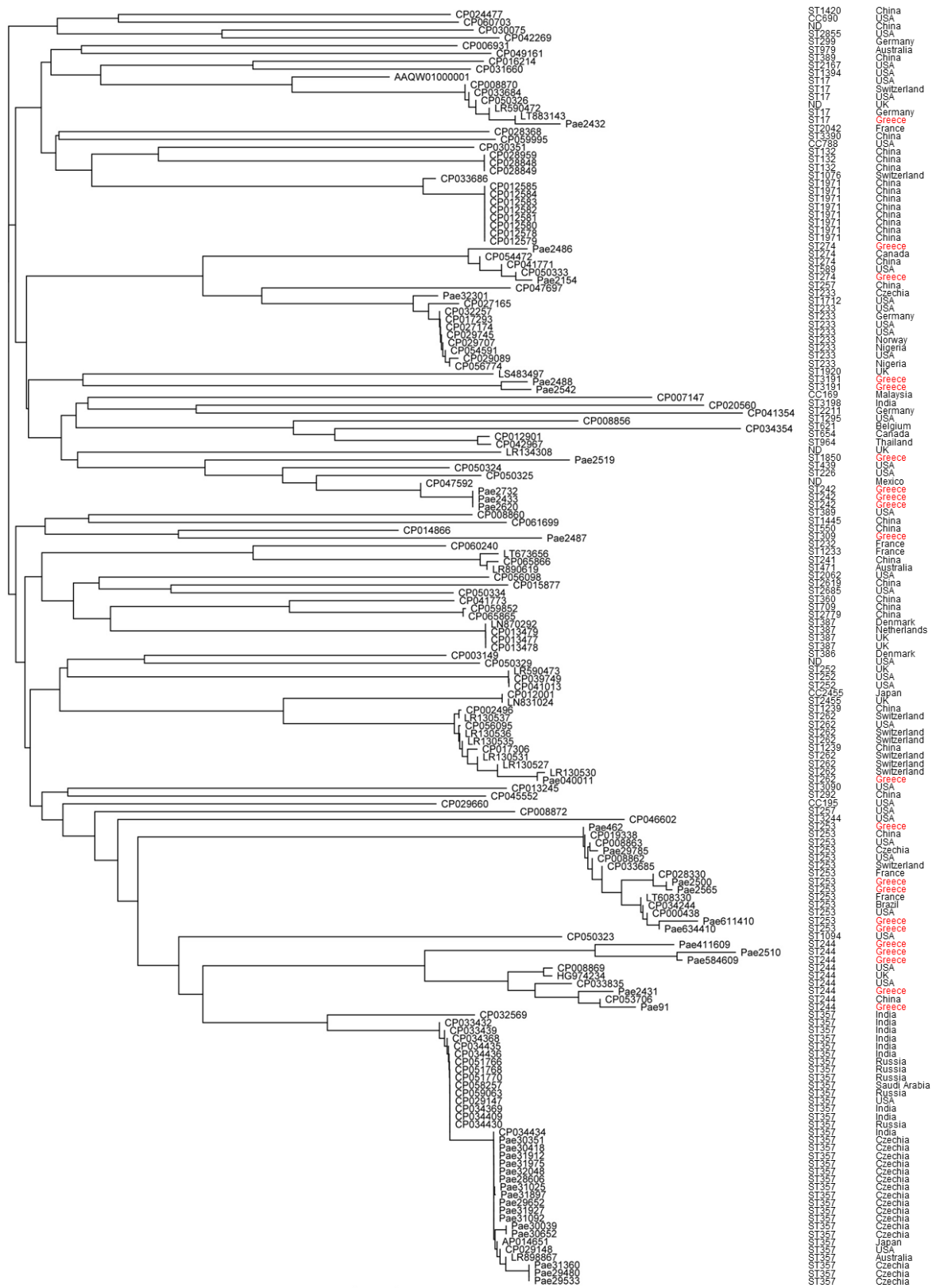
Εικόνα 29: CRISPR-βασισμένο φυλογενετικό δέντρο για τύπου I-C CRISPR/Cas-θετικά στελέχη *P. aeruginosa*.

Στη συνέχεια, κατασκευάστηκε ένα δεύτερο φυλογενετικό δέντρο τύπου I-E CRISPR αλληλουχιών, το οποίο περιελάμβανε 54 στελέχη από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές (Εικόνα 30). Η CRISPR τυποποίηση ομαδοποίησε τα υπό ανάλυση στελέχη σε μερικές συστάδες, οι οποίες ήρθαν σε συμφωνία με τα δεδομένα από MLST, παρά τη διαφορετική γεωγραφική προέλευση των στελεχών αυτών. Τα περισσότερα στελέχη που απομονώθηκαν στην Ελλάδα, ανήκουν στο κλωνικό σύμπλοκο 395 (CC395; ST112 και ST395), ενώ τα υπόλοιπα ανήκουν σε διαφορετικούς κλώνους, οι οποίοι δεν ομαδοποιήθηκαν σε καμία συστάδα. Αξίζει να σημειωθεί ότι, η πλειονότητα των στελεχών που βρέθηκαν θετικά για παρουσία τόσο για τύπου I-E, όσο και για I-F CRISPR/Cas συστήματα, σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα που περιέχει δύο υποομάδες στελεχών ST387 και ST252. Τα ST387 στελέχη προέρχονται από Δανία, Ηνωμένο Βασίλειο και Ολλανδία, ενώ τα ST252 προέρχονται από ΗΠΑ και Ηνωμένο Βασίλειο.



Εικόνα 30: CRISPR-βασισμένο φυλογενετικό δέντρο για τύπου I-E CRISPR/Cas-θετικά στελέχη *P. aeruginosa*.

Τέλος, το τρίτο φυλογενετικό δέντρο κατασκευάστηκε βασισμένο στις τύπου I-F CRISPR συστοιχίες και περιελάμβανε 163 στελέχη (Εικόνα 31). Επτά κύριες συστάδες ταυτοποιήθηκαν με πολλά στελέχη να μην ομαδοποιούνται σε καμία από αυτές. Η μεγαλύτερη συστάδα που προέκυψε περιελάμβανε τον κλώνο 357, ο οποίος έχει βρεθεί σε διάφορες χώρες. Η δεύτερη μεγαλύτερη συστάδα περιελάμβανε ST253 στελέχη, ενώ η τρίτη συστάδα ST262 στελέχη. Στελέχη που ανήκουν στους ST17, ST233 και ST1971 κλώνους, σχημάτιζαν την τέταρτη, πέμπτη και έκτη συστάδα, αντίστοιχα. Η έβδομη κατά σειρά συστάδα, η οποία εμφάνιζε υψηλή ποικιλομορφία, αποτελούνταν από ST244 στελέχη τα οποία προέρχονταν από Ελλάδα, Κίνα, ΗΠΑ και Ηνωμένο Βασίλειο. Αξίζει να σημειωθεί ότι, οι τέσσερις μικρότερες συστάδες περιλάμβαναν τα στελέχη που ανήκαν στους κλώνους ST252, ST387, ST132 και ST242.



Εικόνα 31: CRISPR-βασισμένο φυλογενετικό δέντρο για τύπου I-F CRISPR/Cas-θετικά στελέχη *P. aeruginosa*.

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα CRISPR/Cas συστήματα, έως σήμερα, έχουν ταξινομηθεί σε 2 τάξεις, 6 τύπους και τουλάχιστον 20 υπότυπους και έχουν βρεθεί τόσο σε βακτήρια όσο και σε αρχαία (**Koonin et al, 2017**). Από τη διερεύνηση της οργάνωσης των CRISPR περιοχών σε κλινικά στελέχη *P. aeruginosa* επιβεβαιώσαμε την παρουσία τύπου I-C, I-E και I-F CRISPR/Cas συστημάτων σε διαφορετικούς κλώνους. Για τους τύπους συστημάτων I-F και I-E, χρησιμοποιήθηκαν PCR πρωτόκολλα τα οποία είχαν χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενες μελέτες, ενώ για την ανίχνευση των CRISPR/Cas συστημάτων τύπου I-C, όσο αφορά τη μεθοδολογία της PCR, περιεγράφηκαν για πρώτη φορά σε αυτή τη μελέτη. Το 36,0% των απομονώσεων *P. aeruginosa* έφεραν CRISPR/Cas συστήματα, με την πλειονότητά τους να είναι θετικά για την παρουσία του τύπου I-F. Τύπου I-F και I-E συστήματα εντοπίστηκαν σε μία μεγάλη ποικιλία STs, ενώ τύπου I-C συστήματα παρατηρήθηκαν κυρίως μεταξύ απομονώσεων που ανήκαν στο κλωνικό σύμπλοκο 235 (CC235). Κανένα στέλεχος δε βρέθηκε να διαθέτει περισσότερα από ένα CRISPR/Cas σύστημα.

Παράλληλα με τον έλεγχο για την ύπαρξη των συστημάτων αυτών, μελετήσαμε και την ύπαρξη ανθεκτικότητας ή μη των στελεχών αυτών στα αντιβιοτικά. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι, η παρουσία των CRISPR/Cas συστημάτων παρατηρήθηκε τόσο σε ευαίσθητα όσο και σε ανθεκτικά στελέχη, τα οποία έφεραν γονίδια αντοχής σε αντιβιοτικά, όπως το γονίδιο *bla_{VIM}* (VIM-τύπου μέταλλο-β-λακταμάση), του οποίου η διασπορά σχετίζεται με κινητά γενετικά στοιχεία (ιντεγκρόνια, τρανσποζόνια και πλασμίδια). Για τα ιντεγκρόνια θα αποτελούσε παράληψη να μην αναφερθεί ότι φέρουν συνήθως και άλλα γονίδια αντοχής, με αποτέλεσμα να ευθύνονται σε αρκετές περιπτώσεις και για φαινοτύπους πολυαντοχής των βακτηρίων (**Ellington et al, 2007**).

Για όλα τα Cas-θετικά στελέχη, οι CRISPR συστοιχίες ενισχύθηκαν με PCR και αλληλουχήθηκαν. Για την ενίσχυση I-E και I-C περιοχών σχεδιάστηκαν εκκινήτες, από αλληλουχίες οι οποίες βρίσκονται ανεβασμένες στη βάση δεδομένων CRISPRCasdb (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/MainDb/StrainList>). Από την ανάλυση των CRISPR αλληλουχιών, μεταξύ των στελεχών, βρέθηκαν 425 μοναδικά spacers. Μέσω BLASTη αναζήτησης βρήκαμε ότι 198 spacers ταιριάζουν με χρωμοσωμικές αλληλουχίες της *P. aeruginosa*, εκ των οποίων 104 spacers εμφάνισαν ομοιότητες με ήδη χαρακτηρισμένες CRISPR αλληλουχίες. Όσο αφορά την απόκτηση των αυτό-στοχευόμενων spacers, προηγούμενες μελέτες αναφέρουν πιθανό ρόλο των CRISPR/Cas συστημάτων στη ρύθμιση βακτηριακής λοιμογόνου δράσης. Στη *P. aeruginosa*, το CRISPR/Cas σύστημα επιτρέπει τη δημιουργία βιοφίλμ, το οποίο αποτελεί σημαντικό λοιμογόνο παράγοντα δράσης για διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς (**Hatoum-Aslan et al, 2014**). Ένας σημαντικός αριθμός spacers βρέθηκαν να ταιριάζουν με φάγους (n=138; 32,5%), υποδεικνύοντας ότι αυτά ίσως προστατεύουν την *P. aeruginosa* από τυχόν εισβολή νέων φάγων. Επιπρόσθετα, 69 (16,2%) spacers δεν βρέθηκαν να έχουν κάποια ομοιότητα με αλληλουχίες που είναι κατατεθειμένες στη βάση δεδομένων GenBank, υποθέτοντας ότι ένας σημαντικός αριθμός γενετικών χαρακτηριστικών δεν έχει χαρακτηριστεί ακόμα. Από τα υπόλοιπα 19 spacers, 15 ταιριάζουν με

πλασμίδια, 3 με νησίδες παθογονικότητας της *P. aeruginosa* (*P. aeruginosa* pathogenicity island-PAGI) και 1 ενσωματούμενο συζευκτικό στοιχείο (integrative conjugative element-ICE). Ωστόσο κανένα από τα ταυτοποιημένα πλασμίδια δε μεταφέρει κάποιο γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.

Αξίζει να σημειωθεί ότι, η ανάλυση BLASTn έδειξε ότι, τα στελέχη τα οποία ανήκουν στον ίδιο κλώνο φέρουν και πανομοιότυπες CRISPR συστοιχίες. Η επαλήθευση αυτού του ευρήματος δόθηκε από τη φυλογενετική σύγκριση των στελεχών μας έναντι στελεχών, CRISPR/Cas-θετικών *P. aeruginosa*, που λήφθηκαν από τη βάση δεδομένων CRISPRCasdb. Στα φυλογενετικά δέντρα που κατασκευάστηκαν με τη μέθοδο Neighbor-Joining στο Geneious 7.1.9, με βάση τις συνενωμένες αλληλουχίες των συστοιχιών CRISPR, στελέχη που ανήκουν στους ίδιους κλώνους, ομαδοποιήθηκαν στις ίδιες συστάδες. Επίσης, παρατηρήσαμε ότι οι τύπου I-C CRISPR συστοιχίες, των στελεχών CC235 από την Ελλάδα διέφεραν μεταξύ τους στην απόκτηση ενός spacer, και οι τύπου I-F CRISPR συστοιχίες των στελεχών ST357 από την Τσεχία διέφεραν μεταξύ τους στην απόκτηση 1 με 3 spacers. Αυτά τα δεδομένα υπογραμμίζουν ότι, παρόλο που δεν διαθέτουν όλα τα απομονωμένα στελέχη *P. aeruginosa* CRISPR/Cas συστήματα, η CRISPR τυποποίηση θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση επιδημικών στελεχών και τη μελέτη των εξελικτικών μονοπατιών.

Συμπερασματικά, εντοπίσαμε, μέσω PCR, την παρουσία CRISPR/Cas συστημάτων στο 36% των κλινικών στελεχών *P. aeruginosa*. Σε συμφωνία με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών (**Essoh et al, 2013, Luz et al, 2019**), τα δεδομένα μας επιβεβαίωσαν την παρουσία των τύπου I-C, I-E και I-F CRISPR συστημάτων, σε *P. aeruginosa* κλινικής προέλευσης και την ισχυρή συσχέτισή τους με συγκεκριμένους κλώνους. Περαιτέρω πειραματικός χαρακτηρισμός θα βοηθήσει στην καλύτερη αποσαφήνιση του λειτουργικού τους ρόλου.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Αρσένη Α., (1994), Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή διάγνωση των λοιμώξεων, Ψευδομονάδες, 4η έκδοση, *Ιατρικές Εκδόσεις «Ζήτα»*.
2. Κουμεντάκου Ε, (1974), Ψευδομονάδες – νόσοι εκ ψευδομονάδων, Οικολογία και Μικροβιολογία των ψευδομονάδων. *Πρακτικά 6ου Εθνικού Συνεδρίου Μικροβιολογίας, Αθήνα*.
3. Παπαπαναγιώτου Ι, Κυριαζοπούλου – Δαλαΐνα Β., (2001), Ιατρική Μικροβιολογία και ιολογία. 1η έκδοση *University Studio Press. Θεσσαλονίκη*.
4. Aman B., Ciobanu G., (2011), Mutual mobile membranes with objects on surface. *Natural Computing*. 10. 777-793. <http://dx.doi.org/10.1007/s11047-011-9249-x>
5. Babakhani S., Oloomi M., (2018), Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *Journal of basic microbiology*, 58(11), 905–917. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800204>
6. Bhaya D., Davison M., Barrangou R., (2012), CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation, *Annu Rev Genet* 2011;45:273-97. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132430>
7. Bijoya P., Guillermo M., (2019), CRISPR-Cas12a: Functional overview and applications, *Biomed J*. 2020 Feb;43(1):8-17. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2019.10.005>
8. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich S. D., (2005), Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 151(8):2551–2561. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>
9. Breidenstein EBM, de la Fuente-Nunez C., Hancock REW. (2011), *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol* 2011; 19: 419-26. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>

10. Brown R.W., (1956), Composition of Scientific Words, *Smithsonian Institutional Press*, ISBN: [978-0-87474-286-2](https://doi.org/10.4161%2Fbact.1.1.14942)
11. Clokie M., Millard A., Letarov A., Heaphy S., (2011), Phages in nature, *Bacteriophage*. 2011 Jan-Feb; 1(1): 31–45. <https://dx.doi.org/10.4161%2Fbact.1.1.14942>
12. Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J. E., Labonté, J., Fremaux, C., Boyaval, P., Romero, D. A., Horvath, P., & Moineau, S., (2008), Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of bacteriology*, 190(4), 1390–1400. <https://doi.org/10.1128/JB.01412-07>
13. El-Shazly S, Dashti A, Vali L, Bolaris M, Ibrahim AS, (2015), Molecular epidemiology and characterization of multiple drug-resistant (MDR) clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. 2015 Dec;41:42–9.
14. Ellington M.J., Kistler J., Livermore D.M., Woodford N., (2007), Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Feb;59(2):321-2. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl481>
15. Frost, L., Leplae, R., Summers, A. *et al.*, (2005), Mobile genetic elements: the agents of open-source evolution. *Nat Rev Microbiol* 3, 722–732. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1235>
16. Hatoum-Aslan A., Marraffini L.A. (2014), Impact of CRISPR immunity on the emergence and virulence of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol*, 2014, 17, 82-90. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.12.001>
17. Henry, R. (August 2012). "Etymologia: Pseudomonas". *Emerging Infectious Diseases*. 18 (8): 1241. doi:10.3201/eid1808.ET1808. Retrieved 27 February 2021.
18. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A., (1987), Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product., *J Bacteriol* 169(12):5429–5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>

19. Jansen, R., Embden, J. D., Gastra, W., & Schouls, L. M., (2002), Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*, 43(6), 1565–1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
20. Javed, M.R., Sadaf, M., Ahmed, T. *et al.*, (2018), CRISPR-Cas System: History and Prospects as a Genome Editing Tool in Microorganisms., *Curr Microbiol* 75, 1675–1683. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1547-4>
21. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E., (2012), A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity., *Science* 337(6096):816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
22. Jolley K.A., Bray J.E., Maiden MCJ, (2018), Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res.* Sep 24;3:124, PMID:30345391; PMCID: PMC6192448. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
23. Kim, J. S., Cho, D. H., Park, M., Chung, W. J., Shin, D., Ko, K. S., & Kweon, D. H., (2016), CRISPR/Cas9-Mediated Re-Sensitization of Antibiotic-Resistant Escherichia coli Harboring Extended-Spectrum β -Lactamases. *Journal of microbiology and biotechnology*, 26(2), 394–401. <https://doi.org/10.4014/jmb.1508.08080>
24. Koonin E., Makarova K., Zhang F., (2017), Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems, *Curr Opin Microbiol.* 2017 June; 37: 67–78. <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.mib.2017.05.008>
25. Lesk A.M., (2017), Introduction to genomics, *Oxford Uni. Press.* [ISBN 978-0-19-9564435-4](https://doi.org/10.1017/9780199564435)
26. Louwen R., Staals R.H.J., Endtz H.P., Baarlen P., Oost J., (2014), The role of CRISPR-Cas systems in virulence of pathogenic bacteria., *Microbiol Mol Biol Rev* 2014 Mar;78(1):74-88. <https://doi.org/10.1128/mubr.00039-13>
27. Luz, A.C.O., da Silva, J.M.A., Rezende, A.M. *et al.*, (2019), Analysis of direct repeats and spacers of CRISPR/Cas systems type I-F in Brazilian clinical strains of Pseudomonas

- aeruginosa. *Mol Genet Genomics* 294, 1095–1105 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00438-019-01575-7>
28. Madigan M., Martinko J., Bender S., Buckley D., Stahl D., (2018) Brock Βιολογία των Μικροοργανισμών (14^η αμερικανική έκδοση), Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης 2015.
29. Mahillon J., & Chandler M., (1998), Insertion sequences. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 62(3), 725–774. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.725-774.1998>
30. Makałowski W., Gotea V., Pande A., Makałowska I., (2019), "Transposable Elements: Classification, Identification, and Their Use As a Tool For Comparative Genomics". In Anisimova M (ed.). *Evolutionary Genomics. Methods in Molecular Biology*. 1910. Clifton, N.J. pp. 185–86., ISBN 978-3-8055-8341-1. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9074-0_6
31. Makarova, K., Wolf, Y., Alkhnbashi, O. et al., (2015), An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 13, 722–736. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569>
32. Reimer L. C., Vetscininova A., Carbasse J. S., Söhngen C., Gleim D., Ebeling C., Overmann J., (2019), Bacterial phenotypic data for High-throughput biodiversity analysis, , *Nucleic Acids Research*, Volume 47, Issue D1, 08 January 2019, Pages D631–D636, <https://doi.org/10.1093/nar/gky879>
33. Shivram H., Cress B., Knott G., Doudna J., (2021), Controlling and enhancing CRISPR systems, *Nat Chem Biol*. 2021 Jan;17(1):10-19. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-00700-7>
34. Sorek, R., Kunin, V. & Hugenholtz, P., (2008), CRISPR — a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol* 6, 181–186. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1793>
35. Summers D., (1996), Chapter 1-The Function and Organization of Plasmids, *The Biology of Plasmids* (First ed.). Wiley-Blackwell. pp. 21–22. ISBN [978-0632034369](https://doi.org/10.1002/9780632034369)

36. Tansirichaiya S., Mullany P., Roberts A.P., (2016), PCR-based detection of composite transposons and translocatable units from oral metagenomic DNA. *FEMS microbiology letters*, 363(18), fnw195. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw195>
37. Walsh T. R., Toleman M. A., Poirel L., & Nordmann P. (2005), Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm?. *Clinical microbiology reviews*, 18(2), 306–325. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.306-325.2005>
38. Wang G., Song G., Xu Y., (2020), Association of CRISPR/Cas System with the Drug Resistance in *Klebsiella pneumoniae*, *Infect Drug Resist.* 2020;13:1929–1935. <https://dx.doi.org/10.2147%2FIDR.S253380>
39. Zango U.U., Ibrahim M., Shawai S.A.A., Shamsuddin I.M., (2019), A review on β -lactam antibiotic drug resistance, *MOJ Drug Develop Ther.*, 2019;3(2):52-58. <https://dx.doi.org/10.15406/mojddt.2019.03.00080>
40. Zhanel G.G., Wiebe R., Dilay L., Thomson K., Rubinstein E., Hoban D.J., Noreddin A.M., Karlowsky J.A., (2007), Comparative review of the carbapenems., *Drugs*. 2007, 67(7): 1027-52. 38. <https://doi.org/10.2165/00003495-200767070-00006>
41. Zhao W. H., & Hu Z. Q. (2010), Beta-lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Critical reviews in microbiology*, 36(3), 245–258. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.481763>
42. Zhao W. H., & Hu Z. Q., (2011), Epidemiology and genetics of VIM-type metallo- β -lactamases in Gram-negative bacilli. *Future microbiology*, 6(3), 317–333. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.13>

Σύνδεσμοι (links) :

1. <https://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html>
2. <https://ostr.ccr.cancer.gov/bioinformatics/software/geneious/>