

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Συγκριτική γονιδιωματική ανάλυση θαλάσσιων βακτηριοφάγων

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Γ. ΣΚΛΗΡΟΣ

Επιβλέπων καθηγητής: Εμμανουήλ Φλεμετάκης



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS SCHOOL OF FOOD, BIOTECHNOLOGY & DEVELOPMENT DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY LABORATORY OF MOLECULAR BIOLOGY

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

PhD THESIS

`

Συγκριτική γονιδιωματική ανάλυση θαλασσίων βακτηριοφάγων

Comparative genomic analysis of marine bacteriophages

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Γ. ΣΚΛΗΡΟΣ

Dimitrios G. Skliros

Επιβλέπων καθηγητής

Εμμανουήλ Φλεμετάκης

Supervisor

Professor Emmanouil Flemetakis

AOHNA, 2018

ATHENS, 2018

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Συγκριτική γονιδιωματική ανάλυση θαλασσίων βακτηριοφάγων

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Γ. ΣΚΛΗΡΟΣ

Επιβλέπων καθηγητής:

Φλεμετάκης Εμμανουήλ, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

Φλεμετάκης Εμμανουήλ, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων) Κίντζιος Σπυρίδων, Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος) Λάμπρου Νικόλαος, Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Επταμελής εξεταστική επιτροπή:

Φλεμετάκης Εμμανουήλ, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ Κίντζιος Σπυρίδων, Καθηγητής ΓΠΑ Λάμπρου Νικόλαος, Καθηγητής ΓΠΑ Χατζόπουλος Πολυδεύκης, Καθηγητής ΓΠΑ Ρήγας Σταμάτιος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ Καθάριος Παντελής, Ερευνητής Β΄, Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών Μπέης Δημήτριος, Ερευνητής Γ΄, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών, Ακαδημίας Αθη-

Η τριμελής συμβουλευτική επιτροπή ορίστηκε με απόφαση της Γ.Σ.Ε.Σ., Συνεδρία 11^η 23/4/2013. Το θέμα ορίστηκε με απόφαση της Γ.Σ.Ε.Ε., Συνεδρία 14^η 4/7/2013.

Περίληψη

Λέξεις κλειδιά/ Key words:

Βακτηριοφάγοι, Vibrios, Vibrio alginolyticus, ανθεκτικότητα στους βακτηριοφά-γους, μεταγραφομική, μεταβολομική, sirtuins, NAD+ μεταβολισμός, homing endonucleases, νουκλεοτιδικές αναγωγάσες.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, πραγματοποιήθηκε απομόνωση και/ή πλήρης χαρακτηρισμός, συμπεριλαμβανομένου του γονιδιωμάτος και των γονιδίων τους, για πέντε λυτικούς βακτηριοφάγους των οικογενειών Myoviridae και Siphoviridae, όπου ονομάστηκαν @Grn1, @St2, Aphrodite1, Athena1 and Ares1 και θεωρούνται καλοί υποψήφιοι για εφαρμογή φαγοθεραπείας στις υδατοκαλλιέργειες απέναντι στα παθογόνα των ψαριών του γένους Vibrio. Η φυλογενετική ανάλυση και η συγκριτική γονιδιωματική έδειξε ότι οι φGrn1 και φSt2 ανήκουν στον κλάδο "schizoT4like", ο Aphrodite1 στον κλάδο "phiKZlikevirus", ο Athena1 σε μη καταταγμένους σε κλάδους φάγους της οικογένειας Myoviridae και ο Ares1 σε μη καταταγμένους σε κλάδους φάγους της οικογένειας Siphoviridae. Μετά την αλληλούχιση των φGrn1 και φSt2, πραγματοποιήθηκε λειτουργική γονιδιωματική με ανάλυση των μεταγραφημάτων του ιού και του βακτηρίου, ώστε να μελετηθούν τα γονίδια που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση των δύο την ώρα της μόλυνσης. Αν και οι αναφορές με νεοαλληλουχημένα γονιδιώματα έχουν προσφέρει μεγάλο και χρήσιμο όγκο πληροφορίας τα τελευταία χρόνια, η βασική έρευνα σχετιζόμενη με τον μεταβολικό χειρισμό που βιώνει ο ξενιστής από τον ιό την ώρα της μόλυνσης από τους "schizoT4like" φάγους απουσιάζει. Η λειτουργία πολλών ανοιχτών αναγνωστικών πλαισίων των βακτηριοφαγικών γονιδιωμάτων παραμένει άγνωστη. Όμως, η in silico πρόβλεψη γονιδίων αποκάλυψε πολλά από αυτά που σχετίζονται με την βιοσύνθεση του NAD⁺, μία πρωτεΐνη με δράση σιρτουίνης (Sir2/cobB πρωτεΐνη), αλλά και γονιδίων που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση νουκλεοτιδίων, απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό του φαγικού DNA. Αυτά τα γονίδια κλειδιά μελετήθηκαν περαιτέρω μέσω μεταγραφομικής ανάλυσης κατά τη διάρκεια της μόλυνσης. Ακόμα, η συγκριτική γονιδιωματική χρησιμοποιήθηκε για να εντοπιστούν και να χαρακτηριστούν μεταθετές ενδονουκλεάσες που φέρουν τα φαγικά γονιδιώματα, μαζί με τα tRNAs και τις φαγικές λυσοζύμες. Η παρούσα διδακτορική διατριβή προτείνει μία πολύπλοκη μεταβολική αλληλεπίδραση του δυαδικού συστήματος Vibrio-λυτικός φάγος, αλλά και έναν μεταβολικό χειρισμό που υπόκειται ο ξενιστής από τον ιό συμπεριλαμβανομένης μίας μεταμεταφραστικής πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης με στόχο την ενεργοποίηση πολλών ενζύμων. Μοναδικά και ενδιαφέροντα στοιχεία των άλλων τριών βακτηριοφάγων επίσης αναλύονται και συζητιούνται. Ο βιολογικός έλεγχος παθογόνων βακτηρίων με βακτηριοφάγους, ή αλλιώς φαγοθεραπεία, έχει επανέλθει στο προσκήνιο τα τελευταία χρόνια σε μια προσπάθεια να αντιμετωπιστούν τα βακτήρια που είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά. Παρόλα αυτά όμως η εφαρμογή καθυστερεί, με έναν από τους λόγους να είναι η ανθεκτικότητα που εμφανίζουν τα βακτήρια στους ιούς. Αν και πολλοί μοριακοί ενδοκυτταρικοί μηχανισμοί έχουνε περιγραφεί και μελετηθεί τα τελευταία χρόνια και ευθύνονται για την ανθεκτικότητα, η έρευνα γύρω από μηχανισμούς άμυνας που συμπεριλαμβάνουν την αναδιάταξη των πρωτεϊνών-καναλιών της κυτταρικής μεμβράνης των ανθεκτικών στελεχών παραμένει ανεπαρκής. Τα βακτήρια μπορούν να αναπτύξουν ανθεκτικότητα σε λυτικούς φάγους, όχι μόνο μέσα από ενεργειακά δαπανηρές μεταλλάξεις, αλλά και μέσα από αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών που λειτουργούν ως υποδοχείς του ιού. Αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση που παρατηρήθηκαν σε μεμβρανικές και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες δείχνουν ότι μπορούν να προσφέρουν ανθεκτικότητα έναντι λυτικών βακτηριοφάγων στο Vibrio alginolyticus. Τα ανθεκτικά στους ιούς στελέχη παρουσίασαν επίσης και φαινοτυπικές αλλαγές, όπως στο ρυθμό ανάπτυξης, αλλά και τους ενδοκυτταρικούς μεταβολίτες. Αυτές οι διαφορές συσχετίστηκαν με αλλαγές στα σχετικά ποσοστά έκφρασης σακχάρων και αμινοξέων ABC, PTS και άλλων μεταφορέων. Ποιο συγκεκριμένα, οι μεταφορείς στόχοι έδειξαν πολύ μειωμένη έκφραση σε σχέση με τα μη ανθεκτικά στελέχη, ενώ κάποια επίπεδα έκφρασης ήταν κοντά στο μηδέν. Τέλος έγινε μελέτη στο μεταγραφικό πρότυπο βιοχημικών μονοπατιών που σχετίζονται με τον κύκλο του κιτρικού οξέος και τη βιοσύνθεση διαφόρων απαραίτητων αμινοξέων. Πολλοί μηχανισμοί άμυνας των βακτηρίων έναντι των βακτηριοφάγων έχουν αναφερθεί ως τώρα, παρόλα αυτά οι μηχανισμοί που ενορχηστρώνουν τον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό στα ανθεκτικά στελέχη παραμένουν αρκετά ανεξερεύνητοι. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα ανθεκτικά στελέχη μπορούν να μειώσουν την μεταγραφή μεμβρανικών πρωτεϊνών, όπως οι μεταφορείς θρεπτικών, και να επαναπρογραμματίσουν τον μεταβολισμό τους. Η παρούσα διδακτορική διατριβή προωθεί το γένος Vibrio για μελέτη των μηχανισμών άμυνας των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, απέναντι στους φυσικούς τους εχθρούς, εστιάζοντας στην ανθεκτικότητα που προκύπτει ως αποτέλεσμα μεταβολικής προσαρμογής και επαναπρογραμματισμού, ενώ ταυτόχρονα ενισχύει την πεποίθηση ότι για την αντιμετώπιση της ανάπτυξης ανθεκτικότητας των βακτηρίων κατά τη φαγοθεραπεία, απαιτείται η χρήση φαγικών κοκτέιλ.

Title

Comparative genomic analysis of marine bacteriophages

Abstract

Key words:

Bacteriophages, *Vibrios*, *Vibrio alginolyticus*, phage resistance, transcriptomics, metabolomics, sirtuins, NAD+ metabolism, homing endonucleases, nucleotide reductases.

Isolation and/or full characterization, including sequencing and annotations, was performed for five double stranded DNA bacteriophages of the Myoviridae and Siphoviridae families, named \u03c6Grn1, \u03c6St2, Aphrodite1, Athena1 and Ares1, considered to be of great interest for phage therapy against Vibrios. Phylogenetic analysis revealed that φ Grn1 and φ St2 belong to the "schizoT4like" clade, Aphrodite1 to "phiKZlikevirus" clade, Athena1 to an unclassified clade of Myoviridae family and Ares1 to an unclassified clade of Siphoviridae family. In addition, phage-host metabolic interactions and exploitation was studied by transcript profiling of selected viral and host genes. Although many reports of newly sequenced viruses have provided a large set of information, basic research related to the shift of the bacterial metabolism during infection remains stagnant. The function of many viral protein products in the process of infection is still unknown. Regarding the two "schizoT4like" phages genome annotation identified the presence of several viral open reading frames (ORFs) participating in metabolism, including a Sir2/cobB (sirtuin) protein and a number of genes involved in auxiliary NAD⁺ and nucleotide biosynthesis, necessary for phage DNA replication. Key genes were subsequently selected for detail study of their expression levels during infection. Additionally comparative genomic analysis with other Vibrio phages was also performed to establish the presence and location of homing endonucleases, tRNAs and lysozymes, highlighting distinct features for them. This work suggests a complex metabolic interaction and exploitation of the host metabolic pathways and biochemical processes, including a possible post-translational protein modification, by "schizoT4like" viruses during infection. Distinctive features of the other 3 viruses are also studied and discussed. Phage therapy interest has been revived during the last decade in an attempt to tackle antibiotic resistant bacteria, but its application is hampered by the development of phage-resistant bacterial strains. Although bacterial intracellular molecular mechanisms of resistance development against phage infections have been well characterized over the years, the knowledge about defensive mechanisms that include alterations in membrane proteins remains inadequate. Bacteria can develop resistance against phages not only through costly constitutive mutations, but also by altering, shutting down or diminishing the expression of specific transmembrane channels. Transcriptional changes of membrane and transmembrane transporters of the Gram negative fish pathogen Vibrio alginolyticus were monitored on phage-resistant strains against 3 of the lytic Vibrio phages isolated and/or characterized in the current thesis, belonging to "schizoT4like" and "phiKZlikevirus" clades of Myoviridae family and a lytic bacteriophage belonging to Siphoviridae family. Phageresistant strains of V. alginolyticus revealed also phenotypic differences on growth rate and metabolic activity compared to the wild type strain. We correlated these differences with changes in the transcription levels of sugar and amino acid ABC, PTS and other transporters. More specifically, the targeted transporters were downregulated, whereas some transcript levels were almost totally depleted. Changes of intracellular metabolites in the resistant strains were also monitored. Finally, we studied the transcriptional pattern of the biochemical pathways of TCA cycle and amino acid biosynthesis. Several defense mechanisms that bacteria may utilize in order to circumvent viral attack, have been reported in the literature, yet the mechanisms that regulate the metabolic reprogramming of phage-resistant strains remain rather unexplored. These results suggest that phage resistant bacteria are able to diminish the transcription levels of the membrane transporters and reprogram their metabolism. The present work promotes Vibrio sp. for studying the mechanisms that Gram negative bacteria may follow against their viral predators, emphasizing that phage resistant phenotype in Vibrio species can be a result of a metabolic adaptation and reproramming, while also strengthens the concept for developing phage cocktails against resistant to antibiotics bacteria.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην παρούσα διδακτορική διατριβή περιλαμβάνονται στις παρακάτω επιστημονικές δημοσιεύσεις, ομιλίες, ανακοινώσεις σε συνέδρια και στην παγκόσμια τράπεζα γονιδιωμάτων:

Δημοσιεύσεις:

Skliros, D., Kalatzis, P.G., Katharios, P., Flemetakis, E. (2016).

Comparative Functional Genomic Analysis of Two *Vibrio* Phages Reveals Complex Metabolic Interactions with the Host Cell. Frontiers in Microbiology 7: 1807. DOI:10.3389/fmicb.2016.01807.

Skliros D., Kalatzis P. G., Papathanasiou S., Komaitis F., Kalloniati C., Kouri E. D., Udvardi M., Kokkari C., Katharios P., Flemetakis E.

Phage resistance in *Vibrio sp.* unravels a complex metabolic adaptation strategy. *In preparation.*

Skliros D., Karpouzis E., Katharios P., Flemetakis E.

Comparative genomics analysis of dwarf *Myoviridae* Vibriophages. *In preparation*

Συνέδρια:

Skliros, D., Kalatzis, P. G., Komaitis, F., Kalloniati, C., Kouri, E. D., Udvardi, M., Kokkari, C., Katharios, P., Flemetakis, E.

Phage resistance in *Vibrio sp.* unravels a complex metabolic adaptation strategy. 68th Congress of the Hellenic Society of Biochemistry και Molecular Biology, Athens 10-12 November 2017, p.32. (POSTER)

Skliros, D., Kalatzis, P.G., Papathanasiou S., Tsikrika E., Kokari K., Katharios, P., Flemetakis, E.

Transcriptional regulation of membrane transporters confers phage-resistant phenotype in *Vibrio alginolyticus*. (2017). Centennial Celebration of Bacteriophage Research, Institute Pasteur, Paris, France. (POSTER)

Skliros, D., Kalatzis, P.G., Katharios, P., Flemetakis, E.

Comparative functional genomic analysis of two *Vibrio* phages reveals metabolic hijacking of the host cell. (2016). 67th Annual of Biochemistry και Molecular Biology, Ioannina, Greece. (ΟΜΙΛΙΑ)

Skliros, D., Kalatzis, P.G., Katharios, P., Flemetakis, E.:

Characterization of three newly isolated lytic bacteriophages with potential therapeutic use in aquaculture. (2015). European Bioremediation conference, Chania, Crete, Greece. (POSTER)

Skliros, D., Kalatzis, P.G., Katharios, P., Flemetakis, E.

Comparative genomics of *Vibrio alginolyticus* phages φ Grn1 kal φ St2, potential candidates yla phage therapy in aquaculture. (2015). 66th Annual of Biochemistry kal Molecular Biology, Athens, Greece. (OMI/IA)

Κατατεθειμένα γονιδιώματα στην παγκόσμια τράπεζα γονιδιωμάτων (GenBank):

1. φGrn1 KT919972 Skliros, D., Kalatzis, P.G., Katharios, P., Flemetakis, E., 2016

2. φSt2 KT919973 Skliros, D., Kalatzis, P.G., Katharios, P., Flemetakis, E. 2016

3. Aphrodite1 MG720308 Skliros, D., Kalatzis, P.G., Katharios, P., Flemetakis, E., 2017

4. Ares1 MG720309 Skliros, D., Kalatzis, P.G., Katharios, P., Flemetakis, E., 2017

5. Athena1 MG640035 Skliros, D., Kalatzis, P.G., Katharios, P., Flemetakis, E., 2017

Μετακινήσεις:

Από το 2013 έως σήμερα βρέθηκα το έτος 2014 για 1 μήνα στο εργαστήριο μοριακής βιολογίας του Ινστιτούτου George Eliava στην Τυφλίδα της Γεωργίας, όπου και εκπαιδεύτηκα σε τεχνικές χειρισμού βακτηριοφάγων υπό εργαστηριακές συνθήκες. Η μετακίνησή μου χρηματοδοτήθηκε από το την Ευρωπαϊκή Ένωση στα πλαίσια του FP7 Marie Curie, IRSES 2010, όνομα έργου: AQUAPHAGE και με αριθμό χρηματοδότησης 269175.

Κατά τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής μου επίσης βρέθηκα για αρκετά μικρά χρονικά διαστήματα (1-5 ημερών) και στο Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών που υπάγεται στο Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών στο Ηράκλειο της Κρήτης.

Τέλος φιλοξενήθηκα σαν επισκέπτης ερευνητής στην Εταιρεία LifeSequencing στην Βαλένθια της Ισπανίας για 2.5 μήνες τέλος του 2017 και αρχές 2018. Μία εταιρεία που δραστηριοποιείται στον χώρο της γονιδιωματικής και βιοπληροφορικής ανάλυσης. Η μετακίνησή μου χρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση, στα πλαίσια του Horizon 2020, Marie Skłodowska-Curie, με όνομα έργου Algae4AB και με αριθμό χρηματοδότησης No 691102.

Αντί προλόγου-Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ολοκληρώνοντας τον μακρόχρονο κύκλο σπουδών μου θα ήθελα καταρχήν να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή Εμμανουήλ Φλεμετάκη για την μακροχρόνια και πολύ εποικοδομητική συνεργασία που έχουμε και διατηρούμε. Οι συμβουλές του, πέρα από τις γνώσεις του και το μεράκι του που είχε καθημερινά, με οδήγησαν στο να αποκτήσω έναν ολοκληρωμένο κριτικό τρόπο σκέψης γύρω από την επιστημονική και επαγγελματική μου νοοτροπία που θα με ακολουθεί στην υπόλοιπη καριέρα μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής καθ. Νικόλαο Λάμπρου και καθ. Σπυρίδων Κίντζιο, καθώς και όλα τα μέλη της επιτροπής αξιολόγησης για την κριτική ανάγνωση του κειμένου και τις παρατηρήσεις τους.

Ειδικότερα ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να πω στον Δρ Παντελή Καθάριο από το Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών που με καθοδήγησε και βοήθησε κατά τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής μου, ενώ ταυτόχρονα με φιλοξένησε και στις εγκαταστάσεις του Θαλασσίου Κέντρου Ερευνών στο Ηράκλειο της Κρήτης όσο φορές κρίθηκε απαραίτητο.

Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω όλα τα άτομα που βρίσκονταν γύρω μου όλα αυτά τα χρόνια στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και πιο συγκεκριμένα την Δρ Χρυσάνθη Καλλονιάτη, τον Φώτη Κωμαΐτη, τον Γιώργο Καραλιά, την Μαρία Πατέλου, την Δρ Κατερίνα Καλιαμπάκου και την Ευαγγελία Κουρή που με το μεράκι τους και την ανιδιοτέλεια τους με βοήθησαν ο καθένας με τον δικό του τρόπο για να ολοκληρώσω την διατριβή που χωρίς αυτούς δεν θα είχα καταφέρει. Τους ευχαριστώ όλους θερμά, για το ευχάριστο εργασιακό περιβάλλον που μου προσέφεραν, που υπήρξαν

Σε αυτό το πλαίσιο χαίρομαι επίσης για τη γνωριμία και τη συνεργασία, αλλά και φιλία που απέκτησα όλο αυτόν το διάστημα με τον Δρ Παναγιώτη Καλατζή από το Πανεπιστήμιο της Κοπεγχάγης, όπου δουλεύαμε σε δρόμους παράλληλους, αλλά με διαφορετική οπτική γωνία. Η τηλεφωνική επικοινωνία και οι συναντήσεις μαζί του σε διεθνή συνέδρια, σε εργαστηριακούς χώρους, αλλά και στην κουζίνα του ΕΛΚΕΘΕ, ήταν κάτι παραπάνω από εποικοδομητικές και ευχάριστες και ευελπιστώ και σε μελλοντική συνεργασία μαζί του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον Καθηγητή Κωνσταντίνο Φασσέα για την πολύτιμη βοήθειά του με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα άτομα του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας, του εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας τροφίμων, του εργαστηρίου Φυσιολογίας, Θρέψεως και Διατροφής, του εργαστηρίου Ενζυμικής Τεχνολογίας, καθώς επίσης και του Εργαστηρίου Βελτίωσης Φυτών και Γεωργικού Πειραματισμού του ΓΠΑ, που όποτε χρειάστηκα με βοήθησαν καταλυτικά, καθώς επίσης και όλους τους φοιτητές που έκαναν την πρακτική, την πτυχιακή ή την μεταπτυχιακή τους διατριβή δίπλα μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και τους φίλους μου Μιχάλη, Κώστα, Ξένια, Αλέξανδρο, Χρήστο, Άγγελο, Παναγιώτη, Γιάννη και Καλλιόπη για την ψυχολογική συμπαράσταση και τις ώρες ξεγνοιασιάς που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια.

Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ για τον Βαγγέλη Άγα που φιλοτεχνήθηκε και το εξώφυλλο της διατριβής, αλλά και κάποια σχήματα που αφορούν τη συζήτηση των αποτελεσμάτων.

Τέλος θα ήθελα από καρδιάς να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και πιο συγκεκριμένα τους γονείς μου Γιώργο και Πέννυ και τον αδερφό μου Βασίλη που με υπέμειναν όλα αυτά τα χρόνια και με στήριξαν οικονομικά, ψυχολογικά, ηθικά και χωρίς αυτούς σήμερα δε θα μπορούσα να έχω κάνει την μεγάλη μου αγάπη και χόμπι, επάγγελμα.

Θα ήθελα να αφιερώσω την ολοκλήρωση της προσπάθειας μου στον πατέρα μου και φίλο μου Γιώργο που πέρα από τον τρόπο σκέψης, την υπομονή, τις γνώσεις, το χιούμορ και την ηθική που μου εμφύσησε, δυστυχώς δε βρίσκεται σήμερα δίπλα μου να δει να ολοκληρώνω και να υλοποιώ τους κόπους του. «...Το επόμενο πρωινό, ανοίγοντας τον επωαστή, έζησα μία από αυτές τις σπάνιες στιγμές έντονου συναισθηματισμού που είναι σαν την ηθική επιβράβευση ενός επιστήμονα για όλο τον πόνο και τις δυσκολίες που βιώνει όλα τα χρόνια της εργαστηριακής του δουλειάς: με την πρώτη ματιά είδα το θρεπτικό διάλυμα, το οποίο την προηγούμενη νύχτα ήταν θολό από την παρουσία βακτηρίων, να είναι εντελώς καθαρό. Όλα τα βακτήρια είχαν εξαφανιστεί, είχανε διαλυθεί, σαν την ζάχαρη στο νερό...αυτό που προκάλεσε τα συναισθήματά μου να εκραγούν ήταν η αναλαμπή ότι επιτέλους κατάλαβα. Αυτό που προκάλεσε τις λυτικές περιοχές, ήταν, ένα αόρατο μικρόβιο, ένας ιός που μπορούσε να φιλτραριστεί, αλλά και ένας ιός που παρασιτεί στα βακτήρια...».

από την αυτοβιογραφία του Felix d'Herelle

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα	15
1 Εισαγωγή	21
	04
1.1 Βακτηριοφαγοι	
1.1.1 Γενικα	
1.1.2 ιστορική ανασκοτησή της ερεύνας των βακτηριοφάγων	
1.2 Η βιολογία των βακτηριοφάγων	24
1.2.1 Στάδια μόλυνσης βακτηριοφάγων	26
1.2.2 Μοριακοί μηχανισμοί μόλυνσης των βακτηριοφάγων	29
1.2.3 Μοριακοί μηχανισμοί πολλαπλασιασμού των βακτηριοφάγων	32
1.2.4 Μηχανισμοί λύσης βακτηριοφάγων	38
1.3 Συγκριτική γονιδιωματική ανάλυση	38
1.3.1 Γενικά	38
1.3.2 Ο βακτηριοφάγος λ (lambda phage)	40
1.3.3 Ο βακτηριοφάγος Τ4	41
1.3.4 Ο βακτηριοφάγος KVP40	47
1.3.5 Ο βακτηριοφάγος <i>φ</i> ΚΖ	49
1.3.6 Συγκριτική γονιδιωματική ανάλυση μικρών (dwarf) <i>Myoviridae</i> βακτηριοφάγων	53
1.3.7 Η οικογένεια <i>Siphoviridae</i>	55
1.3.8 Το μέγεθος και το είδος του γονιδιώματος συσχετίζεται με το μέγεθος της κεφα	λής,
αλλά όχι με τον όγκο του ιοσωματιδίου	56
1.4 Ανθεκτικότητα των βακτηρίων στους βακτηριοφάγους	57
1.4.1 Γενικά	57
1.4.2 Μοριακοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας των βακτηρίων: Το σύστημα CRISPR/Ca (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)	s 58
1.4.3 Μοριακοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας των βακτηρίων: Το σύστημα BREX	
(BacteRiophage EXclusion)	59
1.4.4 Οι προφάγοι προσφέρουν ανθεκτικότητα απέναντι σε άλλους βακτηριοφάγους.	60
1.4.5 Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς των βακτηρίων ως μηχανισμός	
ανθεκτικότητας έναντι των βακτηριοφάγων	63
1.5 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές βακτηριοφάγων σήμερα	65
1.6 Οι υδατοκαλλίεργειες και η ασθένεια της δονακίωσης	68

1.6.1 Το βακτήριο <i>Vibrio alginolyticus</i>	72
1.6.2 Η χρήση των αντιβιοτικών στις υδατοκαλλιέργειες	72
1.7 Στόχοι της παρούσας διδακτορικής διατριβής	75
2 Υλικά και μέθοδοι	79
2.1 Πειραματικός σχεδιασμός	79
2.2 Βακτηριακά στελέχη-στόχοι, θρεπτικό υλικό, χειραγώγηση βακτηριοφά και συνθήκες ανάπτυξης	ίγων 80
2.2.1 Βακτήρια-στόχοι	80
2.2.2 Το βακτήριο <i>Vibrio alginolyticus</i> στέλεχος V1, ως μοντέλο μελέτης αλληλεπιδράσεων ιού: ξενιστή	80
2.2.3 Ανάπτυξη βακτηρίων είδους <i>Vibrio</i>	81
2.2.4 Ταυτοποίηση βακτηρίων με την τεχνική αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμερό μοναδιαίας αποικίας (colony PCR)	ισης 81
2.2.5 Ανάπτυξη βακτηριοφάγων: Η τεχνική της αγαρόζης κορυφής	81
2.2.6 Απομόνωση βακτηριοφάγων από θαλάσσια δείγματα παράκτιων περιοχών	82
2.2.7 Πολλαπλασιασμός βακτηριοφάγων	83
2.2.8 Τιτλοδότηση και σταθερότητα βακτηριοφάγων	83
2.3 Πλήρης χαρακτηρισμός απομονωμένων βακτηριοφάγων	84
2.3.1 Προσδιορισμός εύρος ξενιστών βακτηριοφάγων	84
2.3.2 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (ΤΕΜ)	84
2.3.3 Απομόνωση γονιδιωματικού υλικού βακτηριοφάγων	84
2.3.4 Πέψη γονιδιώματος με ενδονουκλεάσες περιορισμού και μοτίβα πέψης	86
2.3.5 Πολυφασική καμπύλη ανάπτυξης και προσδιορισμός βιολογικών χαρακτηριστι βακτηριοφάγων	ικών 87
2.3.6 <i>Ιn vitr</i> ο αποτελεσματικότητα λύσης βακτηριοφάγων	88
2.3.7 Αλληλούχιση των γονιδιωμάτων των βακτηριοφάγων	89
2.4 Δημιουργία ανθεκτικών στελεχών Vibrio στους βακτηριοφάγους	90
2.5 Βιοπληροφοριακά εργαλεία ανάλυσης των γονιδιωμάτων και συγκριτ γονιδιωματικής	ιικής 91
2.5.1 Ανασύσταση γονιδιώματος (assembling)	91
2.5.2 <i>In silico</i> πρόβλεψη γονιδίων (annotation), συγκριτική γονιδιωματική και	
οπτικοποίηση τεταρτοταγών δομών πρωτεϊνών	91
2.6 Καμπύλες ανάπτυξης ανθεκτικών στελεχών	93
2.7 Απομόνωση ολικού RNA από τα βακτήρια	94

	2.7.1	Απομόνωση RNA βακτηρίων	94
	2.7.2	95	
	2.7.3	ών οξέων96	
	2.7.4	Ανάλυση δεοξυριβοζονουκλεϊνικών οξέων (DNA) σε πηκτή αγαρόζης	97
2.8	8 Αλυ	σιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	98
	2.8.1	Ενίσχυση ακολουθιών DNA με την χρήση της τεχνικής PCR	99
	2.8.2	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR)	100
	2.8.3	Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR -qrt PC	CR)101
2.9	9 Ανά	λυση μεταβολιτών με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μά	ζας (GC-
M	S)		103
	2.9.1	Εκχύλιση μεταβολιτών	103
	2.9.2	Παραγωγοποίηση (derivatization)	104
	2.9.3	Αέρια χρωματογραφία-Φασματομετρία μάζας (GC-MS)	105
2.'	10	Στατιστική ανάλυση	107
2. ′	11	Σύνθεση διαλυμάτων και θρεπτικών μέσων	108
	2.11.	1 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης βακτηρίων	108
	2.11.	2 Διαλύματα απομόνωσης DNA	108
	2.11.	3 Διαλύματα απομόνωσης ολικού RNA	108
	2.11.	4 Διαλύματα ανάλυσης νουκλεϊνικών οξέων	108
	2.11.	5 Διαλύματα αντιδράσεως PCR	109
	2.11.	6 Διαλύματα εκχύλισης και παραγωγοποίησης μεταβολιτών	109
3	Απο	τελέσματα και Συζήτηση	111
3. ′	1 Γενι	κά	111
3.2	2 Απο	μόνωση, χαρακτηρισμός και γονιδιωματική ανάλυση βακτηριο	φάγων112
	3.2.1	Απομόνωση και επιλογή βακτηριοφάγων	112
	3.2.2	Γονιδιωματική ανάλυση βακτηριοφάγων	116
	3.2.3	Ο βακτηριοφάγος <i>φ</i> Grn1	122
	3.2.4	Ο βακτηριοφάγος φSt2	124
	3.2.5	Συγκριτική γονιδιωματική ανάλυση των βακτηριοφάγων φGrn1 και φSt2	126
	3.2.6	Ο βακτηριοφάγος Aphrodite1	153
	3.2.7	Ο βακτηριοφάγος Ares1	174
	3.2.8	Ο βακτηριοφάγος Athena1	189
	3.2.9	Συγκεντρωτικά αποτελεσμάτα των βακτηριοφάγων που χαρακτηριστήκαν	πλήρως203

3.3 Μεταβολικός χειρισμός των κυττάρων ξενιστή20	05
3.3.1 Η μόλυνση με τους βακτηριοφάγους φGrn1 και φSt2 επιφέρει πολύπλοκες	
μεταβολικές αλληλεπιδράσεις με το βακτήριο ξενιστή	05
3.4 Η μελέτη της ανθεκτικότητας στους βακτηριοφάγους στο γένος Vibr «ξεδιπλώνει» μία νέα στρατηγική μεταβολικής προσαρμογής22	<i>'io</i> 21
3.4.1 Ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών του Vibrio alginolyticus σε λυτικούς	
βακτηριοφάγους22	21
3.4.2 Ενδοκυτταρικοί ή εξωκυτταρικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας;	25
3.4.3 Το μεταβόλωμα των ανθεκτικών βακτηρίων, μεταβάλλεται ανάλογα με το είδος το βακτηριοφάγου που έχει αλληλεπιδράσει24	บ 46
3.4.4 Ο βακτηριακός μεταβολικός επαναπρογραμματισμός συνεπάγεται και μεταβολικά κόστος	ว์ 51
3.4.5 Η βιολογία του συστήματος σε μεγάλη κλίμακα2	56
3.5 Βιολογικός έλεγχος παθογόνων και συνθετική βιολογία	56
3.6 Συμπεράσματα2	57
4 Παρατήματα25	9
Βιβλιογραφία	69

<u>Κεφάλαιο</u>

Εισαγωγή



1 Εισαγωγή

1.1 Βακτηριοφάγοι

1.1.1 Γενικά

Οι βακτηριοφάγοι ή φάγοι είναι η πολυπληθέστερη βιολογική οντότητα του πλανήτη με το συνολικό τον αριθμό τους να υπολογίζεται σε 10³¹ (Pedulla et al., 2003). Πρόκειται για ιούς με μοναδικούς ξενιστές βακτήρια οι οποίοι ανακαλύφθηκαν από τον Γαλλο-Καναδό μικροβιολόγο Felix d'Herelle και τον Edwart Twort (Duckworth, 1976). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιών και μικροοργανισμών αποτελούν την πιο κοινή αλληλεπίδραση ξενιστή-παράσιτου στη βιόσφαιρα και ευθύνονται για τη λύση περίπου του 20% των μικροοργανισμών (Clockie, 2011). Αν και η παρουσία τους στα θαλάσσια ενδιαιτήματα είναι άφθονη (Suttle, 2007), η ποικιλομορφία τους είναι περιορισμένη (Shano, 2004). Το γονιδίωμα τους μπορεί να αποτελείται από μονόκλωνο ή δίκλωνο DNA, αλλά και μονόκλωνο ή δίκλωνο RNA. Είναι φυσικό ότι όποτε τα βακτήρια βρίσκονται σε μεγάλους πληθυσμούς, οι βακτηριοφάγοι έχουν τις κατάλληλες συνθήκες για να αυξήσουν τον πληθυσμού τους.



Εικόνα 1.1: Ο Felix d'Herelle

1.1.2 Ιστορική ανασκόπηση της έρευνας των βακτηριοφάγων

Η πρώτη αναφορά ως «ιοί ικανοί να λύσουν βακτήρια» έγινε το 1917 από τον Felix d'Herelle. Ως μικροβιολόγος διεξήγαγε έρευνα εκείνο το διάστημα σε ασθένειες που προκαλούσαν βακτήρια.



Με την ανακάλυψη των βακτηριοφάγων ο ίδιος ο d'Herelle τους χρησιμοποίησε για βιολογικό έλεγχο παθογόνων βακτηρίων με την πρώτη εφαρμογή τους να περιγράφεται το 1919 (Kutter et al., 2011). Ταξίδεψε και στην Ασία, όπου μελέτησε περιστατικά χολέρας και βουβωνικής πανώλης το 1920. Επιστρέφοντας στην Γαλλία και στο Ινστιτούτο Παστέρ δημοσίευσε μια εργασία για τους βακτηριοφάγους (The Bacteriophage: Its Role in Immunity). Γρήγορα μέσα στον επόμενο χρόνο τα επιτεύγματά του έλαβαν ιδιαίτερη προσοχή. Οι επιστήμονες με την παρότρυνση του d'Herelle ξεκίνησαν να χρησιμοποιούν πολλούς διαφορετικούς βακτηριοφάγους για βιολογικό έλεγχο παθογόνων βακτηρίων (Hanlon, 2007), ενώ ο ίδιος έλαβε πολλά βραβεία και τίτλους ανάμεσά τους και την υποψηφιότητα για βραβείο Νόμπελ Ιατρικής. Όμως προσπαθούσαν να χειριστούν στο εργαστήριο μια «ουσία» που στην πραγματικότητα δεν είχαν δει ακόμα, αφού το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (ΤΕΜ) δεν είχε εφευρεθεί. Αποτέλεσμα αυτού ήταν να δημιουργούνται πολλά προβλήματα γύρω από την αξιοπιστία της εφαρμογής τους (Summers, 2001). Ένα κομβικό σημείο θεωρείται το ερευνητικό έργο που διεξήγαγε ο d'Herelle στην Τιφλίδα της Γεωργίας, δίπλα σε άλλους μικροβιολόγους όπως ο George Eliava. Τα βακτήρια αποτελούσαν

κυρίαρχη αιτία εμφάνισης παθήσεων στον άνθρωπο, αλλά και λόγος μειωμένης παραγωγής σε τομείς όπως η γεωπονία και η κτηνοτροφία. Ως αποτέλεσμα ο ίδιος ο George Eliava, διευθυντής ενός εκ των καλύτερων μικροβιολογικών ινστιτούτων, να μελετήσει τη χρήση των ιών για βιολογικό έλεγχο παθογόνων (Stone, 2002).



Εικόνα 1.3: Η είσοδος του ινστιτούτου George Eliava στην Τιφλίδα της Γεωργίας, ινστιτούτο που δούλεψαν οι Felix d'Herelle και George Eliava, ιδρυτής του τότε ινστιτούτου Τιφλίδας.

Σύντομα όμως έγινε γνωστό στο κοινό και ένα άλλο καινοτόμο για την εποχή φάρμακο που εξάλειφε τις βακτηριακές λοιμώξεις, το αντιβιοτικό πενικιλίνη. Αποτέλεσμα ήταν η έρευνα των βακτηριοφάγων να εστιαστεί στην μοριακή βιολογία τους και να προκύψουν πολλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές για προώθηση της βασικής έρευνας (Keen και Eric, 2012; Keen, 2012). Ωστόσο, μια δημοσίευση στο περιοδικό Science, με θέμα τα ανθεκτικά βακτήρια στα αντιβιοτικά, το 2002 κέντρισε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας (Stone, 2002) και επανέφερε τη χρήση τους για τον βιολογικό έλεγχο παθογόνων βακτηρίων.

Ο πρώτος ιός που παρατηρήθηκε στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ήταν το 1938 ένας ιός της οικογένειας *Poxviridae* (Borries et al., 1938), ενώ το πρώτο γονιδίωμα που αλληλουχήθηκε ήταν αυτό το βακτηριοφάγου MS2 το 1976, που αποτέλεσε και το πρώτο πλήρες γονιδίωμα που αλληλουχήθηκε ποτέ (Koonin and Galperin, 2003). Ένα κομβικό σημείο στις τεχνολογίες αλληλούχισης αποτελεί και το πλήρες γονιδίωμα του βακτηριοφάγου λ με μέγεθος 48.502 bp που ανακοινώθηκε το 1982 (Sanger et al., 1982).

1.2 Η βιολογία των βακτηριοφάγων

Ο μεγάλος αριθμός βακτηριοφάγων που έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί αποκαλύπτει πλέον την πολυπλοκότητα αυτών των μορφών ζωής. Μετά την εφεύρεση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (TEM) και αφού οι επιστήμονες κατάφεραν να δουν ό,τι προσπαθούσαν να χειριστούν για χρόνια, κατάλαβαν ότι το δυαδικό σύστημα φάγος-ξενιστής, έχει αρκετά ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά και διαφέρει αρκετά από τους ιούς των φυτών και των θηλαστικών (Stone, 2002). Το καψίδιό τους και η πρωτεϊνικής φύσης ουρά με τη δυνατότητα που έχει να συσπάται αποτελούν μέχρι και σήμερα μοναδικά σχέδια της φύσης.

Όσοι περισσότεροι βακτηριοφάγοι απομονώνονταν, τόσο πιο ξεκάθαρο γινόταν ότι ο αριθμός των διαφορετικών σχημάτων και μεγεθών από ιό σε ιό είναι πολύ μικρός. Έχουν βρεθεί 14 διαφορετικά σχήματα καψιδίου (Πίνακας 1.1) (Comeau, et al., 2012). Πιθανά οι βακτηριοφάγοι να προέρχονται από μικρό αριθμό κοινών προγόνων εξελικτικά και με την πάροδο εκατομμυρίων χρόνων τα γονίδια που καθορίζουν το σχήμα για το καψίδιο ή το έλυτρο της κεφαλής να είναι πολύ συντηρημένα. Κάτι τέτοιο μπορεί να συμβάινει γιατί η στερεοδιαμόρφωσή τους παίζει καθοριστικό και νευραλγικό ρόλο στην επιβίωση και την λυτική ικανότητα ενός ιοσωματιδίου (Comeau, et al., 2012). Φαίνεται ότι πιθανά πολλές φορές υπάρχουν ένζυμα «εγκλωβισμένα» σε συγκεκριμένη στερεοδιαμόρφωση στην κεφαλή των ιών έτοιμα να δράσουν κατά τις πρώτες φάσεις της μόλυνσης (Ceyssens et al., 2014), ενώ έχει ξεκινήσει και ανακατανομή των οικογενειών με βάση χαρακτηριστικά της γονιδιακής τους οργάνωσης. Συγκεκριμένα, η διεθνής αρχή ταξινόμησης ιών (International Committee of Taxonomy of Viruses (ICTV)) κατανέμει πλέον τους βακτηριοφάγους και με βάση το γονιδίωμά τους (Buchen-Osmond, 2003, Adriaenssens, 2017). **Πίνακας 1.1:** Οικογένεια, γενετικό υλικό, χαρακτηριστικά και σχήμα κεφαλής της πλειοψηφίας των ανακαλυφθέντων βακτηριοφάγων. Διακρίνεται ο μικρός αριθμός πιθανών σχημάτν κεφάλης.

Οικογένεια	Νουκλεϊκά οξέα	Χαρακτηριστικά	Μορφολογία
Myoviridae	Γραμμικό ds-DNA	Συσταλτή ουρά	
Siphoviridae	Γραμμικό ds-DNA	Μακρυά μη συσταλτή ουρά	\longrightarrow
Podoviridae	Γραμμικό ds-DNA	Κοντή ουρά	
Corticoviridae	Κυκλικό ds-DNA	Σύνθετο καψίδιο, λιπίδια	
Tectiviridae	Γραμμικό ds-DNA	Εσωτερική λιπιδιακή φουσκάλα	
Microviridae	Κυκλικό ss-DNA	12-μερείς καψιδια- κές κεφαλές	\Box
Cystoviridae	Κατακερματισμένο ds-RNA	Εξωτερικό λιπιδιακό στρώμα	\bigcirc
Leviviridae	Γραμμικό ss-RNA	Ισομετρικός	\bigcirc
Rudiviridae	Γραμμικό ds-DNA	Άκαμπτη ράβδος	

Inoviridae	Κυκλικό ss-DNA	Νήματα ή ράβδοι	
Lipothrixviridae	Γραμμικό ds-DNA	Μεγάλα πρωτεινικά καψίδια	
Fuselloviridae	Κυκλικό ds-DNA	Σχήμα λεμονιού	\bigcirc
Plasmaviridae	Κυκλικό ds-DNA	Χωρίς καψίδιο	\bigcirc

1.2.1 Στάδια μόλυνσης βακτηριοφάγων

Οι βακτηριοφάγοι διακρίνονται σε λυτικούς και λυσιγονικούς ή ήπιους ανάλογα με τον κύκλο πολλαπλασιασμού που έχουν. Είτε έχουν την ικανότητα να εισέλθουν στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή και να πολλαπλασιαστούν εκεί (λυτικοί), είτε να ενσωματώσουν το γονιδίωμά τους στο γονιδίωμα του ξενιστή και να πολλαπλασιάζονται ταυτόχρονα με τον πολλαπλασιασμό του ξενιστή (λυσιγονικοί) (Keary et al., 2013) (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4: Σχηματική απεικόνιση λυτικού και λυσιγονικού κύκλου βακτηριοφάγων (Keary et al., 2013).

Έχει φάνει ότι υπάρχει και ένας τρίτος τύπος κύκλου πολλαπλασιασμού, πέρα από τον λυτικό και λυσιγενικό, όπου ένα γονιδίωμα μπορεί να μείνει σε μορφή πλασμιδίου στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή, χωρίς να αντιγράφεται και να κληρονομείται τυχαία σε θυγατρικά κύτταρα, μέχρι να ξεκινήσει ο λυτικός κύκλος αντιγραφής (Cenens et al., 2013, Cenens et al., 2015). Ανεξάρτητα από το αν ένας βακτηριοφάγος είναι λυτικός ή ήπιος χρειάζεται τη λυτική οδό (Εικόνα 1.4, Εικόνα 1.5) για να πολλαπλασιαστεί, μια διαδικασία που συνοπτικά εξαρτάται από 5 κυρίως στάδια όπως περιγράφεται από Madigan et al., 2010:

Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την προσκόλληση του ιοσωματιδίου στη μεμβράνη του ξενιστή σε έναν υποδοχέα. Το στάδιο της προσκόλλησης είναι και αυτό που χαρακτηρίζει την εξειδίκευση των βακτηριοφάγων, αφού συνεξελικτικά έχουν αναπτύξει μέσα προσκόλλησης (ουρά, τριχοειδή πόδια) κατάλληλα για ένα μικρό εύρος ξενιστών. Κατά το στάδιο αυτό οι βακτηριοφάγοι της κλάσης *Caudovirales* μετά την προσκόλληση συστέλλουν την ουρά τους για να εναποθέσουν το διπλής έλικας DNA (adsorption) τους μέσα στο κύτταρο-ξενιστή. Οι πρώτες έρευνες γύρω από την ικανότητα των βακτηριοφάγων να μολύνουν έναν ξενιστή έγιναν γύρω από τους διαμεμβρανικούς μεταφορείς θρεπτικών και ιόντων που αποτελούν το μέσο για την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών για το κύτταρο. Φαίνεται ότι πολλοί βακτηριοφάγοι έχουν εξειδικευτεί να αναγνωρίζουν πρωτεΐνες στην επιφάνεια των βακτηριακών μεμβρανών που ανήκουν σε διαμεμβρανικούς μεταφορείς θρεπτικών, λιποπολυσακχαριτών, ξενοβιοτικών ουσιών και άλλων μορίων (Datta et al., 1977).

Η διείσδυση (penetration) και η εισαγωγή του γενετικού υλικού αποτελεί το δεύτερο στάδιο της μόλυνσης. Οι βακτηριοφάγοι συνήθως φέρουν στο κάτω μέρος της ουράς τους μια πρωτεΐνη της οικογένειας των λυσοζυμών που υδρολύει το στρώμα πεπτιδογλυκάνης των βακτηρίων για να βοηθήσει την εισαγωγή του DNA εντός του κυττάρου. Η ωσμωτική διαφορά που υπάρχει ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια είναι καθοριστικός παράγοντας για αυτό το στάδιο, ώστε να γίνει επιτυχώς η εισαγωγή του γονιδιωματικού υλικού.

Ο λυτικός κύκλος των βακτηριοφάγων ξεκινάει με την ανάγκη σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων για να μεταγράψει και να αντιγράψει το γονιδίωμα του. Ανεξάρτητα με το αν είναι λυτικός ή ήπιος είναι μια απαραίτητη διαδικασία προκειμένου να πολλαπλασιαστεί και αποτελεί ίσως το πιο πολύπλοκο στάδιο. Είναι το στάδιο της σύνθεσης (synthesis) και εξαρτάται από τη γενετική δεξαμενή και τα μοριακά «εργαλεία» που διαθέτει ο κάθε ιός και που θα χρησιμοποιήσει για να χειραγωγήσει φυσικές διεργασίες του κυττάρου ξενιστή προς όφελός του.

Αφού το γενετικό υλικό αντιγραφεί σε μεγάλες ποσότητες εντός του κυττάρου, γίνεται μεταγραφή και μετάφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της κεφαλής του βακτηριοφάγου, όπου και πακετάρεται το γονιδίωμα. Στη συνέχεια, γίνεται η ανασύσταση (assembling) του ιοσωματιδίου.

Τελευταίο στάδιο αποτελεί η απελευθέρωση (burst/release) των ώριμων ιοσωματιδίων. Η διαδικασία αυτή γίνεται μετά την κωδικοποίηση σε μεγάλο βαθμό πρωτεϊνών με δράση μουρεΐνης υδρολάσης (ενδολυσίνες) που υδρολύουν τις βακτηριακές μεμβράνες από μέσα προς τα έξω, ώσπου επέρχεται ο κυτταρικός θάνατος και η διασπορά των νέων ιοσωματιδίων στο περιβάλλον με στόχο την εκ νέου μόλυνση βακτηριακών κυττάρων.



Εικόνα 1.5: Συνοπτική σχηματική απεικόνιση της λυτικής οδού των βακτηριοφάγων (De smet et al., 2017).

1.2.2 Μοριακοί μηχανισμοί μόλυνσης των βακτηριοφάγων

Είναι λογικό ότι οι βακτηριοφάγοι χρειάζονται ένα μέσο επικοινωνίας του περιβάλλοντος με το κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή. Στην περίπτωση των θετικών κατά Gram βακτηρίων οι βακτηριοφάγοι έχουν τη δυνατότητα να προσκολούνται στο παχύ στρώμα πεπτυδογλυκάνης του βακτηρίου και πιο συγκεκριμένα αναγνωρίζοντας το τειχοϊκό οξύ και λιποτειχοϊκό οξύ (Baptista et al., 2007). Στη συνέχεια με τη δράση της λυσοζύμης η πεπτιδογλυκάνη αποικοδομείται και το γονιδίωμα εισέρχεται μέσα στο κύτταρο μέσω του σωληνοειδούς σχήματος της ουράς του βακτηριοφάγου (tail-tube protein) (São-José et al., 2007). Στην περίπτωση των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων η εξωτερική τους μεμβράνη έχει μεγαλύτερη ρευστότητα (Jakutytė et al., 2011) και έρχεται σε επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον μέσω πορινών, όπου αποτελούν την πρώτη δίοδο θρεπτικών στον περιπλασμικό χώρο, πρωτού αναγνωριστούν από τους μεταφορείς της κυτταρικής μεμβράνης και εισαχθούν στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 1.6) (Jakutytė et al., 2011). Τέτοιες πορίνες μπορούν να αποτελέσουν υποδοχείς για πρόσδεση ιοσωμάτων (Rakhuba et al., 2010). Ένα άμεσο και γνωστό παράδειγμα αποτελεί ο βακτηριοφάγος λ, ο οποίος μπορεί και αναγνωρίζει στην επιφάνεια του *Ε. coli* μία πορίνη πρωτεΐνη μεταφοράς μαλτόζης (*LamB*) την οποία και χρησιμοποιεί σαν δίοδο για εισαγωγή του γονιδιώματος στον περιπλασμικό χώρο του κυττάρου-ξενιστή, όπου απουσία αυτού από το κύτταρο παρουσιάζεται μειωμένη μόλυνση (Chatterjee και Rothenberg, 2012).





Άλλα παραδείγματα υποδοχέων μπορούν να αποτελούν οι πορίνες βιταμινών *BtuB* (Kim and Ryu, 2011) ή οι πρωτεΐνες ρύθμισης όσμωσης OmpF και OmpC (Ho and Slauch, 2001) ή ακόμη και τα μαστίγια των βακτήριων (Shin et al., 2012), ο ABC μεταφορέας TolC (Ricci and Piddock, 2010), αλλά και πολυσακχαρίτες (Shin et al., 2012). Στη συνέχεια στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια οι βακτηριοφάγοι έχουν να συναντήσουν το λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης που βρίσκεται μεταξύ της εξωτερικής μεμβράνης και του εσωτερικού βακτηριακού τοιχώματος. Φαίνεται πώς οι περισσότεροι την υδρολύουν με λυσοζυμές που βρίσκονται στην ουρά τους (Oliveira et al., 2014).



Εικόνα 1.7: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας μόλυνσης στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Διακρίνεται η εξωτερική μεμβράνη (OM), όπου εδράζονται πορίνες, το λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης (PG) που υδρολύεται από την λυσοζύμη (κόκκινη) του βακτηριοφάγου και οι μεταφορείς θρεπτικών (κίτρινο χρώμα) στην βακτηριακή μεμβράνη.

Έχει δειχτεί ότι οι βακτηριοφάγοι με ουρά μπορούν να ασκήσουν αρκετή δύναμη (Grayson and Molineux, 2007), ώστε να ενώσουν την εξωτερική μεμβράνη με την εσωτερική (fuse) και το DNA να φτάσει έξω από την τελευταία (Tarahovsky et al., 1991, 1995). Απουσιάζει όμως η βιβλιογραφία που να εξηγεί πώς γίνεται η εισαγωγή του γενετικού υλικού στο κυτταρόπλασμα μέσα από την εσωτερική μεμβράνη. Πιθανά υπάρχουν μόρια που κατευθύνουν το γενετικό υλικό κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης (Perez et al., 2009) ή κάποιοι ιοί όπως ο T5 που κάνουν εισαγωγή του γονιδιώματος σε δύο στάδια (Boulander και Letellier, 2012) με το 8% του γονιδιώματος να μεταγράφει πεπτίδια μεταφοράς του υπόλοιπου 92%. Ένα μέσο επικοινωνίας μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του περιπλασμικού χώρου, όπως είναι οι ABC, PTS και LysE-like μεταφορείς είναι απαραίτητο (Bonhivers et al., 1996). Ο βακτηριοφάγος λ χρησιμοποιεί τον PTS μεταφορέα μαννόζης για εισαγωγή του γονιδιώματος στο κυτταροπλασμα (Chatterjee και Rothenberg, 2012).

1.2.3 Μοριακοί μηχανισμοί πολλαπλασιασμού των βακτηριοφάγων

Η μοριακή βιολογία κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού των βακτηριοφάγων, είναι ένα πολυσύνθετο και πολυεπίπεδο κομμάτι που εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η φυλογένεια ενός ιού, η φυλογένεια του ξενιστή, ο ρυθμός ανάπτυξης του ξενιστή και το μωσαϊκό των μοριακών μηχανισμών που έχει η γενετική δεξαμενή ενός ιού (Chevallereau et al., 2016). Όπως αναφέρθηκε ήδη οι βακτηριοφάγοι κατηγοροιοποιούνται σε ήπιους και λυτικούς ανάλογα με το εάν ενσωματώνουν το γονιδίωμά τους σε αυτό του ξενιστή ή όχι. Σχετικά με τους ήπιους φαγους τα μονοπάτια απόφασης λυτικότητας ή λυσιγονίας έχουν χαρακτηριστεί με βάση των βακτηριοφάγο λ (Oppenheim et al., 2005) που μολύνει το αρνητικό κατά Gram βακτήριο E. coli. Από την αρχή της εισαγωγής του γονιδιώματος του λ στο κυτταρόπλασμα, ο βακτηριοφάγος αποφασίζει αν θα μπει στη λυτική οδό πολλαπλασιασμού ή στη λυσιγονική, ανάλογα με τα περιβαλοντικά σήματα που επικρατούν, αλλά και τον αριθμό των φάγων που μολύνουν το κύτταρο (Oppenheim et al., 2005). Ο κύριος παράγοντας που καθορίζει τη λυσιγονική δράση του βακτηριοφάγου είναι η πρωτεΐνη N (N-antitermination protein). Εάν τα επίπεδα αφομοιώσιμου άνθρακα στο κυτταρόπλασμα είναι αρκετά, τότε ο ρυθμός ανάπτυξης και επομένως τα επίπεδα RNAse III του ξενιστή είναι ικανοποιητικά και είναι ικανή να μεταγράψει το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη Ν και να ξεκινήσει ο λυτικός κύκλος. Όμως σε περίπτωση ανεπάρκειας επιπέδων πηγών άνθρακα η Rnase III δεν είναι σε ικανοποιητικά επίπεδα και η πρωτεΐνη Ν του βακτηριοφάγου παραμένει σε χαμηλή γονιδιακή έκφραση με αποτέλεσμα ο φάγος να επιλέγει τη λυσιγονική οδό (Wilson et al., 2002). Υπάρχει δηλαδή στενή σχέση μεταξύ του ρυθμού ανάπτυξης και διαθεσιμότητας θρεπτικών μέσων, με την αποφάση για λύση ή λυσιγονία (Oppenheim et al., 2005). Η πρωτεΐνη N στη συνέχεια τροποποιεί την RNA πολυμεράση του ξενιστή ώστε να μην επηρεάζεται από σήματα παύσης της μεταγραφής και έτσι να μεταγράφει γονίδια των πρώτων σταδίων πολλαπλασιασμού της λυτικής οδού (early genes) (Parks et al., 2014). Κατά τη διάρκεια του λυτικού τους κύκλου οι λυσιγονικοί βακτηριοφάγοι, όπως ο λ, σχηματίζουν ένα κυκλικό μόριο DNA και αντιγράφουν τη μία αλυσίδα αυτού και στη συνέχεια σχηματίζεται η συμπληρωματική πρωτού πακεταριστεί στο νέο καψίδιο (Tomizawa and Ogawa, 1968).

Οι λυτικοί βακτηριοφάγοι ξεκινάνε απευθείας τη μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στα πρώτα στάδια του πολλαπλασιασμού τους (Luke et al., 2002). Έχουν γίνει πολλές έρευνες γύρω από γονίδια που συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό των λυτικών βακτηριοφάγων, που έχουν προάγει τον βιολογικό ρόλο και τα βιοχημικά χαρακτηριστικά ενζύμων άγνωστων για τους ερευνητές (Pietilä et al., 2014). Οι περισσότεροι λυτικοί βακτηριοφάγοι αντιγράφουν το γονιδίωμά τους με κυκλικό τρόπο αντιγραφής (replication rolling cycle) σχηματίζοντας επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (concatemeres) οι οποίες διαχωρίζονται σε επιμέρους γονιδιώματα μετά την στη συνέχεια (Gilbert et al., 1968). Όμως η DNA πολυμεράση έχοντας 3'-5' προσανατολισμό χρειάζεται μονόκλωνα RNA κομμάτια (Okazaki fragments) για να ξεκινήσει την αντιγραφή της 5'-3' αλυσίδας. Για να υβριδίσουν αυτά οι αλληλουχίες απαιτείται το ξετύλιγμα της αλυσίδας DNA (replication fork) (Kreuzer and Brister, 2011). Ταυτόχρονα πολλές φορές απαραίτητη προϋπόθεση για μεγάλα φαγικά γονιδιώματα είναι και ο γενετικός ανασυνδυασμός (Masiq, 1998). Στην περίπτωση του T4 έχει φανεί ότι χρησιμοποιείται ένας συνεχόμενος ανασυνδυασμός (recombination-dependent replication) για την γρήγορη αντιγραφή του γονιδιώματος (Εικόνα 1.8) (Kreuzer and Brister, 2011). Αυτό το γεγονός εξηγεί και τη συνεχόμενη οριζόντια μεταφορά γονιδίων στους βακτηριοφάγους T4-like (Mosiq, 1998). Υπάρχουν συγκεκριμένα σημεία έναρξης της αντιγραφής του DNA στους βακτηριοφάγους (origin of replication, ori) που, όπως και στον T4, είναι πολλές περισσότερες φορές από 1. Κάτι τέτοιο εξυπηρετεί την γρήγορη αντιγραφή του φαγικού DNA.



Εικόνα 1.8: Τα δύο μοντέλα ομόλογου ανασυνδυασμού (recombinant-dependent replication) που προτείνονται για τους βακτηριοφάγους T4-like. Α) Ένας συντηριτικός τρόπος ομόλογου ανασυνδυασμού με νέες αλυσίδες DNA να διπλασιάζονται ανά κομμάτι. Β) Ένας λιγότερο συντηριτικό τρόπος όπου ξεκινάει η αντιγραφή μίας νέας αλυσίδας DNA και συνεχίζει μέχρι να αντιγραφεί ολόκληρη (Kreuzer and Brister, 2011).

Κάποιες βιοχημικές και μοριακές διεργασίες περιγράφηκαν από τα πρώτα χρόνια μοριακής μελέτης του συστήματος. Για παράδειγμα η αποικοδόμιση των mRNA του ξενιστή κατά τη διάρκεια της μόλυνσης αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1989 (Carpousis et al., 1989, 1994; Ueno και Yonesaki, 2004). Αυτή η αποικοδόμιση των mRNA του ξενιστή και ο τρόπος που γίνεται αποτελεί αντικείμενο πολλών ερευνών και έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα (Ueno και Yonesaki, 2004). Έχει τεκμηριωθεί, ότι η ανάγκη τους να αντιγράψουν το γονιδίωμά τους σε πολλά αντίγραφα συνεπάγεται και μεγάλη ανάγκη δεοξυριβονουκλεοτιδίων, ενώ ταυτόχρονα ο μεγάλος αριθμό ενζύμων που συμμετέχουν σημαίνει και απαιτήσεις σε ενέργεια κύριως σε μορφή ATP (Uzan, 2009). Φαίνεται πώς οι βακτηριοφάγοι αποικοδομούν τα mRNA του ξενιστη, αλλά και δικά τους όπου δεν είναι απαραίτητα, για να εξυπηρετήσουν αυτές τις ανάγκες. Ερευνητικές εργασίες που προσέγγιζαν ολιστικά το τί συμβαίνει μέσα στο κύτταρο κατά τη διάρκεια της μόλυνσης και του πολλαπλασιασμού των ιών, άρχιζαν να εμφανίζονται μόλις τα τελευταία χρόνια (De smet et al., 2017). Αυτό συνέβη κυρίως λόγω του ότι απουσίαζε η τεχνολογία για την ολιστική ανάλυση δεδομένων συμπεριλαμβανομένων των βιοπληροφοριακών εργαλείων (Martínez et al., 2014) εξαιρουμένης της μεταγραφομικής μελέτης του T4 (Luke et al., 2002) που έγινε με γνώμονα την ταυτοποίηση προαγωγέων. Ακόμη ύπαρξη μεγάλου ποσοστού ανοιχτών αναγνωστικών πλαισίων (Open Reading Frames, ORFs) με άγνωστη λειτουργία σε όλα τα φαγικά γονιδιώματα, αφήνει μέχρι και σήμερα μεγάλα ερωτήματα για το τί συμβαίνει μέσα στο κύτταρο κατά τη διάρκεια της μόλυνσης (De Smet et al., 2017).

Οι βακτηριοφάγοι λειτουργώντας ως «μωσαϊκό» βιοχημικών διεργασιών, έχουν σίγουρα την ανάγκη να χειραγωγήσουν μοριακές διεργασίες του κυττάρου για να ικανοποιήσουν τον δικό τους οπορτουνιστικό σκοπό (Mmolawa, et al., 2003). Βακτηριοφάγοι της ίδιας οικογένειας δεν συνεπάγεται de facto και όμοια μεταβολική μηχανική (De Smet et al., 2015). Στην πρώτη ανάλυση μεταβολομικής εντός του κυττάρου κατά τη διάρκεια της μόλυνσης (De Smet et al., 2015) μελετήθηκε η αλληλεπιδράση βακτηριοφάγου που μολύνει το ανθρώπινο παθογόνο Pseudomonas aeruginosa με διαφορετικούς βακτηριοφάγους και αποσαφηνίστηκαν σημαντικά βιοχημικά φαινόμενα κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού των ιών. Πρώτον, φαίνεται ότι υπάρχει μεγάλη ποσότητα ελεύθερων τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (ATP, TTP, GTP, CTP, UTP), τα οποία παράγονται και καταναλώνονται όσο περνάει η ώρα και πλησιάζει στο τέλος του ο λυτικός κύκλος. Δεύτερον, περιγράφεται ο πολύ καλά ενορχηστρωμένος συντονισμός μεταξύ διεργασιών που αφορούν την μεταγραφή και την παραγωγή RNA και στη συνέχεια η μετακύληση του μεταβολισμού προς την αντιγραφή του DNA πλησιάζοντας στο τέλος του λυτικού κύκλου (Εικόνα 1.9). Τέλος, εξετάζεται για πρώτη φορά και η σχέση του συνενζύμου Α για την παραγωγή ενέργειας κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού, αλλά και η ενέργεια που
πρέπει να εξοικονομηθεί από φυσιολογικές διεργασίες του κυττάρου για τον πολλαπλασιαμό των ιών (Liu et al., 2004, Yanu και Rothman-Denes, 2011). Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί και ο ήπιος φάγος του E. coli με όνομα Rac, που μπορεί και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη της τουμπουλίνης του ξενιστή και τον εμποδίζει να ξεκινήσει τη διαδικασία του κυτταρικού διπλασιασμού (Conter et al., 1996). Το πόσο εξαρτημένος είναι ένας βακτηριοφαγός από τους μηχανισμούς του βακτηρίου εξαρτάται και από τα γονίδια που φέρει και τις ανάγκες που έχει ανάλογα με το μέγεθος του γονιδιώματός του (Lavigne et al., 2009). Η συνδυαστική ομική μελέτη μεταγραφημάτων του ξενιστή, του βακτηριοφάγου, αλλά και των δευτερογενών μεταβολιτών, κατά τη διάρκεια της μόλυνσης (Chevallereau et al., 2016) απέδειξε ότι οι βακτηριοφάγοι φέρουν μικρά και πολλά RNA (anti-sense RNAs) τα οποία έχουν τη δυνατότητα να υβριδίσουν στα mRNA του ξενιστή, να γίνουν δίκλωνα, και να μπλοκάρουν τη μετάφρασή τους. Αν και είχαν περιγραφεί για πρώτη φορά το 2014 σε λυτικούς φάγους, δεν ήταν γνωστό το κατά πόσο διαδεδομένος είναι ο συγκεκριμένος μηχανισμός σε άλλα είδη βακτηριοφάγων (Wagemans et al., 2014). Η αποσύνθεση αυτών από ένζυμα (RNA degradosome) του ξενιστή ή του βακτηριοφάγου στη συνέχεια αναλαμβάνουν την αποικοδόμισή τους με στόχο την παραγωγή ελεύθερων νουκλεοτιδίων, που πλέον είναι ικανά να ενσωματωθούν σε επίπεδο μεταγραφής ή αντιγραφής του DNA του βακτηριοφάγου ανάλογα με τις ανάγκες του (Callaghan et al., 2004, Chevallereau et al., 2016). Μένει να φανεί αν πρόκειται για έναν καθολικό μηχανισμό από τους βακτηριοφάγους, πιθανά και εξελικτικά συντηρημένο, ή αν πρόκειται για έναν μηχανισμό συγκεκριμένου αριθμού ή οικογένειας βακτηριοφάγων (De Smet et al., 2017). Καθώς οι ιοί εξαρτώνται από τον μεταβολισμό του ξενιστή τους, έχουν αποκτήσει και έναν αριθμό γονιδίων που ονομάζονται βοηθητικά μεταβολικά γονιδία (auxiliary metabolic genes, (AMGs)). Auτά τα γονίδια βοηθούν ώστε να ενισχυθούν ή να συντομευθούν μεταβολικές διεργασίες του μεταβολισμού του ξενιστή, προς όφελος της αντιγραφής του ιού (Breitbart et al., 2007). Έχει φανεί ότι σχετίζονται με τον μεταβολισμό φωσφορικών ιόντων (Martiny et al., 2009), τη φωτοσύνθεση στην περίπτωση των κυανοβακτηρίων (Lindell et al., 2005, Frank et al., 2013), τη βιοσύνθεση NAD⁺ (Miller et al., 2003a), τον μεταβολισμό του αζώτου (Sullivan et al., 2010), τη βιοσύνθεση φωσφοπεντόζης (Thompson et al., 2014), τη βιοσύνθεση νουκλεοτιδίων (Miller et al., 2003b), αλλά και άλλων βιοχημικών μονοπατιών (Sharon et al., 2011). Ο επαναπρογραμματισμός του μεταβολισμού των βακτηρίων που έχουν αλληλεπιδράσει με ιούς που φέρουν τέτοια γονίδια έχει συνδεθεί με διακυμάνσεις στον παγκόσμιο κύκλο των θρεπτικών (Brussaard et al., 2008).

Τέλος έχει φανεί ότι οι βακτηριοφάγοι είναι ικανοί να ρυθμίζουν μεταγραφικά και βιοχημικά μονοπάτια του ξενιστή. Ο βακτηριοφάγος PAK_P3, έχει τη δυνατότητα να ρυθμίσει τη μεταγραφή γονιδίων του ξενιστή που απαρτίζουν ένα οπερόνιο του μεταβολισμού του RNA προς όφελός του (Chevallereau et al., 2016). Τέτοια παραδείγματα αποδεικνύουν τους πολύπλοκους και πολυεπίπεδους μεταβολικούς μηχανισμούς που διαθέτουν αυτές οι παρασιτικές μορφές και το πόσο αποκλίνουν από το απλό μοντέλο θήραμα-θηρευτής.



Εικόνα 1.9: Συνοπτικά σημαντικές μοριακές διεργασίες που συμβαίνουν κατά τον πολλαπλασιασμό του βακτηριοφάγου PAK_P3 στο βακτήριο *P. aeruginosa*. Φαίνεται η γονιδιακή ρύθμιση από τον φάγο στον ξενιστή του, η σημασία των asRNA, η αποσύνθεση των mRNA του ξενιστή και η χρησιμοποίησή τους από

ένζυμα του βακτηριοφάγου (AMG, auxiliary metabolic genes) σαν πηγή για μεταγραφή και αντιγραφή του DNA του, πριν την συναρμολόγηση των ιών (Chevallereau et al., 2016).

1.2.4 Μηχανισμοί λύσης βακτηριοφάγων

Η κύρια καψιδιακή πρωτεΐνη (Major capsid protein, MCP) μεταγράφεται στο τέλος του λυτικού κύκλου (Luke et al., 2002), όπου και πακετάρονται τα νέα γονιδιώματα. Μετά το πακετάρισμα των ιοσωματιδίων ξεκινάει η διαδικασία λύσης του βακτηριακού κυττάρου από μέσα προς τα έξω ώστε να ολοκληρωθεί ο λυτικός κύκλος (Young, 1992). Η πεπτιδογλυκάνη αποτελεί κύριο δομικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος και για τα Gram αρνητικά, αλλά και για τα Gram θετικά βακτήρια (Nelson et al., 2012). Η αποδιάταξη αυτού του στρώματος μπορεί να οδηγήσει στην βακτηριακή λύση του κυττάρου ως αποτέλεσμα διαφοράς της ωσμοτικής πίεσης (Seltman and Holst, 2001). Οι βακτηριοφάγοι κωδικοποιούν συγκεκριμένα ένζυμα με δράση μουρεΐνης υδρολάσης (ενδολυσίνες ή απλά λυσίνες) που έχουν αυτή τη δυνατότητα και τα γονίδια που τις κωδικοποιούν κάποιες φορές διαφέρουν από τις λυσοζύμες που φέρουν οι βακτηριοφάγοι στην άκρη του καψιδίου τους και χρησιμοποιούν για την υδρόληση του στρώματος πεπτιδογλυκάνης κατά τη μόλυνση (Nelson et al., 2012). Κωδικοποιούνται μαζί με χολίνες, ώστε να μπορέσουν να φτάσουν στο στρώμα της πεπτιδογλυκάνης πέρα από τη βακτηριακή μεμβράνη (Young, 1992). Η υδρόλυση της βακτηριακής πεπτιδογλυκάνης συνδέεται με τέσσερις τύπους λυσινών με δράση γλυκοσιδάσης, ενδοπεπτιδάσης, αμιδοϋδρολάσης και λυτικής τρανσγλυκοσυλάσης. Οι τρεις τελευταίοι απαντώνται μόνο σε βακτηριοφάγους με τις τρανσγλυκοσυλάσες να είναι οι πιο διαδεδομένες (Nelson et al., 2012).

1.3 Συγκριτική γονιδιωματική ανάλυση

1.3.1 Γενικά

Υπάρχουν 7478 πλήρη γονιδιώματα ιών στην παγκόσμια τράπεζα γονιδιωμάτων (Φεβρουάριος, 2018). Τα τελευταία 3 χρόνια ο αριθμός τους έχει διπλασιαστεί (ήταν

περίπου 4.000 το 2015) (Brister et al., 2015) δείχνοντας την πρόοδο στις τεχνολογίες αλληλούχισης, αλλά και την ανάγκη για τη συνεχή έρευνα γύρω από τους ιούς. Οι ιοί μπορούν να φέρουν ως γονιδιωματικό υλικό μονόκλωνο και δίκλωνο RNA, μονόκλωνο και δίκλωνο DNA. Το γονιδιωματικό υλικό μπορεί να είναι ευθύγραμμο ή και κυκλικό. Όλοι οι ιοί κάνουν χρήση ενζύμων του ξενιστή σχετικών με την αντιγραφή, μεταγραφή και μετάφραση του γονιδιωματικού τους υλικού. Πολλοί ιοί φέρουν από μόνοι τους δικές τους DNA πολυμεράσες, DNA ελικάσες, RNA πολυμεράσες, ενώ ιοί με μονόκλωνο RNA, όπως οι ρετροϊοί, φέρουν ένζυμα με δράση αντίστροφης μεταγραφάσης. Έτσι συνθέτουν δίκλωνο συμπληρωματικό DNA (cDNA) που στη συνέχεια ενσωματώνεται στο χρωμοσωμικό DNA του ξενιστή και μεταγράφουν τα γονίδιά τους με τους φυσικούς μηχανισμούς αντιγραφής του ξενιστή. Από τους μεγαλύτερους ιούς σε μέγεθος και γονιδίωμα είναι οι dsDNA ιοί Mimivirus και Megavirus με γονιδιώματα κοντά στις 1.2 mbps και πάνω από 1200 ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια με ξενιστές αμοιβάδες και άγνωστα είδη αντίστοιχα (Arslan et al., 2011, Raoult et al., 2004).

Σχετικά με τους βακτηριοφάγους τα μεγέθη των γονιδιωμάτων τους έχουν μεγάλη ποικιλομορφία. Πιο συγκεκριμένα μπορούν να αποτελούνται από λίγες μόνο χιλιάδες βάσεις, όπως η περίπτωση της οικογένειας *Leviviridae* με μονόκλωνα RNA γονιδιώματα μεγέθους 3.300 bp (Friedman et al., 2009), έως 500 kbp δίκλωνου DNA, όπως στην περίπτωση του βακτηριοφάγου G που μολύνει το είδος *Bacillus megaterium* (Hatfull and Hendrix, 2014). Υπάρχουν βακτηριοφάγοι που φέρουν στο καψίδιό τους και δύο διαφορετικά κυκλικά τμήματα γονιδιωματικού υλικού ξεφεύγοντας από το μοτίβο του ενός τμήματος (Campillo-Balderas et al., 2014). Οι πιο πολυπληθείς οικογένειες βακτηριοφάγων είναι η *Siphoviridae* που αντιπροσωπεύει το 55 % της κλάσης *Caudovirales*, ακολουθεί η οικογένεια *Myoviridae* που αντιπροσωπεύει το 25 % και η *Podoviridae* το 20 % της ίδιας κλάσης. Γενικά μόνο η κλάση *Caudovirales* αντιστοιχεί στο 40 % των αλληλουχημένων ιών και πάνω από το 90% όλων των βακτηριοφαγικών γονιδιωμάτων (Ackerman, 2006, στοιχεία Genbank Φεβρουάριος, 2018). Οι Τ-βακτηριοφάγοι έχουν σαν ξενιστή το βακτήριο Escerichia coli και απομονώθηκαν και ονομάστηκαν όλοι (T1 έως T7) από τρεις ερευνητές (Milislav Demerac, Ugo Fano και J.Bronfenbrenner) μέχρι το 1932 με το Τ να αντιπροσωπεύει την αγγλική λέξη Type (τύπος). Μέχρι και σήμερα αποτελούν «μοντέλα» για τη μελέτη μοριακών μηχανισμών των βακτηριοφάγων με μια ονομασία που ως σήμερα διαιωνίζεται και ανάλογα με τα χαρακτηριστικά νέων φάγων που απομονώνονται και κατατάσσονται ως π.χ. T2-like, T4-like κλπ. Αποτελούν την ομάδα των πιο μελετημένων ιών με όλους να ανήκουν στην οικογένεια Myoviridae (Prescott et al., 2006). Παρόλα αυτά σήμερα έχει κατανοηθεί ότι πρόκειται για μια τυχαία ομάδα και δεν μπορούν να αντιπροσωπεύσουν όλους τους ιούς που απομονώνονται. Με τους μοριακούς τρόπους φυλογενετικής που έχουν αναπτυχθεί σήμερα φαίνεται ότι αποτελούν ένα μικρό κλάσμα από το μεγάλο φυλογενετικό δέντρο των βακτηριοφάγων (Miller et al., 2003a). Ένας άλλος βακτηριοφάγος που έχει μελετηθεί αρκετά και θεωρείται «μοντέλο» έρευνας για τους ήπιους φάγους είναι ο βακτηριοφάγος λ. Η διαλεύκανση της μοριακής βιολογίας του έχει προωθήσει την έρευνα γύρω από τους ήπιους βακτηριφαγούς και έχει συνεισφέρει και στην βασική έρευνα σαν εργαλείο μελέτης άλλων οργανισμών.

1.3.2 Ο βακτηριοφάγος λ (lambda phage)

Ο βακτηριοφάγος λ ανήκει στην οικογένεια *Siphoviridae* και φέρει ευθύγραμμο γονιδίωμα μεγέθους 48.502 bp από τα οποία οι 48.490 bp είναι δίκλωνο DNA και 12 βάσεις στο 5' άκρο και στο 3' άκρο είναι μονόκλωνο (Rajagopala et al., 2011). Αυτά τα δύο τμήματα είναι συμπληρωματικά μεταξύ τους και σχηματίζουν τα *cos* σημεία, τα σημεία δηλαδή που ενώνονται και κάνουν το γονιδίωμα κυκλικό εντός του κυττάρου αν ο βακτηριοφάγος αποφασίσει λυτικό κύκλο αντιγραφής (Rajagopala et al., 2011). Το γονιδίωμά του κωδικοποιεί για 73 ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια από τα οποία τα δομικά του γονίδια εδράζονται σε γειτονικές γονιδιωματικές περιοχές σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα γονιδίων (cluster) (Εικόνα 1.10). Αν και τα γονίδιά του έχουν μελετηθεί εκτενώς παραμένει άγνωστη η λειτουργία τους σε πολλά από αυτά με πολλές μελέτες να κατευθύνονται σε τεχνικές αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών για να κατανοήσουν τον ρόλο τους. Κατά τη διαδικασία της μόλυνσης του κυττάρου αναγνωρίζει τον υποδοχέα LamB στην επιφάνεια του κυττάρου που κωδικοποιεί για μια πορίνη μαλτόζης και μολύνει το κύτταρο μέσω ενός PTS μεταφορέα μαννόζης της βακτηριακής εσωτερικής μεμβράνης (Erni et al., 1987, Werts et al., 2014).



Εικόνα 1.10: Τα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια του γονιδιώματος του λ βακτηριοφάγου. Ξεχωρίζουν τα διαφορετικά συμπλέγματα γονιδίων με μεγαλύτερο αυτό των δομικών (Head, Tail Tail tip, Tail fibers) (Rajagopala, et al., 2011).

1.3.3 Ο βακτηριοφάγος Τ4

Ένας από τους βακτηριοφάγους μοντέλα που έχουν μελετηθεί περισσότερο είναι ο βακτηριοφάγος Τ4. Πρόκειται για τον μεγαλύτερο σε μέγεθος και γονιδίωμα ιό της ομάδας των Τ. Από τα πρώτα χρόνια που απομονώθηκε γρήγορα παρατηρήθηκε το μεγάλο εύρος ξενιστών που έχει στα διάφορα στελέχη *Escherichia coli*, αλλά και στο γένος *Shigella* και προτού αλληλουχηθεί πλήρως το γονιδίωμά του είχαν γίνει διάφορα επιτυχημένα πειράματα μετάλλαξης στοχευμένα ή μη (Petrov et al., 2016). Η δομή και το σχήμα του έχουν κρυσταλλογραφηθεί πολλές φορές με αποτέλεσμα να γνωρίζουμε με ακρίβεια τη δομή του στον χώρο και επομένως να μπορούμε να προσδιορίσουμε δομές αντίστοιχων ιών συγκριτικά (Taylor et al., 2016). Ανήκει στην μεγάλη οικογένεια *Myoviridae* η οποία ανήκει στην τάξη *Caudovirales*. Κατέχει δίκλωνο DNA ως γενετικό υλικό, έχει εικοσάεδρο σχήμα κεφαλής, μια συσπασώμενη ουρά και ίνες στο κάτω μέρος της ουράς. Αναφορικά με το γονιδίωμά του αποτελείται από 168.903 ζεύγη βάσεων με τουλάχιστον 300 ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, που όμως πάνω από το 55% έχουν άγνωστη λειτουργία. Ταυτόχρονα κωδικοποιεί και 8 tRNA, ένα χαρακτηριστικό των μεγάλων φαγικών γονιδιωμάτων που πιθανό στόχο έχει την πιο αποδοτική μετάφραση (Kunisawa, 1992). Ακόμη αντικαθιστά την τριφωσφορική δεοξυκυτιδίνη (dCTP) με την υδρόξυ μεθυλιωμένη μορφή της και στη συνέχεια την γλυκοζυλιώνει, με σκοπό να προστατέψει το DNA του από περιοριστικές ενδονουκλεάσες του βακτηρίου (Garry et al., 1998).



Εικόνα 1.11: Ο λειτουργικός γονιδιωματικός χάρτης του βακτηριοφάγου Τ4 όπως παρουσιάστηκε από Miller et al., 2003b όπου παρατίθεται πίνακας με τον ρόλο του κάθε *in silico* προβλεπόμενου ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου (Miller et al., 2003b).

Ο συγκεκριμένος μηχανισμός γίνεται από ένα ένζυμο/χίμαιρα (gp 56) που έχει διπλό ρόλο. Έχει δράση υδρολάσης και αποτρέπει την είσοδο της δεοξυκυτιδίνης στο φαγικό γονιδίωμα αν δεν υποστεί την τροποποίηση που προαναφέρθηκε, αλλά μπορεί και υδρολύει και την τριφωσφορική δεόξυ ουρακίλη, ώστε να αποφευχθεί η ενσωμάτωση ουρακίλης αντί θυμίνης στο φαγικό γονιδίωμα κατά την διαδικασία της αντιγραφής εντός του κυττάρου (Garry et al., 1998). Το 2003 ερευνητές μελέτησαν το μεταγράφημά του βακτηριοφάγου Τ4 κατά της διάρκεια μόλυνσης.



Εικόνα 1.12: Η σχετική έκφραση των μεταγραφημάτων του βακτηριοφάγου T4 κατά τη διάρκεια της μόλυνσής του (που διαρκεί 20 λεπτά) με τα γονίδια που μεταγράφονται να χωρίζονται σε αρχικά επαγόμενα (early), καθυστερημένα επαγόμενα (delayed early), μεσαία επαγόμενα (middle) και τελευταία επαγόμενα (late) (Luke, et al., 2002).

Αυτό επέτρεψε στους επιστήμονες να κατατάξουν τα γονίδια των βακτηριοφάγων ανάλογα με το σημείο της μόλυνσης που χρειάζονται και επάγονται από τον βακτηριοφάγο. Έχοντας πολυσιστρονικό σύστημα έκφρασης οι βακτηριοφάγοι, φαίνεται ότι περιορισμένος αριθμός υποκινητών ευθύνονται για την επαγωγή των πολλών γονιδίων τους (Εικόνα 1.12, Luke et al., 2002). Όταν αλληλουχήθηκε το γονιδίωμα του βακτηριοφάγου Τ4, ανάμεσα στα γονίδια που αναγνωρίστηκαν, ήταν και αλληλουχίες που ανήκαν σε μεταθετές ενδονουκλεάσες (τρανζποσόνια ή αυτοκατευθυνόμενες ενδονουκλεάσες (AE), homing endonucleases). Υπάρχουν πολλές κατηγορίες μεταθετών στοιχείων που απαντώνται στη φύση σε όλους τους οργανισμούς (Stoddard, 2014). Αν και δε γνωρίζουμε πλήρως το πώς και γιατί βρίσκονται στα γονιδιώματα των ιών, παρόλα αυτά μπορούν να δώσουν αρκετά στοιχεία σχετικά με την φυλογένεια των βακτηριοφάγων. Οι ΑΕ είναι ένζυμα που έχουν βρεθεί σε όλες τις μικροβιακές μορφές ζωής, αλλά ακόμα και σε μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες των ευκαρυωτών (Stoddard, 2014). Οι ΑΕ είναι γνωστές ως μεταθετά στοιχεία που προτιμούν να αντιγράφονται σε συγκεκριμένα σημεία ενός γονιδιώματος, τα οποία μπορούν να ανήκουν σε εξόνια ή όχι, με έναν μοριακό μηχανισμό που ονομάζεται αυτοκατεύθυνση (homing). Τη στιγμή που θα κωδικοποιηθεί το ένζυμο της ενδονουκλεάσης, θα αναγνωρίσει τον αλληλόμορφο γονότυπο που δεν έχει το ένζυμο (και κυμαίνεται από 14-22 βάσεις το μέγεθος αναγνώρισης) και θα υδρολύσει το σημείο εκείνο του DNA. Στη συνέχεια, ο μοριακός μηχανισμός επιδιόρθωσης του κυττάρου θα «επιδιορθώσει» το υδρολυμένο σημείο, έχοντας όμως σαν «καλούπι» την αλληλουχία της αυτοκατευθυνόμενης ενδονουκλεάσης (Burt και Koufopanou, 2004). Το μεταθετό στοιχείο κατά τις διαδικασίες αντιγραφής του DNA και του γενετικού ανασυνδυασμού (Kreuzer and Brister, 2011) μπορεί να βρίσκει συνεχώς ευκαιρίες να διαιωνίζεται επιταχύνοντας έτσι εξελικτικά φαινόμενα με μεγαλύτερο ρυθμό από ότι προβλέπει η μεντελική εξέλιξη (Sandegren, et al., 2005).



Εικόνα 1.13: Ο «απλός» μοριακός μηχανισμός της αυτοκατεύθυνσης (homing) όπως περιγράφεται από τους Burt και Koufopanou, 2004.

Οι βακτηριοφάγοι αποτελούν ένα πολύ καλό «όχημα» πολλαπλασισμού αυτών των «εγωιστικών» στοιχείων DNA (Yahara et al., 2009). Επειδή μπορούν να φέρουν γειτονικά γονίδια αποτελούν το βασικό παράγοντα μεταφοράς γονιδίων μεταξύ φάγων και ξενιστών (Zeng et al., 2009). Χωρίζονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τα μοτίβα αμινοξέων που εμπεριέχουν, όμως στους βακτηριοφάγους συναντόνται συνήθως 2 από αυτές, η *Seg-like* και η *mob-like*. Με τον αυξανόμενο ρυθμό αλληλούχισης βακτηριοφαγικών γονιδιωμάτων, φαίνεται ότι οι 15 που έχει ο βακτηριοφάγος Τ4 είναι ένα μοναδικό χαρακτηριστικό (Edgell et al., 2010), αφού στους περισσότερους δεν ξεπερνούν τις 3.

1.3.4 Ο βακτηριοφάγος KVP40

Ένας άλλος ιός που παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον και έχει αναδειχθεί τα τελευταία χρόνια σαν μοντέλο μελέτης είναι ο βακτηριοφάγος KVP40. Έχει τη δυνατότητα να μολύνει ένα μεγάλο εύρος ξενιστών αλλά κυρίως του γένους Vibrio και αποτελεί τον πρώτο καλά μελετημένο Vibrio φάγο. Ανήκει και αυτός στην πολυπληθή οικογένεια Myoviridae και απομονώθηκε μόλις το 1992 στην Ιαπωνία, όπου και φάνηκε το ευρύ φάσμα ξενιστών που έχει, έχοντας μάλιστα τη δυνατότητα να λύσει και βακτήρια του γένους Photobacterium (Matsuzaki et al., 1992). Το γονιδίωμά του αλληλουχήθηκε την ίδια χρονιά με του T4 (Miler et al., 2003a), όπου και αποκαλύφθηκαν και αρκετά ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου ιού. Αρχικά το μέγεθος του γονιδιώματός του ήταν κατά πολύ μεγαλύτερο από του T4 φτάνοντας τις 244.835 bp και με τουλάχιστον 386 ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια, με το περίπου 92 % του γονιδιώματος να μπορεί να μεταφράζεται. Φέρει 30 μεταφορικά RNA (tRNA) σε αντίθεση με τα 8 του Τ4. Τέλος, φέρει γονίδια που συνδέονται στενα με τη σύνθεση του Νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NAD⁺) (Miller et al., 2003b). O ίδιος ο ιός αρχικά κατατάχθηκε σαν T4-like ιός, αλλά σύντομα δημιουργήθηκε ένας καινούριος κλάδος που αρχικά ονομάστηκε KVP40-like και στη συνέχεια "schizoT4like" όπου κατατάχθηκαν και άλλοι ιοί (Lavigne et al., 2009).

rnh ^{dsbA} 33 59	32 ¶ fi	rd clpP uvs	sX ? 41	l, n	rdD î	nrdG	T5Pase	<u><u><u> </u></u></u>
001 002 003 004 dut <i>dexA</i>	005 006	s' 007' 008 td	009 010	<i>ddA.2</i> Sir	2/naprt	013 014 015 39	016 017 018 Pi esteras	se <i>30.2</i>
021 022 023 024025 026 0	27 028 029 030 03	032033 034 035		9 040 041 042	043 044	045 04	047 048 049 050 051	
30 9	î.	TN	sprT nrdH 2	4 55		αgt.4	30.3 47	46
				3 064 06	5 06			073 074
45.2 45 P	44 62 re	gA°	43	rnlA (6.	3)	pseT	tk.4	no ert P
075 076 077	078 079	080 081	082	083 084	085 086 087	080 080 090	091 092 093 09409509	¢ 097 098
, <u> </u>			nrdA.1	î	cd	folE	E	DIE exsB
	103 104	105 106 107 108 109	110111112 113 114	115 116	117 118 119	120 121	122	123 124 125
31.1 31 949 s	eg rnlB	Ŷ.		rIIA	rIl	B SegD	ion trans. 🦷	nrdC.11
	132 133 13	$\rightarrow \qquad \qquad$	7 138 139 140 141 14	2 143	144		7 148 149 150	151 152 153
L5g61 dda		nat	V	Ŷ		yahA		
					\Rightarrow			
tk	157 158 159	160 161 162 P	denV	10/100 109 1/0 1/	nadB	5355 pr		103 104 105 100 107 100
189 190 191 192 193 194	195 196 197		201 202 203 204 205 20		210 211	212 213 214 215	216 217 218 219 220 221	222 223 224 225 226 227
ydfA			î		Î.		.î	
	111	N N	V-144-1-1	V V V	1-1-1-	A	V	
228 229 230 231 232 233	234 235 236	237 238 239	240 241 242 243 244	245 246 247 248	249 250 25	252 253	254 255 256	257 258 259
228 229 230 231 232 233 astB moaA	234 235 236 30.2	237 238 239 nadV	240 241 242 243 244	245 246 247 248	249 250 25 moaA	252 253	254 255 256 nrdA	257 258 259 nrdBnrdC
228 229 230 231 232 233 astB moaA	234 235 236 30.2	237 238 239 nadV	240 241 242 243 244	245 246 247 248	249 250 25 moaA	252 253	254 255 256 nrdA	257 258 259 <i>nrdBnrdC</i>
226 229 230 231 232 233 astB moaA 260 261 261 261	$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	237 238 239 nadV 264 265 moaA	240 241 242 243 244	245 246 247 248	249 250 25 moaA 272	252 253	254 255 256 nrdA 276 277 37	257 258 259 <i>nrdBnrdC</i>
226 229 230 231 232 233 	$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	237 238 239 nadV 264 265 moaA ?	240 241 242 243 244 286 267 268	245 246 247 248 269 270 271 269 270 271 phoH ph	249 250 25 moaA 272 noN	252 253 273 274 275 asiA	254 255 256 nrdA 276 277 37	257 258 259 nrdBnrdC 278 278 278 278 278 278 278 278
226 229 230 231 232 233 astB moaA 260 261 <i>vs.1 nrdC.1</i> 279 279-2 280 281 37b	224 235 236 30.2 262 263 0 52 282 2 282 2 282 2 282 2 283 282 2 283 283 283 283 284 295 285 285 285 285 285 285 285 28	237 238 239 nadV 264 265 moaA 83 284 285 286	240 241 242 243 244	245 246 247 248 269 270 271 phoH ph	249 250 25 moaA 272 noN 293 294	252 253 273 274 275 asiA 295 296 297	254 255 256 nrdA 276 277 37 298 277 tRNAs	257 258 259 <i>nrdBnrdC</i> 278 278 278 278 278 278 278 278
226 220 230 231 232 233 astB moaA 260 261 ws.1 nrdC.10 279 279-2 280 281 37b	224 235 236 30.2 262 283 0 52 282 2 282 2 282 2 282 2 282 2 283 0 52	237 238 239 nadV 264 265 moaA 263 284 285 286	240 241 242 243 244	245 246 247 248 269 270 271 phoH ph 291 292	249 250 257 moaA 2772 noN 293 294	252 253 273 274 275 asiA 295 296 297	254 255 256 <i>nrdA</i> 276 277 37 298 298 298	257 258 259 <i>nrdBnrdC</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i> <i>278</i>
226 229 230 231 232 233 astB moaA 260 261 vs.1 nrdC.1 279 279-2 280 281 37b 298-2	224 235 236 30.2 262 263 0 52 282 2 282 2 299 770 700 700 700 700 700 700 7	237 238 239 nadV 264 265 moaA 83 284 285 286 300 301	240 241 242 243 244 286 267 268 267 268 290 267 268 290 arn.3 302 303 304 305 300	245 246 247 248 269 270 271 phoH ph 291 292 5 307 308303310 31	249 250 257 moaA 272 noN 293 294	252 253 273 274 275 asiA 295 296 297	254 255 256 nrdA 276 277 37 298 277 314	257 258 259 <i>nrdBnrdC</i> 278 278 278 315 316 317
226 229 230 231 232 233 astB moaA 260 261 VS.1 nrdC.1 279 279-2 280 281 37b 298-2 37b	234 235 236 30.2 9 262 263 0 52 282 2 282 2 282 2 29 57B	237 238 239 nadV 264 265 moaA 83 264 265 266 300 301 1 3	240 241 242 243 244 266 267 268 267 268 290 arn.3 302 303 304 305 300 P1sit	245 246 247 248 269 270 271 phoH ph 291 292 5 307 308303310 31 26 19b	249 250 25 moaA 272 293 294 312 2 4	252 253 273 274 275 asiA 295 296 297 313 48 53	254 255 256 nrdA 276 277 37 298 277 tRNAs 314	257 258 259 <i>nrdBnrdC</i> 278 278 278 278 278 278 278 278
226 229 230 231 232 233 astB moaA 260 261 vs.1 nrdC.1 279 279-2 280 281 37b 296-2 318 319 3	224 235 236 30.2 262 283 0 52 282 2 299 57B 299 57B	237 238 239 nadV 264 265 moaA 83 284 285 286 300 301 1 3 24 325	240 241 242 243 244 266 267 268 267 288 289 290 arn.3 302 303 304 305 300 P1sit 326 327	245 246 247 248 269 270 271 phoH pt 291 292 5 307 308309310 31 26 19b 328 329	249 250 25' moaA 272 noN 293 294 312 2 4 330 331	252 253 273 274 275 asiA 295 296 297 313 48 53 332 333	254 255 256 nrdA 276 277 37 298 277 37 298 298 314 314 334 33	257 258 259 <i>nrdBnrdC</i> 278 278 278 278 315 316 317 5 5.1 315 336 337 338
226 229 230 231 232 233 astB moaA 260 261 vs.1 nrdC.1 279 279-2 280 281 37b 298-2 318 319 3 25 1	224 235 236 30.2 262 263 0 52 282 2 299 57B 20321 322 323 32 6	237 238 239 nadV 264 265 moaA 83 284 285 286 300 301 1 3 24 325	240 241 242 243 244 286 267 268 267 268 290 arn.3 302 303 304 305 300 P1sit 326 327 7	245 246 247 248 269 270 271 phoH ph 291 292 5 307 30830310 31 26 19b 328 329 8	249 250 25' moaA 272 noN 293 294 312 2 4 330 331 9	252 253 273 274 275 asiA 295 296 297 313 48 53 332 333 10	254 255 256 nrdA 276 277 37 276 277 37 298 277 314 298 314 298 314 298 314 314 314 314 314 314 314 314	257 258 259 nrdBnrdC 278 315 316 317 5 5.1 35 336 337 338 12b
226 229 230 231 232 233 astB moaA 260 261 vs.1 nrdC.1 279 279-2 280 281 37b 299-2 318 319 3 25 339 340	224 235 236 30.2 262 263 0 52 282 2 299 57B 57B 20 321 322 323 32 6 341	237 238 239 nadV 264 265 moaA 83 284 265 286 300 301 1 3 24 325	240 241 242 243 244 286 267 268 287 288 289 290 arn.3 302 303 304 305 30 P1sit 326 327 7 42	245 246 247 248 269 270 271 phoH ph 291 292 5 307 30830310 31 26 19b 328 329 8 343	249 250 25' moaA 272 noN 293 294 312 2 4 330 331 9	252 253 273 274 275 asiA 295 296 297 313 48 53 332 333 10 345	254 255 256 nrdA 276 277 37 298 277 298 277 298 277 298 277 298 277 298 298 298 298 298 298 298 298	257 258 259 nrdBnrdC 278 9 278 277 278 277 278 277 278 277 278 277 278 277 278 277 278 277 278 277 278 277 278 277 278 277 278 277 278 277 278 278
226 229 230 231 232 233 astB moaA 260 261 Pvs.1 nrdC.1 279 279-2 280 281 37b 299-2 37b 299-2 318 319 3 25 9 339 340 Wac	224 235 236 30.2 262 283 0 52 282 2 299 57B 299 57B 299 57B 299 57B 341 13 14	237 238 239 nadV 264 265 moaA 83 284 285 286 300 301 1 3 24 325 325 325 325 325 325 325 325 325 325	240 241 242 243 244 266 267 268 267 288 289 290 arn.3 203 304 305 300 P1sit 326 327 7 42 16	245 246 247 248 269 270 271 phoH ph 291 292 5 307 308308310 31 26 19b 328 329 8 343 17	249 250 25' moaA 272 noN 233 294 312 2 4 330 331 9 344 18	252 253 273 274 275 asiA 295 296 297 313 48 53 332 333 10 345 19	254 255 256 nrdA 276 277 37 298 277 298 277 37 298 298 277 298 298 298 217 298 298 217 298 298 217 298 298 217 298 298 217 298 298 217 298 217 217 298 217	257 258 259 nrdBnrdC 278 278 278 278 278 315 316 317 5 5.1 336 337 338 12b 348 21 22
226 229 230 231 232 233 astB moaA 260 261 vs.1 nrdC.1 vs.1 nrdC.1 279 279-2 280 281 37b 298-2 318 319 3 298-2 318 319 3 25 339 340 Wac 349	224 235 236 30.2 262 263 0 52 282 2 299 57B 57B 57B 57B 13 14 350 351	237 238 239 nadV 264 265 moaA 83 284 285 286 300 301 1 3 24 325 352	240 241 242 243 244 286 267 268 267 288 289 290 arn.3 302 303 304 305 300 P1sit 326 327 7 42 16 353 354	245 246 247 248 269 270 271 phoH ph 291 292 5 307 30830310 31 26 19b 328 329 8 17 355	249 250 25' moaA 272 noN 293 294 312 2 4 330 331 9 344 18 356	252 253 252 253 273 274 275 asiA 295 296 297 313 48 53 332 333 10 345 19 357	254 255 256 nrdA 276 277 37 277 37 298 277 37 298 298 277 298 277 37 298 298 298 277 298 298 298 207 298 298 298 298 298 298 298 298	257 258 259 nrdBnrdC 278 315 316 317 5 5.1 35 336 337 338 12b 348 21 22 361 362
226 229 230 231 232 233 astB moaA 260 261 vs.1 nrdC.1 279 279-2 280 281 37b 290-2 37b 290-2 318 319 3 25 339 340 <i>wac</i> 349 23 Cca	224 235 236 30.2 262 263 0 52 282 2 299 57B 57B 57B 341 13 14 350 351	237 238 239 nadV 264 265 moaA 300 301 1 3 324 325 352 inh	240 241 242 243 244 286 267 268 287 288 289 290 arn.3 202 303 304 305 300 P1sit 326 327 7 42 16 353 354	245 246 247 248 269 270 271 phoH ph 291 292 5 307 30830310 31 26 19b 328 329 8 343 17 355	249 250 25 moaA 277 noN 293 294 312 2 4 330 331 9 344 18 356	252 253 252 253 273 274 275 asiA 295 296 297 295 296 297 295 296 297 313 48 53 332 333 10 345 19 357 UVS	254 255 256 nrdA 276 277 37 276 277 37 298 277 298 277 298 277 298 277 298 277 298 298 298 298 298 298 298 298	257 258 259 nrdBnrdC 278 315 316 317 5 5.1 9 35 336 337 338 12b 348 21 22 361 362 Y 35
226 229 230 231 232 233 astB moaA 260 261 Pvs.1 nrdC.1 279 279-2 280 281 37b 298-2 318 319 3 298-2 339 340 Wac 349 23 cca	224 235 236 30.2 262 263 0 52 282 2 299 57B 20321 322 323 32 6 341 13 14 350 351	237 238 239 nadV 264 265 moaA 83 264 265 300 301 1 3 24 325 300 301 1 3 24 325 300 301 1 3 24 325 300 301 1 3 24 325	240 241 242 243 244 240 241 242 243 244 266 267 268 267 288 289 290 <i>arn.3</i> 267 288 289 290 <i>arn.3</i> 267 288 289 290 <i>arn.3</i> 267 268 289 270 267 268 267 268 267 268 267 268 267 268 267 268 267 268 267 268 267 268 267 268 270 267 268 270 270 270 270 270 270 270 270	245 246 247 248 269 270 271 phoH pt 291 292 5 307 308309310 311 26 19b 328 329 8 343 17 355 271 272 292 292 292 292 292 292 292	249 250 25' moaA 272 noN 293 294 312 2 4 330 331 9 344 18 356	252 253 273 274 275 asiA 225 296 297 225 296 297 225 296 297 225 296 297 2313 48 53 332 333 10 345 19 357 UVS	254 255 256 nrdA 276 277 37 298 277 298 277 37 298 298 277 298 277 37 298 298 298 298 298 298 298 298	257 258 259 1000000000000000000000000000000000000
226 229 230 231 232 233 astB moaA 260 261 <i>vs.1 nrdC.1</i> 279 279-2 280 281 37b 298-2 318 319 3 25 339 340 <i>wac</i> 349 23 cca 363 364	224 235 236 30.2 262 263 0 52 282 2 299 57B 20321 322 323 32 6 341 13 14 350 351 365 366 34	237 238 239 nadV 264 265 moaA 300 301 1 3 24 325 352 inh 367 368	240 241 242 243 244 286 287 288 287 288 289 290 arn.3 302 303 304 305 300 P1sit 326 327 7 42 16 353 354 16 369 370	245 246 247 248 245 246 247 248 269 270 271 phoH pt 291 292 5 307 30830310 31 26 19b 328 329 8 343 17 355 371 372 3	249 250 25' moaA 272 noN 293 294 312 2 4 330 331 9 344 18 356	252 253 273 274 275 asiA 295 296 297 295 296 297 297 296 297 297 295 296 297 297 295 296 297	254 255 256 nrdA 276 277 37 298 276 277 37 298 298 298 298 298 298 298 298	257 258 259 nrdBnrdC 278 315 316 317 5 5.1 35 336 337 338 12b 348 21 22 361 362 Y 35 383
$\begin{array}{c} 226 \ 226 \ 226 \ 226 \ 226 \ 226 \ 226 \ 226 \ 226 \ 226 \ 2279 \ 279 $	224 235 236 30.2 262 263 0 52 282 263 0 52 299 57B 341 13 14 350 351 365 366 34	237 238 239 nadV 264 265 moaA 300 301 1 3 4 325 352 inh 367 368	240 241 242 243 244 286 267 268 287 288 289 290 arn.3 302 303 304 305 301 P1sit 3226 327 7 42 16 353 354 9 369 370	245 246 247 248 245 246 247 248 269 270 271 phoH ph 291 292 5 307 30830310 31 26 19b 328 329 8 343 17 355 371 372 3	249 250 251 moaA 272 noN 293 294 312 2 4 330 331 9 344 18 356 773 374 375	252 253 252 253 273 274 275 asiA 295 296 297 295 296 297 295 296 297 313 48 53 332 333 10 345 19 357 UVS 376 377 376	254 255 256 nrdA 276 277 37 296 277 37 296 277 296 277 37 296 277 37 296 277 37 296 296 296 296 296 296 296 296	257 258 259 nrdBnrdC 278 315 316 317 5 5.1 336 337 338 12b 348 21 22 361 362 Y 35 362 361 362 362 363 362 363 362 363 363

Εικόνα 1.14: Ο γονιδιωματικός χάρτης του βακτηριοφάγου ΚVP40. Με πορτοκαλί χρώμα βέλη εμφανίζονται γονίδια σχετικά με τον μεταβολισμό του DNA, κίτρικο χρώμα για αντιγραφή του DNA, κόκκινο για διαδικασία μεταγραφής, καφέ για διαδικασία μετάφρασης, ανοιχτό μπλε, σκούρο μπλε και πράσινο για δομικά γονίδια, τιρκουάζ για βιοσύνθεση NAD⁺, γκρι, άσπρα και διαφανή για υποθετικές πρωτεΐνες (Miller et al., 2003a).



Εικόνα 1.15: Ο βακτηριοφάγος ΚVP40, όπως πρωτοαπεικονήθηκε το 1992. Διακρίνεται το μεγάλο μέγεθος κεφαλής που έχει για εγκλεισμό του μεγάλου του γονιδιώματος, αλλά και η συσταλτή ουρά. (Matsuzaki et al., 1992).

1.3.5 Ο βακτηριοφάγος φKZ

Ο βακτηριοφάγος φΚΖ απομονώθηκε και μελετήθηκε από Ρώσους ερευνητές το 1978 (Krylov et al., 1978a; Krylov et al., 1978b) και αλληλουχήθηκε το γονιδίωμά του το 2002 (Mesyanzhinov et al., 2002) αποκαλύπτοντας έναν από τους μεγαλύτερους σε γονιδίωμα φάγους ως και σήμερα μεγέθους 280.334 bp και με τουλάχιστον 306 ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια.



Εικόνα 1.16: Το γονιδίωμα του βακτηριοφάγου φΚΖ σε κυκλική μορφή όπως σχηματίζεται εντός του κυτταροπλάσματος την ώρα της μόλυνσης. (Mesyanzhinov et al., 2002).

Έχει ως κύριο ξενιστή το παθογόνο ψευδομονάδα ή αλλιώς το είδος *Pseudomonas aeruginosa*. Ο ιός ανήκει και αυτός στην οικογένεια *Myoviridae* και έχει μεγάλο εύρος ξενιστών απέναντι σε είδη του γένους *Pseudomonas* (De Smet et al., 2015, De smet et al., 2017). Στο γονιδίωμά του φέρει ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια που κωδικοποιούν για 4 υπομονάδες RNA πολυμερασών (2 β και 2 β' υπομονάδες), όπου μία RNA πολυμεράση φαίνεται να περιέχεται ήδη στο καψίδιο του βακτηριοφάγου και να την χρησιμοποιεί στα πρώτα στάδια της μόλυνσής του προτού μεταγραφεί η δεύτερη (Ceyssens et al., 2014). Ένα άλλο χαρακτηριστικό του γονιδιώματός του είναι

ότι κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη με δράση τσαπερόνης, δηλαδή ένζυμο που βοηθάει την αναδίπλωση των πρωτεϊνών του. Ενδιαφέρον έχει και η δράση του γονιδίου *TubZ* που κωδικοποιεί για μια βακτηριοφαγική τουμπουλίνη, δομικό όλων των ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών κυττάρων και παίζει σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγή των βακτηριοφάγων (Aylett et al., 2013). Φαίνεται ότι ο βακτηριοφάγος φΚΖ διαμερισματοποιεί τις λειτουργίες του σε οργανίδιο που προστατεύει το γονιδίωμα από τις άμυνες του ξενιστή την ώρα της μόλυνσης και με τη βοήθεια της τουμπουλίνης που κωδικοποιεί καταφέρνει τον πολλαπλασιασμό του και το πακετάρισμα στα νεά καψίδια ταυτόχρονα (Εικόνα 1.16) (Chaikeeratisak et al., 2017). Αυτά τα χαρακτηριστικά μάζι έχουνε ξεχωρίσει τους βακτηριοφάγους που μοιάζουν με τον φΚΖ και έχει δημιουργηθεί ξεχωριστός κλάδος, κοντινός των "schizoT4like", o "phiKZlikevirus".



Εικόνα 1.17: Σχηματική απεικόνιση του πολλαπλασιαμού του βακτηριοφάγου φΚΖ με τη διαμερισματοποίηση των λειτουργιών του και την κωδικοποίηση τουμπουλινών που εδράζονται στην βακτηριακή μεμβράνη. Το DNA αντιγράφεται και πακετάρεται στα νεά καψίδια πριν τη συναρμολόγηση και την ελευθέρωση των νέων ιοσωματιδίων (Chaikeeratisak et al., 2017).



Εικόνα 1.18: Ο βακτηριοφάγος phiKZ (φKZ). Διακρίνεται το μεγάλο μέγεθος κεφαλής που έχει για να καλύπτει το μεγάλο του γονιδίωμα, αλλά και η συσταλτή ουρά (Mesyanzhinov et al., 2003).

1.3.6 Συγκριτική γονιδιωματική ανάλυση μικρών (dwarf) *Myoviridae* βακτηριοφάγων

Γενικά οι βακτηριοφάγοι της οικογένειας *Myoviridae* έχουν μεγάλο μέγεθος γονιδιώματος σε σχέση με τις υπόλοιπες οικογένειες ιών. Τα μεγαλύτερα γονιδιώματα βακτηριοφάγων έχουν βρεθεί σε αυτήν την οικογένεια. Παρόλα αυτά υπάρχει ένα κλάσμα αυτής της οικογένειας με βακτηριοφάγους με μέγεθος γονιδιώματος λίγο λιγότερο από 50.000 bp ανεξάρτητα με το αν είναι ήπιοι ή λυτικοί και ανεξάρτητα με το γένος του ξενιστή τους, αν και όλοι μολύνουν αυστηρά Gram αρνητικά βακτήρια (Comeau, et al., 2012). Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχει αποκαλύψει ότι έχουν πάρα πολύ κοντινά μορφολογικά χαρακτηριστικά σε σχέση με το σχήμα και το μέγεθος της κεφαλής και της ουράς, ανεξάρτητα με τον ξενιστή τους (Comeau, et al., 2012). Όμως η αλληλούχιση των γονιδιωμάτων και η συγκριτική γονιδιωματική αποκαλύπτει ετερογένεια στα γονίδια που σχετίζονται με την λυτική τους δραστηριότητα και τον διπλασιασμό του DNA αλλά και άλλα γενετικά χαρακτηριστικά σχετικά με τον τρόπο αναπαραγωγής εντός του κυττάρου (lifestyle)



Εικόνα 1.19: Σχηματική απεικόνιση συγκριτικής γονιδιωματικής μελέτης βακτηριοφάγων της οικογένειας Myoviridae με μέγεθος γονιδιώματος μεταξύ 42 kbp-50 kbp. Διακρίνονται τα συντηρημένα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια που σχετίζονται με δομή και μορφγένηση των ιοσωματιδίων (tructure/ Morphogenesis Module) και τα μη συντηρημένα που σχετίζονται με τη λυτική δραστηριότητα και την αντιγραφή του DNA (Lysogeny/ Replication Module) (Comeau, et al., 2012).

(Comeau, et al., 2012, Turner et al., 2018). Οι αλληλουχίες των δομικών τους γονιδίων παραμένουν σχετικά συντηρημένες (Εικόνα 1.19). Τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να αποκαλύπτουν ότι οι αναρίθμητοι βακτηριοφάγοι της βιόσφαιρας μπορούν να χωριστούν σε υποκλάδους ανάλογα με τα μοριακά τους εργαλεία και όχι μόνο από τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά (Miller et al., 2003a). Φαίνεται ότι υπάρχει μια διακριτή φυλογένεια πολύ συγκεκριμένη η οποία έχει έναν «πυρήνα» δομικών γονιδίων συντηρημένα και διαφέρει στους μοριακούς μηχανισμούς των ιών (Lavigne et al., 2009). Αιώνες Δαρβινικής επιλογής φαίνεται ότι έχει αποδώσει έναν περιορισμένο αριθμό επιτυχών ιικών δομικών μοντέλων που έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται γρήγορα και εύκολα σε οικολογικές προκλήσεις (Comeau, et al., 2012). Αυτό φαίνεται ότι έχει οδηγήσει και σε ένα εξελικτικό σενάριο, όπου τα δομικά στοιχεία των ιοσωματιδίων είναι σταθερά, ενώ πολλά ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια με ενζυματική δράση ή με διάφορες λειτουργίες, προσαρμόζονται στις συνεχώς εναλλασόμενες ανάγκες (Comeau, et al., 2012).

1.3.7 Η οικογένεια Siphoviridae

Η συγκεκριμένη οικογένεια βακτηριοφάγων ανήκει στην κλάση *Caudovirales* και είναι αρκετά κοντινή με την οικογένεια *Myoviridae*. Οι 2 πιο μεγάλες διαφορές των δύο οικογενειών, που αποτελεί και έναν εύκολο τρόπο διαχωρισμού τους, είναι η υποχρεωτικά μεγάλη ουρά τους (με ή χωρίς πόδια), η οποία ταυτόχρονα δεν μπορεί να είναι συσπαστή (Spinelli et al., 2014). Ίσως οι πιο μελετημένοι ιοί της οικογένειας είναι ο ήπιος βακτηριοφάγος λ και ο λυτικός T1, με ξενιστή το *E. coli*. Ένα μεγάλο ποσοστό των ιών αυτής της οικογένειας είναι ήπιοι που συνήθως φαίνεται μετά την αλληλούχιση του γονιδιώματός τους. Συνήθως έχουνε εικοσαεδρή κεφαλή και γονιδίωμα που κυμαίνεται από 40.000 έως 121.000 bps, όπως στην περίπτωση του βακτηριοφάγου T5 (Hyman και Abedon, 2015).



Enterobacteria phage T1

Εικόνα 1.20: Σχηματική απεικόνιση του βακτηριοφάγου Τ1. Χαρακτηριστικό παράδειγμα βακτηριοφάγου της οικογένειας *Siphoviridae*.

1.3.8 Το μέγεθος και το είδος του γονιδιώματος συσχετίζεται με το μέγεθος της κεφαλής, αλλά όχι με τον όγκο του ιοσωματιδίου

Οι ιοί φαίνεται ότι κατέχουν διάφορα μεγέθη και είδη γονιδιωμάτων (Campillo-Balderas et al., 2014). Μέχρι και σήμερα έχουν γίνει διάφορες υποθέσεις σχετικά με τον κύριο παράγοντα που καθορίζει το μέγεθος ενός ιικού γονιδιώματος, αλλά και τα άμεσα χαρακτηριστικά που καθορίζει εκείνο (Campillo-Balderas et al., 2014). Έχει πλέον φανεί ότι το μεγάλο μέγεθος γονιδιώματος δεν προϋποθέτει ούτε πιο αποδοτική λύση, ούτε μεγαλύτερο όγκο του ιοσωματιδίου (αλλομετρική σχέση) (Cui et al., 2014). Είναι λογικό οι ιοί για μια πιο αποδοτική μόλυνση να προσπαθούν να εκμεταλλευτούν το γονιδιακό τους φορτίο όσο το δυνατόν περισσότερο μεταγράφοντας το γονίδιωμα και από τις δύο κατευθύνσεις και με ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια που αλληλοεπικαλύπτονται (Cui et al., 2014). Ο περιορισμός του γονιδιώματος συμβαδίζει με την αρχή της ενεργειακής οικονομίας. Είναι δύσκολο να βρεθούν ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια «άχρηστα» για μία επιτυχή και αποδοτική μόλυνση, αντιγραφή και λύση του κυττάρου ξενιστή. Ακόμη ένας συντηρημένος πυρήνας γονιδίων φαίνεται ότι είναι απαραίτητος σε πολλές οικογένειες (Comeau, et al., 2012). Η μόνη συσχέτιση που έχει τεκμηριωθεί είναι αυτή του μεγέθους και της στερεοδιαμόρφωσης του γονιδιώματος των ιών με το μέγεθος και την μορφή το καψιδίου (Petrov et al., 2007). Κάτι τέτοιο συμβαίνει, καθώς αποφεύγονται φαινόμενα υβριδισμού και δημιουργίας συσσωματωμάτων των αλυσίδων του γονιδιωματικού υλικού που βρίσκονται πολύ κοντά (Petrov et al., 2007). Για αυτόν τον λόγο πλεόν είμαστε σε θέση να προβλέψουμε το μέγεθος και το σχήμα ιοσωματιδίων από δεδομένα μεταγονιδιωματικής (π.χ. περιβαλλοντικά δείγματα) χωρίς να έχει γίνει απομόνωση του ίδιου του ιού (Cui et al., 2014).

1.4 Ανθεκτικότητα των βακτηρίων στους βακτηριοφάγους

1.4.1 Γενικά

Είναι λογικό ότι μέσα από τα εκατομμύρια χρόνια συνεξέλιξης που έχουν τα βακτήρια με της παρασιτικής φύσης ιούς, να έχουν αναπτύξει μοριακούς και βιοχημικούς τρόπους ανθεκτικότητας. Αν και αρχικά είχε προταθεί ότι μπορεί να υπάρχει ένας αγώνας δρόμου ανάμεσα στα βακτήρια και τους βακτηριοφάγους για ανάπτυξη γονιδίων ανθεκτικότητας, αλλά και γονιδίων των ιών που να ξεπερνούν αυτές τις γραμμές άμυνας, σύντομα κατανοήθηκε ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ τους είναι πολύ πιο πολύπλοκη και υπάρχει ανάγκη για ανάπτυξη ολόκληρων μηχανισμών ή διαμόρφωση ήδη υπαρχόντων κατάλληλα για αντιμετωπίσουν μια εισερχόμενη μόλυνση (Lenski και Levin, 1985). Ίσως το πιο γνωστό παράδειγμα άμυνας των βακτηρίων απέναντι στους βακτηριοφάγους είναι οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες, ένζυμα δηλαδή που ανανγωρίζουν ιικές γονιδιωματικές αλληλουχίες και υδρολύουν φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και δεσμούς υδρογόνου των δεοξυριβονουκλεοτιδίων (Labrie et al., 2010). Πολύ ενδιαφέρον παρουσιάζει και και το σύστημα abi (Abortive Infection), όπου βακτήρια λύνονται πρόωρα ώστε να εμποδίσουν την εξάπλωση ενός βακτηριοφάγου περαιτέρω στον πληθυσμό (Smith and Pizer, 1968). Η πολυπλοκότητα της αλληλεπίδρασης φάγου-ξενιστή φαίνεται να έχει και συνέπειες σε χαρακτηριστικά ομογενών (Abedon, 2008) και ετερογενών (Friman και Buckling, 2013) βακτηριακών πληθυσμών, αλλά και οικολογικές συνέπειες, όπως έχει δειχθεί με εκτενείς έρευνες στο μοντέλο κυανοβακτηρίων-κυανοφάγων (Lennon et al., 2007).

1.4.2 Μοριακοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας των βακτηρίων: Το σύστημα CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)

Το συγκεκριμένο σύστημα δείχνει το πως η φαγική βιολογία οδήγησε στην ανακάλυψη ενός ακόμα μοριακού μηχανισμού, αυτή τη φορά από την πλευρά των βακτηρίων, ως μοριακό εργαλείο (Mojica et al., 2005, Montague et al., 2014). Η συγκεκριμένη ανακάλυψη μπορεί να έχει χρήση για γονιδιακή θεραπεία στο μέλλον (Jinek et al., 2012). Το ίδιο το σύστημα αποτελείται από μια ομάδα γονιδίων που μεταφράζεται όταν υπάρχει ενδοκυτταρική αναγνώριση ξένου γονιδιωματικού υλικού (π.χ. βακτηριοφαγικό γονιδίωμα ή κάποιο πλασμίδιο) στο βακτήριο. Το πρώτο βήμα είναι να υπάρξει ένθεση μικρών αλληλουχιών του ξένου γονιδιώματος στον ξενιστή. Έτσι, τα συμπληρωματικά μονόκλωνα τμήματα που θα προκύψουν θα είναι συμπληρωματικά και σε μια από τις αλυσίδες του ξένου γονιδιώματος. Στη συνέχεια, γίνεται ενεργοποίηση του οπερονίου που αποτελεί το Crispr/Cas 9 σύστημα και μικρά crRNA (crispr RNA) μεταγράφονται μαζί με μια ενδονουκλεάση που ονομάζεται κασπάση, και έχουν τη δυνατότητα να οδηγήσουν την ενδονουκλεάση σε συμπληρωματικά τους κομμάτια του ξένου γονιδιωματικού υλικού. Εκείνη υδρολύει με ακρίβεια και τις δύο αλυσίδες του DNA, αφήνοντας «τυφλά άκρα» σε εκείνο το σημείο διακόπτοντας οποιαδήποτε μοριακό μηχανισμό ήταν έτοιμος να λάβει χώρα από το ξένο γονιδίωμα (Sorek et al., 2008). Τροποποιήσεις του συστήματος αυτού έχουν γίνει από το εργαστήριο του Feng Zhang από το MIT για να είναι πιο αποδοτικό όταν χειραγωγείται για κατευθυνόμενη γονιδιακή επεξεργασία για βασική έρευνα ή γονιδιακή θεραπεία (Cong et al., 2013; Yamano et al., 2016).



Εικόνα 1.21: Συνοπτικά η χρήση και η λειτουργία του συστήματος CRISPR/CAS τύπου 2 με το σύμπλεγμα της ενδονουκλεάσης και του RNA οδηγητή (guide RNA) υβριδισμένο στο γονιδίωμα στόχο για υδρόλυση και πως θα μπορούσε το αποκομμένο DNA να επιδιορθωθεί με κάποιο επιθυμητό κομμάτι DNA (Donor DNA) για να προκύψει στοχευμένη γονιδιακή θεραπεία. Στο σχήμα επιπλέον φαίνονται και οι αλληλουχίες PAM που δεν είναι του ξενιστή, και έχουν στόχο να εμποδίσουν το σύστημα από το να κόψει μη επιθυμητές αλληλουχίες (Charpentier και Doudna, 2013).

1.4.3 Μοριακοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας των βακτηρίων: Το σύστημα BREX (BacteRiophage EXclusion)

Το σύστημα BREX (Bacteriophage Exclusion) δημοσιεύτηκε το 2015 (Goldfarb et al., 2015) και σε αντίθεση με το σύστημα CRISPR/Cas ή τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες, δεν έχει στόχο στο να υδρολύσει το ξένο γονιδίωμα, αλλά να το εμποδίσει από το να αντιγραφεί. Αποτελείται από μια ομάδα γονιδίων που συμπεριλαμβάνει μια πρωτεάση (της οικογένειας Lon), μια πρωτεΐνη που μέρος της έχει δράση αλκαλικής φωσφατάσης, μια πιθανή πρωτεΐνη που λειτουργεί ως θέση δέσμευσης RNA, ένα γονίδιο μεθυλίωσης του DNA, μια πρωτεΐνη που έχει ενεργότητα ATPασης και τέλος μια πρωτεΐνη με άγνωστο για την ώρα ρόλο. Το συγκεκριμένο σύστημα απαντάται σε περίπου 10% των βακτηρίων και το χαρακτηρίζουν μικρές διαφορές που το κατατάσσουν σε 6 διαφορετικούς τύπους, ενώ έχει τη δυνατότητα να προσφέρει ανθεκτικότητα κατά λυτικών και ήπιων φάγων. Παρόλο που δεν έχουν μελετηθεί πλήρως οι μοριακοί μηχανισμοί που το απαρτίζουν, έχει δειχθεί ότι όταν εισάγεται σε βακτήριο που δεν το έχει από μόνο του προσφέρει ανθεκτικότητα σε ενδοκυτταρικό επίπεδο.



Εικόνα 1.22: Η γονιδιακή οργάνωση που απαρτίζει το σύστημα BREX στο βακτήριο *Bacillus cereus* και προσδίδει ανθεκτικότητα σε λυτικούς και ήπιους βακτηριοφάγους (Goldfarb et al., 2015).

1.4.4 Οι προφάγοι προσφέρουν ανθεκτικότητα απέναντι σε άλλους βακτηριοφάγους

Οι προφάγοι ορίζονται ως βακτηριοφαγικά γονιδιώματα που έχουν ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του ξενιστή. Μπορούν να μεταφέρουν μη επιθυμητά γονιδία σε περιβαλλοντικά στελέχη βακτηρίων, όπως γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, αν και νέες έρευνες δείχνουν ότι κάτι τέτοιο σπάνια συμβαίνει ή και ποτέ (Enault, et al., 2016). Παρουσιάζουν ενδιαφέρον, καθώς μπορούν να προσφέρουν φυλογενετικές πληροφορίες, όπως έχει φανεί στην περίπτωση του *Vibrio anguillarum* (Kalatzis et al., 2017). Με την αλληλούχιση κάθε νέου βακτηριακού γονιδιώματος, φαίνεται ότι απαντώνται σε πολύ μεγάλο ποσοστό προφαγικά γονίδια ή και ολόκληροι προφάγοι στα γονιδιώματα ρυθμίζοντας εν μέρει και την ποικιλότητα των βακτηρίων (Davies et al., 2016). Είναι καλά χαρακτηρισμένος ο μηχανισμός Sie (Super Infection exclusion), όπου ένας προφάγος προσφέρει ανθεκτικότητα σε άλλους ήπιους βακτηριοφάγους (Snyder, 1995). Ένα τέτοιο γεγονός έκανε τους ερευνητές να αναρωτηθούν και για τυχόν άλλο πιθανό ρόλο που μπορεί να έχουν. Η περίπτωση των προφάγων αποτελεί το πιο εμφατικό παράδειγμα της πολύπλοκης αλληλεπίδρασης που έχουν αναπτύξει αυτές οι παρασιτικές μορφές ζωής με τα βακτήρια ξενιστές τους (Sime-Ngando and Colombet, 2009). Πρόσφατα δημοσιεύτηκε έρευνα που μελετά την ανθεκτικότητα που μπορούν να προσφέρουν στον ξενιστή, απέναντι σε λυτικούς βακτηριοφάγους (Dedrick et al., 2017). Το γεγονός της έλλειψης μεγάλου αριθμού χαρακτηρισμένων και αλληλουχημένων γονιδιωμάτων βακτηριοφάγων, αλλά και αλληλουχημένων βακτηρίων ως σήμερα είχε συντελέσει στο να μην μπορεί να προσδιορισθεί η ανθεκτικότητα που προσφέρουν απέναντι και σε λυτικούς ιούς που δεν έχουν κοντινή φυλογένεια μαζί τους (heterotropic defence) (Dedrick et al., 2017). Αν και όλοι οι μοριακοί μηχανισμοί αυτής της ανθεκτικότητας δεν είναι χαρακτηρισμένοι, οι προφάγοι φαίνεται ότι μπορούν να είναι κομμάτι της φυσικής άμυνας των βακτηρίων.



Ένας άλλος χαρακτηρισμένος μηχανισμός που έχουν για τον έλεγχο του πληθυσμού τους είναι το σύστημα *arbitrium*. Φαίνεται ότι η ανθεκτικότητα των βακτηρίων που παρατηρούσαν οι ερευνητές απέναντι στους προφάγους δεν προερχόταν από κάποια μορφή άμυνας των βακτηρίων, αλλά από ένα πεπτίδιο που ήταν προϊόν του ίδιου του ιού από μολυσμένα κύτταρα (Erez et al., 2017). Αυτό το πεπτίδιο αναγνωρίζεται από τους προφάγους και δίνει «σήμα» στους υπόλοιπους για το «μέγεθος πληθυσμού» των ιών που επικρατεί στο συγκεκριμένο περιβάλλον. Η σημασία ενός τέτοιου σήματος υπάρχει, αφού οι προφάγοι στη συνέχεια δε θα είχαν την ανάγκη να πολλαπλασιαστούν αν γνώριζαν ότι βρίσκονται ήδη σε αρκετά ικανοποιητικό αριθμό. Το συγκεκριμένο σύστημα ονομάστηκε *arbitrium*, όπου στα λατινικά σημαίνει «απόφαση», και το γονίδιο που κωδικοποιεί για το 6μερές πεπτίδιο *aimP* και τον υποδοχέα αναγνώρισης *aimR* (Erez et al., 2017).



Εικόνα 1.24: Συνοπτικά το σύστημα arbitrium, δηλαδή η λήψη απόφασης για λύση ή λυσηγονία ενός προφάγου με βάση την ύπαρξη του πεπτιδίου arbitrium στο περιβάλλον του βακτηρίου. Στο πάνω μέρος φαίνεται πως ο προφάγος σταματάει τη λύση του βακτηρίου όταν το πεπτίδιο (με κίτρινο χρώμα) βρίσκεται σε

Εικόνα 1.23: Συνοπτικά τρόποι ανάπτυξης ανθεκτικότητας κατά βακτηριοφάγων από μοριακούς μηχανισμούς του κυττάρου ή προφάγους που αναφέρθηκαν στο κείμενο. Παραποιημένη εικόνα από Dedrick et al., 2017.

μεγάλη συγκέντρωση. Στο κάτω μέρος οι μοριακοί μηχανισμοί παραγωγής, ωρίμανσης και υποδοχής του 6μερούς πεπτιδίου από τον προφάγο (Erez et al., 2017).

1.4.5 Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς των βακτηρίων ως μηχανισμός ανθεκτικότητας έναντι των βακτηριοφάγων

Αναλύοντας τα γονιδιώματα ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών οργανισμών, προκύπτει ότι, κατά μέσο όρο, 30% του συνόλου των γονιδιακών προϊόντων μπορεί να είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες. Το μεγαλύτερο μέρος από αυτές τις πρωτεΐνες (5-15% του συνόλου των γονιδιακών πρωτεΐνών, ανάλογα με το είδος του οργανισμού) είναι πρωτεΐνες διαμεμβρανικής μεταφοράς (Markowitz et al., 2008; Ren et al., 2004). Αυτή η συχνότητα γονιδίων που κωδικοποιούν για μεμβρανικές πρωτεΐνες αντανακλά και τη μεγάλη βιολογική σημασία τους.

Συνοπτικά, οι λειτουργικοί μηχανισμοί όπου συμμετέχουν μεμβρανικές πρωτεΐνες μπορούν να καταταγούν σε δύο ομάδες: μηχανισμοί μεταγωγής σήματος (signal transduction), που ελέγχουν την επικοινωνία και τις αλληλεπιδράσεις του κυττάρου με το περιβάλλον του ή με άλλα κύτταρα για παράδειγμα μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων, μηχανισμοί μεταγωγής ενέργειας (energy transduction), που αξιοποιούν ή δημιουργούν διαβαθμίσεις πρωτονίων (ηλεκτροχημικό δυναμικό) και χημική ενέργεια (ATP) και ρυθμίζουν τις συγκεντρώσεις ιόντων, μεταβολιτών, αλλά και κυτταροτοξικών ουσιών. Μια μικρή ομάδα πρωτεϊνών ενεργού μεταφοράς που εντοπίζονται μόνο στα βακτήρια (Barabote και Saier, 2005) και ονομάζονται μεταφορείς ομάδας (TC4, group translocators), τροποποιούν τα υποστρώματα τους κατά τη διαμεμβρανική μεταφορά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το σύστημα φωσφομεταφοράσης (PTS) των σακχάρων που χρησιμοποιούν τα αρνητικά κατά Gram βακτηρία ως βασικό μηχανισμό πρόσληψης και τροποποιεί το υπόστρωμα με φωσφορυλίωση κατά τη μεταφορά, ώστε να δεσμεύεται εξωκυτταρικά π.χ. γλυκόζη, αλλά στο κυτταρόπλασμα να αποδίδεται 6-φωσφορική γλυκόζη (Siebold et al., 2001). Το μόριο φωσφόρου λαμβάνεται από το φωσφοένολοπυροσταφυλικό οξύ (Siebold et al., 2001).



Εικόνα 1.25: Συνοπτικά η σχηματική απεικόνιση του μεταφορέα γλυκόζης που φωσφορυλιώνει το υπόστρωμα κατά την μεταφορά του στο κυτταρόπλασμα. Το PEP προσφέρει ένα μόριο φωσφόρου μέσω των ενζύμων El, Hpr στο EIIA (ή IA) που το δίνει στην υπομονάδα EIIB (ή IB) και αυτό φωσφορυλιώνει κατά τη διάρκεια της μεταφοράς της γλυκόζης μέσω της διαμεμβρανικής (CM για κυτταρική μεμβράνη) υπομονάδας EIIC (ή IC) με αποτέλεσμα να προκύψει στο κυτταρόπλασμα η 6-φωσφορική γλυκόζη (Εικόνα από Πάν/μιο του Αμβούργου, Τμήμα βιολογίας).

Μία άλλη οικογένεια πολύ σημαντικών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που λειτουργούν ως κανάλια πρόσληψης και απόρριψης θρεπτικών συστατικών, είναι οι ABC διαμεμβρανικοί μεταφορείς. Οι συγκεκριμένες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες χρησιμοποιούν σαν ενέργεια ATP για να προσλάβουν θρεπτικά από το περιβάλλον. Συνήθως αποτελούνται από μια υπομονάδα διαμεμβρανική, μία υπομονάδα του κυτταροπλάσματος που δεσμεύει και υδρολύει το ATP για παροχή ενέργειας και μία υπομονάδα εξωκυτταρική που λειτουργεί σαν υποδοχέας και είναι εξειδικευμένος ώστε να αναγνωρίζει το θρεπτικό ή την ξενοβιοτική ουσία και να την οδηγεί στη διαμεμβρανική περιοχή (Davidson και Maloney, 2007) (Εικόνα 1.26).



Εικόνα 1.26: Συνοπτικά η σχηματική απεικόνιση και η λειτουργία του ABC μεταφορέα μαλτόζης στο βακτήριο Ε. Coli. Διακρίνεται η υπομονάδα δέσμευσης (Maltose Binding Protein MBP) της μαλτόζης (a), που την οδηγεί στις διαμεμβρανικές υπομονάδες (F,G) (b), όπου στη συνέχεια οδηγείται ενδοκυτταρικά από την υπομονάδα δέσμευσης του ATP (K) (c), το οποίο έχει προσφέρει ενέργεια στο σύστημα (Davidson και Maloney, 2007).

Τροποποίηση αυτών των πρωτεϊνών, είτε σε επίπεδα μεταγραφής, είτε σε επίπεδο δομής, στις μεμβράνες των βακτηρίων μπορούν να αποτελέσουν στρατηγική άμυνας απέναντι σε βακτηριοφάγους (Labrie et al., 2010).



Εικόνα 1.27: Συνοπτική απεικόνιση παραδείγματος τροποποίησης υποδοχέων της μεμβράνης των βακτηρίων για αποφυγή μόλυνσης από βακτηριοφάγους. Οι υποδοχείς μπορούν να τροποποιηθούν με άγνωστες πρωτεΐνες (protein A, masking protein) και να αποφευχθεί η επιτυχής μόλυνση. Εικόνα τροποποιημένη από Labrie et al., 2010.

1.5 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές βακτηριοφάγων σήμερα

Ο όρος βιοτεχνολογία χαρακτηρίζει τη χρήση των οργανισμών για την παραγωγή αξιοποιήσιμων προϊόντων. Η βιοτεχνολογία μικροοργανισμών αναφέρεται ίσως στο μεγαλύτερο μέρος της μοντέρνας βιοτεχνολογίας. Αν και οι βακτηριοφάγοι ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα των ιών και επομένως δεν μπορούν να χαρακτηριστούν ως αυτούσιοι μικροοργανισμοί, παρόλα αυτά οι βιοτεχνολογικές εφαρμογές που μπορούν να έχουν εντάσσονται στον ευρύτερο χώρο της μικροβιακής βιοτεχνολογίας. Από την πρώτη στιγμή της ανακάλυψής τους χρησιμοποιήθηκαν σε όλους τους τομείς των ανθρωπογενών δραστηριοτήτων για τον έλεγχο παθογόνων βακτηρίων ως «έξυπνα απολυμαντικά» (φαγοθεραπεία, phage therapy) και φαίνεται ότι δυνητικά μπορεί να αποτελέσουν μία εναλλακτική ή συμπληρωματική προσέγγιση, πέρα από την χορήγηση αντιβιοτικών (Stones, 2002). Τα συγκεκριμένα στοιχεία φαίνονται όχι μόνο από το πλήθος των επιστημονικών δημοσιεύσεων που εμφανίζονται τα τελευταία χρόνια (μόνο από το 2010-2017 έχουν τριπλασιαστεί οι δημοσιεύσεις με τον όρο "phage therapy" σε σχέση με όλα τα προηγούμενα χρόνια ~6.200), αλλά και από την χρηματοδότηση που λαμβάνουν διάφορα επιστημονικά έργα. Τέτοια έργα συμπεριλαμβάνουν και εφαρμογές έναντι ανθρώπινων παθογόνων και κλινικές δοκιμές, που αφορούν την αντιμετώπιση βακτηριακών λοιμώξεων στο δέρμα ασθενών μετά από θεραπείες για εγκαύματα (Reardon, 2014). Στον χώρο της αγροδιατροφής και πιο συγκεκριμένα στον χώρο της αγροτικής παραγωγής η φαγοθεραπεία φαίνεται να έχει και εκεί υψηλή απήχηση (Buttimer et al., 2017), ενώ υπάρχουν και διαθέσιμα προϊόντα για την αντιμετώπιση και πρόληψη βακτηριακών λοιμώξεων σε φυτά. Στην ζωική παραγωγή από την άλλη, υπάρχουν δύο διαφορετικές βιοτεχνολογικές προσεγγίσεις για την χρήση των βακτηριοφάγων. Η πρώτη αφορά την φαγοθεραπεία και την αντιμετώπιση και πρόληψη ασθενειών στη ζωική παραγωγή (για παράδειγμα μαστίτιδα) (Breyne, et al., 2017) και η δεύτερη την χειραγώγηση του μικροβιώματος στην μεγάλη κοιλία των μηρυκαστικών με στόχο ένα πιο αειφόρο προϊόν (Gilbert et al., 2017) και με λιγότερες εκπομπές διοξειδίου του άνθρακα από τα ζώα. Ακόμη στην τεχνολογία τροφίμων, οι βακτηριοφάγοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την φυσική απολύμανση τροφών (Gutierez et al., 2016), ενώ υπάρχουν και εμπορικά διαθέσιμα σκευάσματα στην αγορά κατά των ειδών Listeria sp. και Salmonella sp. Aναφορικά με τον χώρο των υδατοκαλλιεργειών, έργα έχουν λάβει και εκεί χρηματοδότηση από τα Ευρωπαϊκά ταμεία επισημαίνοντας την ανάγκη για μια αειφόρα και καινοτόμα τεχνολογία στις υδατοκαλλιέργειες στην Ευρώπη, ενώ υπάρχουν και πολυάριθμες επιστημονικές δημοσιεύσεις που ασχολούνται με το συγκεκριμένο θέμα (Plaza et al., 2017).

Οι βακτηριοφάγοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως μοριακά εργαλεία χρησιμοποιώντας κατάλληλα ένζυμα, γονίδια και υποκινητές. Ρόλο σε αυτό το γεγονός συντέλεσε η ικανότητά τους να υπερεκφράζουν γονίδια σημαντικά για τον κύκλο ζωής τους όπως το να παράγουν λυσοζύμες, ένζυμα δηλαδή ικανά να λύσουν τα βακτήρια είτε από έξω προς τα μέσα, είτε από μέσα προς τα έξω (Oliveira et al., 2012, Oliveira et al., 2014, Oliverira et al., 2016).

Οι ήπιοι φάγοι χρησιμοποιούνται ως φορείς ετερόλογης έκφρασης γονιδίων στα βακτήρια βοηθώντας στον χαρακτηρισμό γονιδίων με άγνωστη λειτουργία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα φορέα έκφρασης αποτελεί ο βακτηριοφάγος λ (Chauthaiwale, 1992) που αποτέλεσε για αρκετά χρόνια τον κυριότερο φορέα ετερόλογης έκφρασης γονιδίων σε βακτήρια. Ταυτόχρονα, μια συλλογή βακτηριοφάγου λ μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως μεταγραφομική «βιβλιοθήκη», έχοντας κλωνοποιημένα στο γονιδίωμά του όλα τα μεταγραφήματα (mRNA), ενός οργανισμού (Huse et al., 1989). Όσον αφορά στα ένζυμα ίσως το πιο σημαντικό και ευρέως διαδεδομένο είναι η λιγάση του βακτηριοφάγου Τ4 που χρησιμοποιείται από τη δεκαετία του 1970 μέχρι και σήμερα σε όλα τα εργαστήρια μοριακής βιολογίας για την λιγοποίηση άκρων κυρίως σε πλασμίδια (Sgaramella et al., 1970), ενώ και ο υποκινητής της RNA πολυμεράσης του βακτηριοφάγου Τ7 άρχισε να χρησιμοποιείται μαζί με γονίδια προς διερεύνηση, ώστε να υπερεκφράζονται ετερόλογα από έναν φορέα έκφρασης (Tabor et al., 1985). Μία άλλη σημαντική τεχνολογία χρησιμοποιώντας τα πλεονεκτήματα των βακτηριοφάγων που αναπτύχθηκε είναι το σύστημα που κυρίως ανέπτυξε ο Smith το 1985 (Smith, 1985), όπου κατάφερε να εκφράσει μια πρωτεΐνη στην ουρά του βακτηριοφάγου f1. Το σύστημα αυτό ονομάστηκε Phage Display System (έκθεση πρωτεϊνών από φάγους) και βοηθάει στην μελέτη πρωτεϊνικών, πεπτιδικών ή πρωτεϊνικών: πεπτιδικών αλληλεπιδράσεων. Η DNA πολυμεράση του βακτηριοφάγου phi29 χρησιμοποιείται και εκείνη κατά την γονιδιωματική ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων (single-cell analysis). Έχει τη δυνατότητα να ξεδιπλώνει μόνη της τη διπλή έλικα του DNA χωρίς να χρειάζεται υψηλή θερμοκρασία για αποδιάταξη των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αντιπαράλληλων βάσεων, κάνοντας την ιδανική για τεχνικές ενίσχυσης σε μικρές θερμοκρασίες. Ταυτόχρονα έχει δράση εξωνουκλεάσης με κατεύθυνση 3'-5' «επιδιορθώνοντας» λάθη κατά τη διαδικασία της αντιγραφής σε μεγάλο βαθμό (Vlcek and Paces, 1986).

Αυτά είναι κάποια παραδείγματα των βακτηριοφάγων προς όφελος της μοριακής βιολογίας, κυρίως από βακτηριοφάγους μοντέλα (Τ4, Τ5, Τ7 κ.α.). Τα παραπάνω στοιχεία κατατάσσουν τις βιοτεχνολογικές εφαρμογές των βακτηριοφάγων σε μια γρήγορα αναπτυσσόμενη τεχνολογία.

1.6 Οι υδατοκαλλιέργειες και η ασθένεια της δονακίωσης

Ο ευρύτερος πρωτογενής αγροτικός τομέας στην Ελλάδα έχει συρρικνωθεί λόγω της υπεραστικοποίησης που έχει υποστεί η χώρα από τα τέλη της δεκαετίας του 1980, παρόλα αυτά τα τελευταία χρόνια παρόλη την οικονομική κρίση δείχνει να μένει σε σταθερό ποσοστό ή και να αυξάνεται στη συνεισφορά του στο Ακαθάριστο Εθνικό Προϊόν (ΑΕΠ) (3.6-3.8%). Ένα μεγάλο ποσοστό αντιπροσωπεύεται από τις υδατοκαλλιέργειες που πρόκειται για την ταχύτερα αναπτυσσόμενη βιομηχανία ζωικής παραγωγής στον κόσμο με 3.2 % ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης και με δυνατότητα να προσφέρει πλέον πάνω από το 50% της παγκόσμιας ανάγκης διατροφής ιχθύων, ποσοστό που αναμένεται να φτάσει το 62% έως το 2030 (FAO, 2014).



Εικόνα 1.28: Ιχθυοκλωβοί στην Ελλάδα

Το γεγονός ότι η Ελλάδα κατέχει ηγετικό ρόλο στην παραγωγή ιχθύων από υδατοκαλλιέργειες στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε., Πίνακας 1.2) καταδεικνύει υψηλής τεχνολογίας και τεχνογνωσίας εκκολαπτήρια και υδατοκαλλιέργειες. Το λαβράκι και η τσιπούρα αποτελούν τα είδη που εκτρέφονται περισσότερο και καλύπτουν το 97 % της εγχώριας παραγωγής και το 48 % της παραγωγής τους στην Μεσόγειο (Barazi-Yeroulanos, 2010). Παρόλο που η παραγωγή νέων γόνων από τα εκκολαπτήρια αγγίζει τους 50 τόνους ετησίως, ο διαρκώς αυξανόμενος ανταγωνισμός σε παγκόσμιο επίπεδο και το νέο θεσμικό πλαίσιο γύρω από την εφαρμογή εμβολίων και αντιβιοτικών της Ε.Ε. υπογραμμίζουν την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα και ανάπτυξη στον τομέα αυτό.

Υδατο καλλιέργειες στην Ελλάδα 2009-2013										
	2009	2010	2011	2012	2013					
Παραγωγή (χιλ. τόνοι)	122	121	111	111	114					
Αξία (χιλ. ευρώ)	395.935,9	444.724,2	475.747,4	445.892,1	435.868,5					

Πίνακας 1.2: Παραγωγή και αξία υδατοκαλλιεργειών στην Ελλάδα 2009-2013.

Οι παραπάνω συνθήκες που διαμορφώνονται συνεπάγονται μια παγκόσμια εντατικοποίηση της παραγωγής και επομένως την υψηλή ιχθυοτρόφιση. Αν και εφαρμόζονται αυστηρά πρωτόκολλα για την αποφυγή βακτηριακών λοιμώξεων στα σύγχρονα εκκολαπτήρια ψαριών, τα ψάρια στα πρώτα αναπτυξιακά τους στάδια είναι αρκετά ευαίσθητα (Zapata et al., 2006) στις ασθένειες. Ταυτόχρονα, χορηγούνται σε αυτά ζωντανές τροφές (Conceição et al., 2010) (τροχόζωα, Artemia, μικροφύκη), που κάνει την είσοδο των μικροβίων στις νυμφικές εκτροφές να είναι αναπόφευκτη. Για αυτό οι πρώτες μέρες εκτροφής των ψαριών χαρακτηρίζονται ιδιαίτερα κρίσιμες και ανάλογα με τους τρόπους εκτροφής μπορούν να καθορίσουν την ποιότητα του τελικού προϊόντος, αφού ένα υψηλής ποιότητας τελικό προϊόν συνεπάγεται και μια υγιή μικροβιακή χλωρίδα. Η δονακίωση (Vibriosis) αποτελεί πιθανά την σημαντικότερη ασθένεια σε επίπεδο υδατοκαλλιεργείων και προκαλείται από βακτήρια κυρίως του γένους *Vibrio*. Αν και περιγράφηκε πρώτη φορά σε περιπτώσεις χελιών, σύντομα κατανοήθηκε ότι πρόκειται για μια ασθένεια αρκετά διαδεδομένη στους θαλάσσιους οργανισμούς. Οι εξάρσεις από τα βακτήρια του γένους *Vibrio sp.* θεωρούνται τόσο καταστροφικές, όπου πλέον αποτελούν τον νούμερο ένα εχθρό των ιχθυοκαλλιεργειών. Η συμπτωματολογία της ασθένειας εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως το είδος του ξενιστή, το βακτηριακό στέλεχος που ευθύνεται για την ασθένεια και την ηλικία του ψαριού (Richards, 1980). Πρόκειται για μια τυπική αιμορραγική σηψαιμία που μπορεί να εξελιχθεί ραγδαία χωρίς άλλα συμπτώματα πέραν του σκούρου χρωματισμού του δέρματος και την ανώμαλη κίνηση κοντά στην επιφάνεια του νερού, και με αποτέλεσμα τη νέκρωση του ψαριού. Στις περιπτώσεις της ήπιας έξαρσης της νόσου η κλινική εικόνα που παρουσιάζουν τα ψάρια είναι η εμφάνιση λήθαργου και μειωμένης όρεξης, το θόλωμα του κερατοειδούς, την αλλαγή χρώματος στα



Εικόνα 1.29: Ενδεικτική συμπτωματολογία δονακίωσης σε ψάρια ιχθυοκαλλιέργειας (Προσωπικό αρχείο Δρ Πάνου Βαρβαρίγγου).

βράγχια, παρουσία ερυθρών κηλίδων στην κοιλιακή χώρα, παρουσία δερματικών εξελκώσεων σκούρου χρώματος και εξοφθαλμία των ψαριών (Actis et al., 1999). Τρία είδη που απαρτίζουν τα πιο συνηθισμένα παθογόνα είναι το Vibrio anguillarum (Toranzo και Barja, 1993), το Vibrio alginolyticus (Colorni et al., 1981) και το Vibrio harveyi (Thompson et al., 2004). Κλινικά σημάδια της νόσου έχουν αναφερθεί και από τα παρακάτω βακτήρια τους γένους Vibrio: V.ordalii (Schiewe, 1983), V. salmonicida (Egidius et al., 1986), V. rotiferianus (Gomez-Gil et al., 2003). Τα τρία πιο επικίνδυνα παθογόνα του γένους Vibrio για τον άνθρωπο είναι τα Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus και το Vibrio vulnificus και έχουν σχετιστεί με επιδημίες στο παρελθόν (Austin, 2010). Ένα από τα εντονότερα χαρακτηριστικά του γένους είναι η υψηλή κινητικότητα που παρουσιάζουν (motility), η οποία εξαρτάται και από τις συνθήκες στις οποίες βρίσκονται. Ακόμη το ότι είναι δυνητικά αναερόβια τους δίνει τη δυνατότητα να ανταπεξέλθουν σε συνθήκες χαμηλού οξυγόνου (Farmer et al., 2005). Πάνω από 80 διαφορετικά είδη Vibrio έχουν απομονωθεί και περιγραφεί με τον αριθμό των ανθρώπινων παθογόνων (είτε έντονων, είτε πιο ήπιων) να είναι τουλάχιστον 12 με πιο σημαντικό την ιδιαίτερη περίπτωση του Vibrio cholerae, αλλά και τα Vibrio parahaemolyticus και Vibrio vulnificus (Oliver et al., 2013). Έχουν αναφερθεί αρκετοί τρόποι εισόδου του βακτηρίου, όπως μέσω του δέρματος (Svendsen και Bogwald 1997), των βραγχίων (Baudin-Laurencin και Germon 1987) ή της γαστρεντερικής οδού (Grisez et al. 1996). Η μολυσματικότητα των Vibrio ακόμα εξαρτάται και από την ικανότητά και τον ρυθμό δημιουργίας βιοφίλμ (biofilm). Το βιοφίλμ είναι η ανάπτυξη συσσωματωμάτων από γειτονικά κύτταρα με κύριο χαρακτηριστικό την εξωκυτταρική ύπαρξη πολυσακχαριτών που έχει ως αποτέλεσμα τη δυσκολία της καταστολής της βακτηριακής ανάπτυξης μέσω αντιβιοτικών αφού αυτά δυσκολεύονται να φτάσουν, και επομένως να δράσουν, σε μεγάλο μέρος του πληθυσμού τη βακτηριακής αποικίας. Λόγω της υψηλής κινητικότητάς τους και της υψηλής μολυσματικότητάς τους τα βακτήρια του γένους Vibrio αποτελούν μοντέλο για την μελέτη, τη συμπεριφορά και τη δημιουργία του βιοφίλμ των μικροοργανισμών. Έτσι έχουν δημοσιευτεί αρκετές μελέτες τα τελευταία χρόνια που περιγράφουν με λεπτομέρεια τα γονίδια που εμπλέκονται και επάγονται κατά τη δημιουργία βιοφίλμ. (Yildiz και Visick, 2009).
1.6.1 Το βακτήριο Vibrio alginolyticus

Το είδος Vibrio alginolyticus, αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα του γένους Vibrio (Newton et al., 2012) που ευθύνεται και για ζωονοσογόνες ασθένειες στον άνθρωπο μετά από κατανάλωση θαλασσίων ειδών, αλλά και σαν παθογόνο της θάλασσας που μπορεί να προκαλέσει μολύνσεις που καταλήγουν σε ενδοφθαλμίτιδες, κολπίτιδες ή ωτίτιδες και άλλες μολύνσεις (Li et al., 2009; El-Galil και Mohamed, 2012; Haenen et al., 2013). Πρόκειται κυρίως για παθογόνο ειδών της θάλασσας (Austin, 2010). Έχει υψηλή κινητικότητα και μικρό χρόνο διπλασιασμού (10-12 λεπτά) κάτω από βέλτιστες συνθήκες (Εικόνα 1.30). Το γονιδίωμα ενός στελέχους από την Βραζιλία πρωτοαλληλουχήθηκε το 2009 (Thompson et al., 2009) και αποκαλύφθηκε ότι έχει 4.5-5.2 Mbs. Ενδιαφέρον υπάρχει και στη χώρα μας, αφού έχει παρατηρηθεί ότι μολύνει ιχθυοκαλλιέργειες, ενώ επιστήμονες από Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών, έχουν αλληλουχίσει 2 ενδημικά στελέχη *V. alginolyticus* το 2015 (Castillo et al., 2015).



Εικόνα 1.30: Vibrio alginolyticus, όπου διακρίνονται εύκολα η ραβδόμορφη μορφολογία και ένα κολυμβητικό μαστίγιο. Φωτογραφία από Kwangmin Son, Jeffrey S Guasto και Roman Stocker, Stocker Lab, CEE, MIT

1.6.2 Η χρήση των αντιβιοτικών στις υδατοκαλλιέργειες

Η χρήση των αντιβιοτικών αποτελεί σήμερα σχεδόν μονόδρομο για την αντιμετώπιση βακτηριακών λοιμώξεων στις υδατοκαλλιέργειες σε επίπεδο καταστολής. Τα αντιβιοτικά έχουν τη δυνατότητα να αναστέλλουν την αύξηση ή να θανατώνουν τα βακτήρια και διαφέρουν από άλλες σύνθετες χημικές ενώσεις, αφού αποτελούν φυσικά παράγωγα του μεταβολισμού κυρίως μυκήτων. Αν και έχει βρεθεί μεγάλος αριθμός αντιβιοτικών σήμερα από διάφορους μύκητες, μόνο το 1 % έχει πρακτική, οικονομική σημασία, ενώ πολλά από τα ήδη καλά χαρακτηρισμένα αντιβιοτικά έχουν επεξεργαστεί χημικά με στόχο να αυξηθεί η λυτική τους δράση και αποτελούν τα ημισυνθετικά αντιβιοτικά. (Brock, 2017 13^η έκδοση). Μία από τις συνέπειες υπερχορήγησης αντιβιοτικών είναι η εξελικτική πίεση που ασκείται στα βακτηριακά στελέχη με συνέπεια την αύξηση της πιθανότητας δημιουργίας ανθεκτικότητας (Εικόνα 1.31). Η ανάπτυξή της γίνεται συνήθως με την ύπαρξη γονιδίων ανθεκτικότητας σε κάποια πλασμίδια των βακτηρίων, που σε συνδυασμό με την ικανότητα για οριζόντια μεταφορά, όχι μόνο μεταξύ των ειδών αλλά και μεταξύ διαφορετικών γενών βακτηρίων, να αποτελεί πρόβλημα (Li et al., 1999). Τον Φεβρουάριο του 2017 ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) έδωσε στη δημοσιότητα μια λίστα επικινδυνότητας παθογόνων που έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά (Γενεύη, 27 Φεβρουαρίου 2017, Νέα του WHO). Πολλά γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά έχουν πρωτοαναπτυχθεί από βακτήρια που έχουν ως φυσικό περιβάλλον την θάλασσα και ανήκουν και στο γένος Vibrio (Cabello et al., 2013). Τέτοιες περιπτώσεις περιλαμβάνουν τα βακτήρια των ειδών Aeromonas salmonicida, A. hydrophila, A. caviae, A. sobria, E. ictaluri, E. tarda, P. damselae subsp piscicida, Vibrio anguillarum, V. salmonicida, V. ordalii, Flavobacterium psychrophilum, Pseudomonas fluorescens, Streptococcus iniae, Renibacterium salmonirarum, Yersinia ruckeri και Piscirickettsia salmonis (Austin, 1985; Arthur et al., 2000; Sørum, 2000; 2006; Armstrong et al., 2005; Toranzo et al., 2005) και έχουν περιγραφεί αναλυτικά συμπεριλαμβανομένων και των γενετικών στοιχείων σε κάποιες περιπτώσεις που προσδίδουν την ανθεκτικότητα (Romero et al., 2012, Cabello et al., 2013).

Γενικά έχει αναπτυχθεί νομικό πλαίσιο που περιορίζει την χρήση των αντιβιοτικών στις ανεπτυγμένες χώρες, όπως ο Καναδάς, η Νορβηγία, οι Η.Π.Α., αλλά και η Ε.Ε. (Buridge et al., 2010). Τον Μάιο του 2016 δημοσιεύτηκε από την κεντρική κυβέρνηση του Ηνωμένου Βασιλείου μια έκθεση που αφορά την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά από τα βακτήρια.



Εικόνα 1.31: Οι διαφορετικές διαδρομές μετάδοσης ανθεκτικών στελεχών στο οικοσύστημα, μέσω της αποχέτευσης νερού (1), κοπριά ζώων (2) που χρησιμοποιείται και ως λίπασμα (3), κατανάλωση από τον άνθρωπο λαχανικών (4) και κρεάτων (5), μέσω της διανομής νερού (6), άγρια ζώα, έντομα και άλλα ζωύφια μπορεί να είναι φορείς ανθεκτικών βακτηρίων (7), ο τουρισμός, η μετανάστευση και οι εισαγωγές φαγητών (8) έχει αναφερθεί ότι είναι ο γρηγορότερος τρόπος μετάδοσης. Πηγή: BIOMERIUX-ANTIMROBIAL RESISTANCE.

Τονίζει πως πρέπει να γίνονται συλλογικές και ατομικές ενέργειες από κάθε χώρα ώστε να εποπτεύουν τη χρήση τους ακόμα και στα χαμηλότερα επίπεδα μιας φάρμας ή μιας υδατοκαλλιέργειας μικρής έκτασης. Τέλος η έκθεση εκτός από τα αντιβιοτικά μιλάει και για εναλλακτικούς τρόπους αντιμετώπισης των βακτηριακών λοιμώξεων και πώς κονδύλια και επενδύσεις θα πρέπει να ανακατευθυνθούν προς εκεί (O'Neil, 2016).



Εικόνα 1.32: Προτεινόμενοι εναλλακτικοί τρόποι αντιμετώπισης βακτηριακών ασθενειών O'neil Review on antimicrobial resistance, Μάιος 2016, μεταφρασμένο.

1.7 Στόχοι της παρούσας διδακτορικής διατριβής

Μέσα σε αυτό το πλαίσιο τέθηκαν διαφορετικοί στόχοι στην παρούσα διδακτορική διατριβή. Πρώτος στόχος ήταν η συγκριτική λειτουργική γονιδιωματική ανάλυση θαλάσσιων βακτηριοφάγων με στόχο την διερεύνηση βιοχημικών και μοριακών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα εντός των κυττάρων στόχων. Για τον σκοπό αυτό απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν μοριακά και βιολογικά 5 θαλάσσιοι βακτηριοφάγοι που εκπροσωπούν πολυπληθείς οικογένειες και κατηγορίες βακτηριοφάγων και έχουν χαρακτηριστεί στο παρελθόν για διαφορετικούς όμως ξενιστές. Για τον εντοπισμό τους χρησιμοποιήθηκε κυρίως το βακτήριο *Vibrio alginolyticus,* στέλεχος V1, το οποίο έχει απομονωθεί από μονάδα εκκολαπτηρίων του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσιών Ερευνών της Κρήτης και αποτελεί παθογόνο των ψαριών. Η λεπτομερής «χαρτογράφηση» μοριακών και βιοχημικών μηχανισμών μπορούν να διαλευκάνουν ερωτήματα που έχουν προκύψει σε σχέση με την λυτική ικανότητα αυτών των ιών, κομμάτι βασικής έρευνας, αλλά και να αποδώσουν καλύτερη φαγοθεραπεία στο μέλλον, πιθανά σε συνέργεια με την συνθετική βιολογία. Ταυτόχρονα η παρούσα διδακτορική διατριβή προωθεί το συγκεκριμένο βακτήριο ως οργανισμό μοντέλο για την μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ θαλάσσιων λυτικών βακτηριοφάγων και *Vibrio*, αφού διαθέτει κατάλληλα χαρακτηριστικά.

Ένας άλλος στόχος που αναδύθηκε κατά τη διάρκεια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, ήταν η μελέτη της ανθεκτικότητας που εμφανίζουν τα βακτήρια στους βακτηριοφάγους από μια καινοτόμο και πρωτότυπη σκοπιά. Πιο συγκεκριμένα, έγινε μελέτη του προτύπου έκφρασής των υπομονάδων διαμεβρανικών μεταφορέων που αποτελούν «κανάλια» μολυσματικότητας των βακτηριοφάγων της βακτηριακής μεμβράνης, σε ανθεκτικά και μη στελέχη. Ταυτόχρονα, έγινε αντικείμενο μελέτης και το ενδοκυτταρικό μεταβόλωμα, αλλά και το πρότυπο έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται σε κύριες μεταβολικές διεργασίες, των ανθεκτικών βακτηρίων σε βακτηριοφάγους για πρώτη φορά, αλλά η συσχέτισή του με την αλλαγή του προτύπου έκφρασης των διαμεμβρανικών μεταφορέων, που ευθύνονται και για την λήψη θρεπτικών από το περιβάλλον. Η συγκεκριμένη πληροφορία μπορεί να αποτελέσει ένδειξη για την ανάγκη δημιουργίας κοκτέιλ ιών για την σωστή και εμπεριστατωμένη φαγοθεραπεία στο μέλλον, όχι μόνο στις ιχθυοκαλλιέργειες, αλλά και σε όλες τις εφαρμογές φαγοθεραπεία

2

<u>Κεφάλαιο</u>

Υλικά και μέθοδοι



2 Υλικά και μέθοδοι

2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Ο πειραματικός σχεδιασμός περιλαμβάνει συγκεκριμένη βήματα και στάδια που βοήθησαν στην εξαγωγή πρωτότυπων συμπερασμάτων στην παρούσα διδακτορική διατριβή:

Επιλογή βακτηρίων για την διερεύνηση παρουσίας θαλάσσιων βακτηριοφάγων. Τα συγκεκριμένα βακτήρια πρέπει να είναι σοβαρά παθογόνα για τα εκκολαπτήρια ψαριών, να είναι εύκολα χειραγωγήσιμα υπό εργαστηριακές συνθήκες, να είναι καλά χαρακτηρισμένα και όσο είναι δυνατόν να υπάρχουν πληροφορίες που αφορούν το γονιδίωμα.

Δειγματοληψίες νερών από παράκτιες περιοχές υπό διάφορες συνθήκες και διαφορετικούς μήνες, με σκοπό την απομόνωση θαλάσσιων βακτηριοφάγων.

Απομόνωση βακτηριοφάγων και επιλογή αυτών ανάλογα με χαρακτηριστικά, όπως η υψηλή λυτική τους ικανότητα και η δυνατότητα χειρισμού τους υπό εργαστηριακές συνθήκες.

Πλήρης μοριακός και βιολογικός χαρακτηρισμός των επιλεγμένων βακτηριοφάγων.

Συγκριτική γονιδιωματική και συγκριτική λειτουργική γονιδιωματική ανάλυση των γονιδιωμάτων και μεταγραφημάτων τους.

Χαρτογράφηση και περιγραφή βιοχημικών διεργασιών εντός των κυττάρων ξενιστών.

Δημιουργία ανθεκτικών στελεχών ενός βακτηρίου-στόχου για αυτούς τους βακτηριοφάγους.

Τη μελέτη των μοριακών και βιοχημικών μηχανισμών ανθεκτικότητας.

Μελέτη του μεταβολομικού προτύπου των ανθεκτικών βακτηρίων και συσχέτισή του με την αλλαγή του προτύπου έκφρασης των διαμεμβρανικών μεταφορέων και μελέτη του προτύπου γονιδιακής έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με σημαντικά βιοχημικά μονοπάτια.

Δημιουργία πιθανού λειτουργικού μοντέλου της ανθεκτικότητας στους βακτηριοφάγους.

2.2 Βακτηριακά στελέχη-στόχοι, θρεπτικό υλικό, χειραγώγηση βακτηριοφάγων και συνθήκες ανάπτυξης

2.2.1 Βακτήρια-στόχοι

Κατά τη διάρκεια της παρούσας διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκαν 6 βακτήρια-στόχοι για την απομόνωση βακτηριοφάγων από θαλάσσιες δειγματοληψίες. Τα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν ανήκουν στα είδη Vibrio alginolyticus, V. anguillarum και V. harveyi. Πιο συγκεκριμένα πρόκειται για βακτήρια που έχουν προέλθει από τράπεζες και έχουν χαρακτηριστεί.

Βακτήριο	Στέλεχος	Μέγεθος γονι- διώματος (~εκατομμύρια βάσεις)	Μολυσματικότητα
Vibrio alginolyticus	V1	5.2	Υψηλή
Vibrio anguillarum	572 NCIMB	4.17	Πολύ υψηλή
Vibrio anguillarum	VaATCC	4.17	Πολύ υψηλή
Vibrio anguillarum	LGM 4437	4.17	Πολύ υψηλή
Vibrio anguillarum	Va23	4.17	Πολύ υψηλή
Vibrio harveyi	VH4	5.8	Πολύ υψηλή

2.2.2 Το βακτήριο Vibrio alginolyticus στέλεχος V1, ως μοντέλο μελέτης αλληλεπιδράσεων ιού: ξενιστή Οι βακτηριοφάγοι που απομονώθηκαν και μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία είχαν όλοι την ικανότητα να μολύνουν και να λύσουν το συγκεκριμένο στέλεχος του είδους *V. alginolyticus.* Έτσι το συγκεκριμένο βακτήριο χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα αλληλεπίδρασης μεταξύ ιού-ξενιστή. Το συγκεκριμένο στέλεχος απομονώθηκε από περιστατικό δονακίωσης σε καλλιέργεια τσιπούρας (*Sparus aurata*) στην Κρήτη. Το γονιδίωμά του είναι πλήρως αλληλουχημένο (Castillo et al., 2015) και καμπύλες ανάπτυξης και τεχνικές χειρισμού είχαν ήδη αναπτυχθεί (Kalantzis et al., 2016).

2.2.3 Ανάπτυξη βακτηρίων είδους Vibrio

Όλα τα βακτηριακά στελέχη φυλάσσονται στους -80° C κάτω από υγρό διάλυμα θρεπτικού και 20% γλυκερόλης. Ανακαλλιέργεια με την τεχνική της επίστρωσης (streaking) σε τριβλύο με στερεό θρεπτικό διάλυμα. Το γένος *Vibrio* αναπτύσσεται είτε σε υγρό θρεπτικό μέσο LB, είτε σε στερεό LB με 1.5% άγαρ στους 25°C για περίπου 16 ώρες. Στο θρεπτικό μέσο προστίθενται και 1 ml/l CaCl₂ και MgSO₄ με συγκέντρωση 1 Μ για να υποβοηθηθεί η μόλυνση των βακτηρίων με τους βακτηριοφάγους.

2.2.4 Ταυτοποίηση βακτηρίων με την τεχνική αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης μοναδιαίας αποικίας (colony PCR)

Για την γρήγορη ταυτοποίηση βακτηρίων του γένους *Vibrio* σχεδιάστηκαν εκκινητές με βάση την βιβλιογραφία που ενισχύουν μοναδικά γονίδια για κάποια από τα είδη *Vibrio* που έχουν ταυτοποιηθεί και γινόταν εξαγωγή γονιδιακού υλικού από αποικίες τριβλύου. Πιο συγκεκριμένα μια αποικία επαναδιαλυόταν σε 20 μl ddH₂O και εφαρμοζόταν θερμοκρασία 95°C για 20 λεπτά. Εναιώρημα 1μl χρησιμοποιούνταν σαν DNA template για την PCR. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν μαζί με τα πρωτόκολλα για κάθε είδος *Vibrio* αναλύονται στα Παραρτήματα.

2.2.5 Ανάπτυξη βακτηριοφάγων: Η τεχνική της αγαρόζης κορυφής

100 μΙ καλλιέργειεας στην εκθετική φάση σε συνδυασμό με 3 περίπου ml ημίρρευστου θρεπτικού μέσου LB είναι αρκετά αν απλωθούν ενδελεχώς στην επιφάνεια ενός τριβλύου που περιέχει LB με 1.5% άγαρ να σχηματίσουν ένα στρώμα βακτηριακής χλόης, ώστε να παρατηρηθεί η λύση βακτηρίου ξενιστή. Έτσι οποιαδήποτε εναπόθεση υγρού που πιθανά περιέχει βακτηριοφάγους ή είναι προϊόν διαδοχικής αραίωσης για την τιτλοδότηση αυτών, θα σχηματίσει λευκές/ διαυγείς αρνητικές αποικίες ή πλάκες, μετά τη μόλυνση με το βακτήριο και τη λύση του τελευταίου στην περιοχή εκείνη.



Εικόνα 2.1: Η δημιουργία της διπλής στοιβάδας άγαρ σε τριβλύο. Στο κάτω μέρος του τριβλύο υπάρχει θρεπτικό υλικό με 1.2% άγαρ, ενώ στο πάνω μέρος εφαρμόζεται το θρεπτικό υλικό μαζί με την καλλιέργεια του βακτηρίου ή την συγκαλλιέργεια του βακτηρίου με τον βακτηριοφάγο μαζί με άγαρ 0.7%.

2.2.6 Απομόνωση βακτηριοφάγων από θαλάσσια δείγματα παράκτιων περιοχών

Η απομόνωση των βακτηριοφάγων έγινε μετά από δειγματοληψία παράκτιων θαλασσινών υδάτων και αφού ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του εμπλουτισμού των δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα, σε ένα κλάσμα (περίπου 40 ml) κάθε δείγματος προστέθηκε 1 ml καλλιέργειας των βακτηρίων και 10% vol LB μέσο 10X συμπυκνωμένο. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλιζόταν η δημιουργία θρεπτικού διαλύματος με βάση το δείγμα νερού και κατάλληλες συνθήκες για να αυξηθεί ο πληθυσμός των βακτηρίων, τα οποία και θα λυθούν στην περίπτωση ύπαρξης κάποιου βακτηριοφάγου στο δείγμα, του οποίου και θα αυξηθεί ο τίτλος τους, κάνοντας τον ικανό και περαιτέρω χειραγώγηση στο εργαστήριο. Στη συνέχεια το εμπλουτισμένο δείγμα επωάστηκε σε συνθήκες 25°C για 48 ώρες υπό συνεχή ανακίνηση και κλάσμα αυτού φιλτραρίστηκε με 0.22 μm φίλτρο Whatman για απομάκρυνση των βακτηρίων και πιθανών θραυσμάτων αυτών υπό ασηπτικές συνθήκες. Το φιλτραρισμένο δείγμα είναι δυνατόν να περιέχει τυχόν ιούς αφού αυτοί έχουν ικανό μέγεθος για να μην φιλτραριστούν. Στη συνέχεια αναπτύσσοντας βακτηριακή χλόη στα τριβλύα με την τεχνική της αγαρόζης κορυφής, υπάρχει η δυνατότητα μετά την εναπόθεση εναιωρήματος από κάθε φιλτραρισμένο δείγμα να εντοπιστούν πιθανοί βακτηριοφάγοι μετά από αναστολή ανάπτυξης του βακτηρίου.

2.2.7 Πολλαπλασιασμός βακτηριοφάγων

Για τον πολλαπλασιασμό των βακτηριοφάγων χρησιμοποιήθηκαν συγκαλλιέργειες των βακτηρίων με βακτηριοφάγους στην εκθετική φάση ανάπτυξης των βακτηρίων. Χρησιμοποιούνταν αναλογία ιού: βακτηρίου (Multiplicity of infection, MOI) 10 ή 100 προς 1, ώστε να προκύπτει τίτλος βακτηριοφάγου τουλάχιστον 100 ή 1000 φορές παραπάνω.

2.2.8 Τιτλοδότηση και σταθερότητα βακτηριοφάγων

Η τιτλοδότηση των βακτηριοφάγων γινόταν με την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Οι αποθηκευμένοι βακτηριοφάγοι αραιώνονταν διαδοχικά, ώστε να προκύψει αριθμός ικανός να μετρηθεί με την τεχνικής της διπλής στοιβάδας άγαρ. Στη συνέχεια, είτε εναποθέτονταν 20 μl σε μια περιοχή του τριβλύου από κάθε αραίωση, είτε αναμιγνύονταν μαζί με την βακτηριακή καλλιέργεια κατά τη διαδικασία της δημιουργίας της διπλής στοιβάδας. Ακόμη η σταθερότητα των βακτηριοφάγων που απομονώνονταν ελέγχθηκε για τους 4°C ακόμα και μετά από 3 χρόνια αποθήκευσης.



Εικόνα 2.2: Διαδοχική αραίωση ενός διαλύματος που περιέχει βακτηριοφάγους και δημιουργία διπλής στοιβάδας άγαρ για την τιτλοδότηση αυτού.

2.3 Πλήρης χαρακτηρισμός απομονωμένων βακτηριοφάγων

2.3.1 Προσδιορισμός εύρος ξενιστών βακτηριοφάγων

Κάθε βακτηριοφάγος που απομονώθηκε και παρουσιάζεται αναλυτικά στην παρούσα διδακτορική διατριβή διερευνήθηκε περαιτέρω η ικανότητα λύσης διαφόρων ειδών και στελεχών *Vibrio* που έχουν απομονωθεί από διάφορες περιοχές. Η συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. στην Κρήτη επιστρώνοντας μεγάλο αριθμό ειδών και στελεχών με την τεχνικής της διπλής στοιβάδας. Μετά από ολονύχτια επώαση στους 25° C προσδιορίστηκε το εύρος ξενιστών στα συγκεκριμένα βακτήρια και ορίστηκε σε καθόλου λύση (-), μέτρια

2.3.2 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (TEM)

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία διεύλεσης είναι ένα πολύ σημαντικό βήμα κατά τη διάρκεια χαρακτηρισμού ενός βακτηριοφάγου, καθώς μπορεί και άμεσα και γρήγορα να μας δώσει πληροφορίες σχετικά με την μορφολογία των ιοσωματιδίων, το μέγεθός τους και επομένως την φυλογένεια τους. Χρησιμοποιήθηκε 1 ml από κάθε διάλυμα βακτηριοφάγου υψηλού τίτλου (>109 pfu/ml), όπου και τοποθετήθηκε πάνω σε μικροσχάρες χαλκού (copper grids). Το κάθε δείγμα εμβαπτίστηκε με διάλυμα 2 % οξικού ουρανιλίου, ώστε να υπάρχει αρνητική χρώση και αφού στέγνωσε τοποθετήθηκε στο ηλετρονιακό μικροσκόπιο διέλευσης. Η παρατήρησε έγινε στο εργαστήριο ηλεκτρονικής μικροσκοπίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του καθηγητή Κωνσταντίνου Φασσέα.

2.3.3 Απομόνωση γονιδιωματικού υλικού βακτηριοφάγων

Για την κατακρήμνιση των ιοσωματιδίων εφαρμόστηκε πρωτόκολλο κατακρήμνισης πρωτεϊνών με πολυαιθυλενική γλυκόλη (PEG) υπό αλκαλικές συνθήκες (NaCl 150 mM). Πιο συγκεκριμένα έχοντας αρχικά υψηλό τίτλο διαλύματος βακτηριοφάγου (>10⁹):

Προστίθεται διάλυμα PEG 8.000 20%/NaCl 2.5 M με αναλογία 1:5.

Το διάλυμα μένει στους 4° C για 16 ώρες.

Φυγοκέντρηση 14.000 g για 1 ώρα.

Η υδατική φάση απομακρύνεται κα παρατηρείται μικρό άσπρο ίζημα.

Το ίζημα επαναδιαλύεται σε ένα ελαφρά αλκαλικό διάλυμα 150 mM NaCl 100 μl.

Γίνεται ένωση 2 διαφορετικών χειρισμών που έχουν προέλθει από τον ίδιο βακτηριοφάγο και έτσι προκύπτει ένα τελικό διάλυμα 200 μl με συμπυκνωμένους πλέον βακτηριοφάγους.

Στη συνέχεια προστίθενται 40 μl με 10 mg/ml RNAάσης, 8μl DNAάσης (Promega, Madison, WI, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και το δείγμα μεταφέρεται στους 37°C για 1 ώρα περίπου. Με αυτόν τον τρόπο απομακρύνονται τυχόν νουκλεϊκά οξέα που έχουν προκύψει από τη λύση των βακτηρίων και έχουν μεταφερθεί στο τελικό διάλυμα και θα μπορούσαν να δράσουν ως παρεμποδιστές ή μόλυνση των δειγμάτων. Μικρός όγκος του διαλύματος στη συνέχεια μεταφέρεται για αντίδραση συμβατικής PC, ώστε να διαπιστωθεί η απομάκρυνση του DNA. Οι εκκινητές της αντίδρασης βρίσκονται στα Παραρτήματα.

Στη συνέχεια προστίθεται 20 μl προτεάσης από τον κατασκευαστή του kit μαζί με 200μl lysis buffer (SDS-based) και το διάλυμα επωάζεται στους 57ο C για 30'. Με αυτόν τον τρόπο τα πρωτεϊνικά καψίδια των βακτηριοφάγων λύνονται και τα νουκλεϊκά οξέα μένουν ελεύθερα. Ταυτόχρονα απομακρύνονται οι RNAάσες και οι DNAάσες από το προηγούμενο βήμα από την δράσης της πρωτεϊνάσης.

Έπειτα προστίθεται 200 μl αιθανόλης 100% και γίνεται εφαρμόζεται ανακίνηση με Vortex για λίγα δευτερόλεπτα και το διάλυμα εφαρμόζεται στις στήλες με silica membrane του kit και η στήλη φυγοκεντρείται στα 8.000 g για 1 λεπτό.

Απομακρύνεται η υδατική φάση που πέρασε από τη στήλη, προστίθενται 500
 μΙ AW1 buffer και επαναφυγοκεντρείται το δείγμα στα 8.000 g για 1 λεπτό.

Επαναλαμβάνεται η απομάκρυνση, προστίθενται 500 μl AW2 buffer και επαναφυγοκεντρείται το δείγμα στα 14.000 g για 3 λεπτά. Για να στεγνώσει καλά η στήλη επαναφυγοκεντρείται για άλλο 1 λεπτό στα 8.000 g μετά την απομάκρυνση της υδατικής φάσης.

Προστίθενται 50 μl ddH₂O σε δύο βήματα και φυγοκεντρείται η στήλη, όπου και γίνεται η κατακρήμνιση του DNA.

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα των νουκλεϊκών οξέων μετριέται στη σθσκευή Nannodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) για ποσοτική και ποιοτική αξιολόγηση ενώ το αποτέλεσμα οπτικοποιείται και αξιολογείται και σε ένα gel αγαρόζης 1.5 %.

Με τη συγκεκριμένη τεχνική το αποτέλεσμα είναι συνήθως 10 μg DNA με υψηλή καθαρότητα και μειωμένη θραύση του DNA.

2.3.4 Πέψη γονιδιώματος με ενδονουκλεάσες περιορισμού και μοτίβα πέψης

Μετά την απομόνωση του βακτηριοφαγικού DNA χρησιμοποίηθηκε μέρος του για την πέψη με ένζυμα περιορισμού. Η συγκεκριμένη διαδικασία εντάσσεται στον πλήρη χαρακτηρισμό βακτηριοφάγων, αφού τα διαφορετικά μοτίβα πέψης γονιδιωμάτων διαφορετικών βακτηριοφάγων συνεπάγεται και διαφορετική γονιδιακή οργάνωση.

Οι πέψεις δειγμάτων DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού γίνονται σε όγκους που κυμαίνονται από 20 μl μέχρι και 100 μl, ανάλογα με την ποσότητα του DNA που υ- ποβάλλεται σε πέψη.

Σε σωλήνα eppendorf τοποθετήθηκε το δείγμα του DNA, το ρυθμιστικό διάλυμα που απαιτείται για την δράση του ενζύμου και τέλος ddH₂O μέχρι τον επιθυμητό όγκο. Μία τυπική αντίδραση πέψης σε τελικό όγκο 30 μl περιλαμβάνει:

- Δείγμα DNA 1-5 μl (1 μg περίπου)
- 10Χ ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου 3 μl
- \blacktriangleright ddH₂O έως τελικό όγκο 28.5 μl

Προστίθεται 1.5 μΙ ενδονουκλεάση περιορισμού. Συνήθως χρησιμοποιείται μία μονάδα ενζύμου (1 unit) ανά μικρογραμμάριο δείγματος DNA. Το δείγμα αναμιγνύεται καλά και επωάζεται για 16 ώρες στην κατάλληλη θερμοκρασία.

Μετά το πέρας της αντίδρασης τα προϊόντα αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης.

2.3.5 Πολυφασική καμπύλη ανάπτυξης και προσδιορισμός βιολογικών χαρακτηριστικών βακτηριοφάγων

Για τον προσδιορισμό βιολογικών χαρακτηριστικών του κάθε βακτηριοφάγου, όπως ο χρόνος απορρόφησης (adsorption time) και ο χρόνος έκλειψης (latency time), ενώ το μέγεθος έκρηξης (burst size) προσδιορίστηκε σύμφωνα με Bolger-Munro, et al., 2013. Όλα αυτά αποτελούν σημαντικά στοιχεία της βιολογίας των βακτηριοφάγων και επομένως δημιουργήθηκε καμπύλη ανάπτυξης για κάθε ιό παρουσία του ξενιστή. Πιο συγκεκριμένα:

- Υγρή καλλιέργεια του βακτηρίου ξενιστή επωάστηκε υπό συνεχή ανάδευση στις 150 rpm στους 25°C έτσι ώστε τα βακτήρια να βρεθούν στην εκθετική φάση ανάπτυξης.
- Η καλλιέργεια επιμολύνθηκε με ποσότητα βακτηριοφάγου έτσι ώστε η αναλογία φάγου/βακτηρίου να είναι 1 προς 100 (MOI=0,01). Η στιγμής προσθήκης του φάγου θεωρείται ως η χρονική στιγμή 0, t=0.
- Τις χρονικές στιγμές 3', 6', 9', 12', 15', 20', 30', 40', 50' 60, 70', 80, 90' πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για τον έλεγχο του τίτλου του βακτηριοφάγου.
- Σε κάθε μέτρηση, μεταφέρθηκε δείγμα 200μl σε eppendorf, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 30-60 sec και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, ώστε να απομακρυνθούν τα μη προσροφημένα ιοσωματίδια.
- Ακολούθησε τιτλοδότηση της κάθε χρονικής στιγμής και την επόμενη μέρα καταμετρήθηκαν οι λυτικές πλάκες και υπολογίστηκε ο τίτλος του φάγου καθώς και το ποσοστό της απορρόφησης του βακτηριοφάγου.

Υπολογίζοντας τον τίτλο των ιών σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές μπορούμε και εξάγουμε συμπεράσματα για τον χρόνο που χρειάζονται τα ιοσωματίδια για να προσροφηθούν στο κύτταρο ξενιστή, πόση ώρα χρειάζονται για να λύσουν το κύτταρο, αλλά και το μέγεθος έκρηξης, δηλαδή τον αριθμό των ιοσωωματιδίων που απελευθερώνονται μετά τη λύση (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3: Συνοπτική σχηματική απεικόνιση μιας μονοφασικής καμπύλης ανάπτυξης βακτηριοφάγων. Μία αντίστοιχη πολυφασική καμπύλη υποδεικνύει τη συγκεκριμένη καμπύλη αλυσιδωτά.

2.3.6 In vitro αποτελεσματικότητα λύσης βακτηριοφάγων

- Η in vitro αποτελεσματικότητα ενός βακτηριοφάγου και η ώρα για την οποία μπορεί να καταστείλει την βακτηριακή ανάπτυξη, είναι ένα πολύ σημαντικό στοιχείο για την λυτική ικανότητα ενός ιού.
- Οι βακτηριοφάγοι προστέθηκαν με MOI: 100 σε καλλιέργεια κυττάρου
 ξενιστή που βρισκόταν στην εκθετική φάση ανάπτυξης.
- Προσδιορίστηκε η πυκνότητα του βακτηριακού πληθυσμού με οπτική απορρόφηση (OD₆₀₀) χρονικές στιγμές έως και 8 ώρες περίπου μετά την μόλυνση.

Κάθε in vitro λύση έγινε με τριπλές επαναλήψεις χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα βακτήρια *V. alginolyticus* χωρίς την παρουσία βακτηριοφάγου.

2.3.7 Αλληλούχιση των γονιδιωμάτων των βακτηριοφάγων

5 μg από το DNA των βακτηριοφάγων οδηγήθηκε για δημιουργία γονιδιωματικών βιβλιοθηκών με συζευκτικά άκρα. Έγινε πέψη των γονιδιωμάτων με ένζυμα και έγινε ένθεση στις βιβλιοθήκες με μέγεθος ένθεσης 800 bp όπου και ακολούθησε PCR ενίσχυσης των κομματιών ένθεσης μετά τη λιγοποίηση των εκκινητών και ανταπτόρων, ενώ η διαδικασία αλληλούχισής τους έγινε με τεχνολογία Illumina HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA, USA).



Εικόνα 2.4: Η συσκευή αλληλούχισης γονιδιωμάτων της εταιρείας Illumina, μοντέλο HiSeq 2000, όπου πραγματοποιήθηκε η αλληλούχιση των βακτηριοφαγικών γονιδιωμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Η αλληλούχιση των γονιδιωμάτων πραγματοποιηθήκε στο Beijing Genomic Institute (Shenzhen, Guangdong, China).



Εικόνα 2.5: Σχηματική απεικόνιση δημιουργίας «βιβλιοθηκών» αλληλούχισης με συζευκτικά άκρα και μέγεθος ένθεσης 300 bp από την κατασκευάστρια εταιρεία του μηχανήματος αλληλούχισης Illumina.

Στη συνέχεια πιθανές επιμολύνσεις, τα χαμηλής ποιότητας «διαβάσματα» των γονιδιωμάτων, το Ν-τελικό άκρο, οι αντάπτορες και οι εκκινητές στο 3'και 5'άκρο αποκόπηκαν βιοπληροφοριακά θέτοντας όριο λάθους το 0.05 και έτσι προέκυψαν οι τελικές αλληλουχίες των γονιδιωμάτων υψηλής ποιότητας.

2.4 Δημιουργία ανθεκτικών στελεχών Vibrio στους βακτηριοφάγους

Για την μελέτη της ανθεκτικότητας των βακτηρίων στους βακτηριοφάγους χρησιμοποιήθηκε το είδος *V. alginolyticus* στέλεχος V1. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικοί βακτηριοφάγοι για τη δημιουργία βακτηρίων ανθεκτικών για κάθε έναν από αυτούς.

- Για κάθε βακτηριοφάγο η βακτηριακή καλλιέργεια αναπτύχθηκε έως την εκθετική του φάση, όπου στη συνέχεια προστέθηκαν βακτηριοφάγοι με MOI=100.
- Οι καλλιέργειες στη συνέχεια χωρίστηκαν σε 3 επαναλήψεις και η κάθε μία επωάστηκε στους 25° C για περίπου 16 ώρες.

- Στη συνέχεια από κάθε επανάληψη έγινε δειγματοληψία 100 μl τα οποία αραιώθηκαν και επωάστηκαν σε τριβλύα με στερεό θρεπτικό μέσο, ώστε να αναπτυχθούν μοναδιαίες αποικίες.
- Επιλέχθηκαν αρκετές αποικίες από κάθε καλλιέργεια οι οποίες ανακαλλιεργήθηκαν, επιστρώθηκαν με βακτηριοφάγους με τη μέθοδο της αγαρόζης κορυφής για να διαπιστωθεί η ανθεκτικότητά τους στους ιούς και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους -80° C. Ταυτόχρονα αναπτύχθηκαν και βακτήρια ελέγχου Control (Εικόνα 2.6).

2.5 Βιοπληροφοριακά εργαλεία ανάλυσης των γονιδιωμάτων και συγκριτικής γονιδιωματικής

2.5.1 Ανασύσταση γονιδιώματος (assembling)

Η *de novo* ανασύσταση των γονιδιωμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Velvet software (Zerbino και Birney, 2008) υπό την βιοπληροφική πλατφόρμα Genious (R8-R10 έκδοση, Biomatters Ltd, Aucklκαι, New Zealand). Όλες οι ανασυστάσεις έγιναν μετά από βελτιστοποίηση των παραμέτρων για το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα. Σε όλες τις περιπτώσεις προέκυψαν μοναδιαία τμήματα DNA.

2.5.2 In silico πρόβλεψη γονιδίων (annotation), συγκριτική γονιδιωματική και οπτικοποίηση τεταρτοταγών δομών πρωτεϊνών

Η πρόβλεψη των ανοιχτών αναγνωστικών πλαισίων (Open reading frames, ORF) και πιθανών γονιδίων έγινε με το πρόγραμμα Glimmer 3 (Delcher et al., 1999) υπό την διαδικτυακή πλατφόρμα R.A.S.T. (Rapid Annotation Subsystem Technology R.A.S.T.; Aziz et al., 2008; Overbeek et al., 2014), όπου και έγινε και η αρχική *in silico* πρόβλεψη των γονιδίων σε σύγκριση με τις παγκόσμιες βάσεις δεδομένων γονιδίων και tRNA. Περισσότερες υποθετικές πρωτεΐνες αναγνωρίστηκαν και με το πρόγραμμα B2GO (Blast to go, Valencia, Spain) με βάση την non-reductant βάση δεδομένων πρωτεϊνών και την Uniprot με όριο λάθος το E-value ≤10⁻⁶. Αυτός ο τρόπος επέτρεψε να γίνει μεγαλύτερη αναγνώριση πρωτεϊνών (και CDS) και να αναγνωριστούν τυχόν λάθη που είχαν γίνει κατά την προηγούμενη διαδικασία. Τα tRNA επιβεβαιώθηκαν με το πρόγραμμα tRNAscan-se (έκδοση 1.21; Lowe και Eddy, 1997). Η συντένια των γονιδιώματων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό MAUVE (Darling et al., 2004). Η λίστα με ομόλογα γονίδια βακτηριοφάγων δημιουργήθηκε με την διαδικτυακή πλατφόρμα CoreGene (Zafar et al., 2002) με όριο λάθους blastp: 90. Η εγκυκλοπαίδεια γονιδίων και γονιδιωμάτων του Κιότο (Kyoto Encyclopedia of Genes και Genomes; K.E.G.G.; Ogata et al., 1999; Kanehisa et al., 2016) χρησιμοποιήθηκε για την αναγνώριση βιοχημικών διεργασιών μέσα στο κύτταρο την ώρα της μόλυνσης.

Η ευθυγράμμιση ολόκληρων των γονιδιωμάτων έγινε με τον αλγόριθμο του προγράμματος LastZ (Harris και Pierpoint, 2012). Η ομοιότητα μεταξύ των γονιδιωμάτων εξηγείται με βάση την καλύτερη δυνατή ευθυγράμμιση ανάμεσα στις διαφορετικές ευθυγραμμίσεις για κάθε γονιδίωμα. Τα φυλογενετικά δέντρα των γονιδιωμάτων που αντικατοπτρίζουν την ομοιότητά τους έγιναν με συγκεκριμένες παραμέτρους (Whole genome neighbor joining consensus tree with free end gaps και Tamura–Nei method (bootstrap: 10, consensus method threshold: 87%) μετά την ευθυγράμμιση των γονιδιωμάτων με το λογισμικό Geneious (Biomatters Ltd, New Zealand). Τα φυλογενετικά δέντρα με επιμέρους γονίδια δημιουργήθηκαν με το λογισμικό MEGA 6 (Tamura et al., 2013) με συγκεκριμένες παραμέτρους (Jones–Taylor–Thornton substitution model και nearest-neighbor-interchange model of tree interference και 100 bootstrap). Ο αλγόριθμος του DELTA-BLAST της παγκόσμιας βάσης δεδομένων γονιδιωμάτων χρησιμοποιήθηκε για συγκριθούν, αναγνωριστούν και να χαρακτηριστούν οι αμινοξικές αλληλουχίες των ενδονουκλεασών. Η οπτικοποίηση των ευθυγραμμίσεων έγινε με το λογισμικό Bioedit (έκδοση 7.2.5) (Hall,1999). Εν τέλει τα γονιδιώματα κατατέθηκαν στην παγκόσμια τράπεζα γονιδιωμάτων GenBank.



Διάγραμμα 2.1: Συνοπτικό διάγραμμα ροής αλληλούχισης και βιοπληροφορικής ανάλυσης των γονιδιωμάτων.

Η ενδελεχής μελέτη του αναγνωστικού πλαισίου με όνομα «beta-lactamase domain» έγινε με τα λογισμικά InterProScan (Jones et al., 2014) και Prosite (de Castro et al., 2006) ώστε να διερευνηθούν πιθανά ενεργά κέντρα και συντηρημένες περιοχές. Η ιική πρωτεΐνη Sir2/cobB μελετήθηκε και οπτικοποιήθηκε με το λογισμικό SwissPdb viewer 3 (έκδοση 4.1; Guex και Peitsch, 1997). Η στερεοχημική δομή της αξιολογήθηκε με το λογισμικό Verify 3D4 (Molecular Biology Institute, UCLA, Los Angeles, CA, USA; Bowie et al., 1991; Luthy et al., 1992) και το Prosa II (Sippl, 1993; Wiederstein και Sippl, 2007). Η μελέτη των των περιοχών δέσμευσης ψευδαργύρου έγινε με το ZincExplorer (Chen et al., 2013) και οι πιθανές ιοντικές γέφυρες με το λογισμικό ESBRI (Costantini et al.,2008).

2.6 Καμπύλες ανάπτυξης ανθεκτικών στελεχών

Για τη δημιουργία μεγαλύτερης ακρίβειας καμπυλών ανάπτυξης των ανθεκτικών στελεχών δημιουργήθηκαν ξεχωριστές καμπύλες ανάπτυξης. Πιο συγκεκριμένα:

- Οι βακτηριοφάγοι προστέθηκαν στην αρχή της εκθετικής φάσης ανάπτυξης
 των βακτηρίων.
- Ο ρυθμός ανάπτυξης των ανθεκτικών στελεχών προσδιορίστηκε με τη χρήση του συστήματος TECAN INFINITE PRO 300 που έχει τη δυνατότητα να μετράει φωτομετρικά αυτόματα απορρόφηση και φθορισμό. Το σύστημα αυτό αποτελείται από πλάκες 96 κυψελίδων στις οποίες τοποθετήθηκε υγρό θρεπτικό LB και μολύνθηκε με τις καλλιέργειες των ανθεκτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν, σε τετραπλές τεχνικές επαναλήψεις για την κάθε ανθεκτική αποικία.
- Στις κυψελίδες τοποθετήθηκαν και καλλιέργειες ελέγχου (Control) Vibrio alginolyticus V1.

To micro-plate ήταν υπό συνεχή ανάδευση στις 450 rpm στους 25 °C και κάθε ένα λεπτό περίπου γίνονταν αυτόματα μετρήσεις για την οπτική απορρόφηση των δειγμάτων στα 600nm για 22 ώρες.

2.7 Απομόνωση ολικού RNA από τα βακτήρια

2.7.1 Απομόνωση RNA βακτηρίων

5-10 ml βακτηριακής καλλιέργειας που βρίσκεται στην εκθετική φάση (OD600=0.2-0.3) φυγοκεντρούνται στους 4 °C.

Τα κύτταρα ξεπλένονται με 150 mM 500 μl NaCl, ώστε να απομακρυνθούν λυμένα κύτταρα, θραύασματα, ένζυμα και άλλοι μεταβολιτές και μεταφέρονται σε σωλήνες Eppendorf.

Στη συνέχεια τα κύτταρα κατακρημνίζονται με φυγοκέντριση στα 11.000 g στους 4°C.

➤ Προστίθεται TRIZOLTM (ThermoScientific) 200 μl.

Γίνεται μηχανική θραύση των κυττάρων με έμβολα, vortex και επαναφυγοκεντρήση 2-3 φορές.

 \succ Προστίθενται ακόμα 300 μl TRIZOLTM.

Γίνεται ανάδευση τύπου vortex για 1-2 λεπτά.

Φυγοκεντρούνται εν τέλει τα κύτταρα στα 12.000 g στους 4ο C για 10 min

Η υπερκείμενη φάση που περιέχει το RNA μεταφέρεται σε νέο Eppendorf και παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για ~7 min.

Προσθέτουμε 500 μΙ χλωροφόρμιο και τα δείγματα ανακινούνται ήπια για 30 sec.

Τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 3 min.

Φυγοκεντρούνται τα δείγματα στα 12.000 g στους 4°C για 15 min.

Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούριο Eppendorf.

Προστίθονται 400 μΙ ισποπροπανόλης και ανακινούνται ήπια.

Τα δείγματα επωάζοονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min.

Φυγοκεντρούνται τα δείγματα στα 12.000 g στους 4 °C για 15 min, όπου και παρατηρείται λευκό ίζημα.

Το υπερκείμενο απορρίπτεται.

Πλήση του ιζήματος με 75 % αιθανόλης.

Στέγνωμα του ιζήματος και επαναδιάλυσή του με ddH₂0 50-100 μl.

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του δείγματος προσδιορίζονται φωτομετρικά.

2.7.2 Απομάκρυνση DNA από δείγματα RNA

Κατά την απομόνωση ολικού RNA, παρόλο που κατακρυμνίζεται η πάνωφάση από το αντιδραστήριο TRIZOL[™], ενδέχεται να περιέχεται στο δείγμα και γονιδιωματικό DNA. Για να αποφευχθεί η λήψη λανθασμένων αποτελεσμάτων, κατά την μελέτη των επιπέδων έκφρασης γονιδίων, απαιτείται ο καθαρισμός του RNA από το γονιδιωματικό DNA. Αυτό επιτυγχάνεται με τη δράση του ενζύμου DNase. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

Η DNase είναι απαλλαγμένη από πιθανή δράση RNάσης, ενώ η παρουσία RNase Out (παρεμποδιστή δράσης RNασών) είναι απαραίτητη για την διαφύλαξη της ακεραιότητας του RNA κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Τα δείγματα επωάζονται για περίπου 1 ώρα και 30 λεπτά.

Σο μίγμα επωάζεται στους 37°C για περίπου 1 ώρα και 30 λεπτά

Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστίθενται στο δείγμα 100 μl ddH₂O και
 150 μl μίγματος φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη 25:24:1 PIC pH 8,3.

Ακολουθεί καλή ανάδευση με χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) για 30 sec και το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Η υδάτινη φάση μεταφέρεται προσεκτικά σε νέο σωλήνα eppendorf και προστίθενται στο δείγμα 150 μl χλωροφόρμιο.

Αφού προηγηθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, η υδάτινη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα eppendorf και τα νουκλεϊκά οξέα κατακρημνίζονται με την προσθήκη 1/10 όγκου 3M οξικού νατρίου pH 5,2 και 2,5 όγκων αιθανόλης.

Τα δείγματα επωάζονται στους -20°C για περίπου 16 ώρες και στη συνέχεια μεταφέρονται για 30 λεπτά στους -80°C.

> Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C.

Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα ξεπλένεται με 70 % v/v αιθανόλη, στεγνώνεται και επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο ddH₂O.

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του δείγματος προσδιορίζονται φωτομετρικά, ενώ η ακεραιότητα του RNA διαπιστώνεται με ανάλυση του δείγματος σε πηκτή αγαρόζης.

Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης πραγματοποιείται αντίδραση PCR στο καθαρό πλέον RNA και η μη παρουσία ενισχυμένου προϊόντος επιβεβαιώνει την επιτυχία της απομάκρυνσης του DNA.

2.7.3 Φωτομετρικός προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων σε υδατικό διάλυμά τους γίνεται με τη χρήση του σπεκτροφωτομέτρου NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA). Για την ποσοτικοποίηση δείγματος νουκλεινικών οξέων απαιτείται μόλις 1 μl από το δείγμα που τοποθετείται στη συσκευή και πραγματοποιείται η μέτρηση. Η καθαρότητα ενός δείγματος νουκλεϊνικών οξέων υπολογίζεται από τους λόγους OD₂₆₀/OD₂₈₀ και OD₂₄₀/OD₂₆₀, όταν οι τιμές των λόγων είναι μεταξύ 1,8 και 2,2 τότε το δείγμα θεωρείται ικανοποιητικής καθαρότητας.

2.7.4 Ανάλυση δεοξυριβοζονουκλεϊνικών οξέων (DNA) σε πηκτή αγαρόζης

Ο διαχωρισμός των δεσοξυριβοζονουκλεϊνικών οξέων με βάση το μέγεθος και την διαμόρφωσή τους γίνεται με ηλεκτροφόρεση σε πηκτή αγαρόζης. Στην περίπτωση διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA, ο διαχωρισμός τους σε πηκτή αγαρόζης είναι ανάλογος με το μέγεθος τους. Το εύρος μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πηκτής σε αγαρόζη και κυμαίνεται από 0,1 έως 100 kb. Στον πίνακα 2.1 αναφέρονται οι τυπικές συγκεντρώσεις αγαρόζης ανάλογα, με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού.

Αγαρόζη (%)	Εύρος διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA (kb)
0,3	1,0-70
0,5	0,7-45
0,8	0,4-20
1,0	0,3-10
1,2	0,2-8
1,5	0,2-6
2,0	0,1-5

Πίνακας 2.1: Συγκέντρωση πηκτής αγαρόζης ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού

Τα μόρια του DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός. Η προετοιμασία της πηκτής των δειγμάτων γίνεται ως εξής:

Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστίθεται σε ρυθμιστικό διάλυμα
 ηλεκτροφόρεσης 1Χ ΤΑΕ και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να λιώσει.

Στην λιωμένη αγαρόζη προστίθεται 0,001% v/v διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου και αφήνεται να κρυώσει μέχρι τους 50°C.

Η πηκτή τοποθετείται σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και αφήνεται
 να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.

Στα δείγματα του DNA που πρόκειται να αναλυθούν, προστίθεται 1/10 όγκου διαλύματος χρωστικής 10X DLB.

Μόλις στερεοποιηθεί η πηκτή, απομακρύνεται η χτένα και τοποθετείται στο δοχείο ηλεκτροφόρησης το οποίο συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1Χ ΤΑΕ.

Τα δείγματα αναλύονται σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως που δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5 Vcm⁻¹.

2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) αποτελεί την πλέον εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδο ενισχύσεως ακολουθιών DNA και RNA, in vitro ή και in situ. Η αντίδραση προϋποθέτει την ύπαρξη δύο ολιγονουκλεοτιδίων, που έχουν την ικανότητα να υβριδίζουν στις συμπληρωματικές αλυσίδες DNA ή cDNA, τα οποία δρουν ως εκκινητές της σύνθεσης της αλυσίδας του DNA. Η σχεδίαση των εκκινητών είναι τέτοια, ώστε η σύνθεση της αλυσίδας του DNA να γίνεται προς την κατεύθυνση του άλλου. Η σύνθεση γίνεται με τη δράση μίας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης, παρουσία των απαραίτητων νουκλεοτιδίων καθώς και ιόντων Mg⁺². Κατά τη διάρκεια μίας τυπικής αντίδρασης, πρώτο στάδιο αποτελεί η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, με τη θέρμανση του δείγματος. Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας και υβριδισμός των εκκινητών στις αποδιατεταγμένες αλυσίδες. Η σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων γίνεται με θέρμανση του δείγματος στη βέλτιστη θερμοκρασία για τη δράση της DNA πολυμεράσης. Η όλη διαδικασία αποδιάταξης, υβριδισμού των εκκινητών και σύνθεσης της συμπληρωματικής αλυσίδας επαναλαμβάνεται για ένα αριθμό κύκλων (συνήθως 20-35). Κατά τη διάρκεια των διαδοχικών κύκλων και εφόσον δεν υφίστανται περιοριστικοί παράγοντες όπως έλλειψη νουκλεοτιδίων και εκκινητών ή παραγωγή παρεμποδιστών της πολυμεράσης, η συσσώρευση των προϊόντων της αντίδρασης γίνεται με εκθετικό ρυθμό.

Πέρα από την τυπική αντίδραση ενισχύσεως δίκλωνων τμημάτων DNA, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί μα σειρά από παραλλαγές της βασικής διαδικασίας που περιγράφτηκε παραπάνω. Μία από τις παραλλαγές επιτρέπει τη χρησιμοποίηση, ως αρχικής μήτρας για την αντίδραση ενισχύσεως μορίων RNA (RT-PCR), τα οποία αρχικά μεταγράφονται σε cDNA με τη δράση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse transcriptase). Επιπλέον, είναι δυνατή η ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης με την χρήση της τεχνικής της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qRealTime PCR). Οι δύο παραπάνω τεχνικές χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της παρούσας μελέτης και θα παρουσιαστούν με μεγαλύτερη λεπτομέρεια.

2.8.1 Ενίσχυση ακολουθιών DNA με την χρήση της τεχνικής PCR

Οι ακριβείς συνθήκες πραγματοποίησης μίας τυπικής αντίδρασης PCR προσαρμόζονται κάθε φορά στις απαιτήσεις του συγκεκριμένου πειράματος. Συγκεκριμένα, η ποσότητα του DNA που προστίθεται ως μήτρα εξαρτάται από το είδος του. Στην περίπτωση γενωματικού DNA, χρησιμοποιείται 1 ng-1 μg, ενώ για πλασμιδιακό DNA αρκούν 1 pg-100 ng. Επίσης η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται κάθε φορά από τη θερμοκρασία τήξεως (Tm) τους. Εκτός από τις επιμέρους διαφορές, η τυπική αντίδραση PCR πραγματοποιείται ως εξής:

> Σε ειδικό σωλήνα eppendorf (500 ή 100 μl) προστίθενται τα παρακάτω:

Μήτρα DNA	1 μl
Εκκινητής 1 (10 μΜ)	1 μl
Εκκινητής 2 (10 μΜ)	1 μl
Μίγμα dNTP's (10 mM το καθένα)	1 μl
10Χ ρυθμιστικό διάλυμα PCR	5 μl
Taq DNA πολυμεράση (1unit/μl)	1 μl
ddH ₂ O	40 μl

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση του DNA είναι:

Αρχική αποδιάταξη: 94°C για 3 λεπτά Αποδιάταξη: 94°C για 1 λεπτό Υβδριδισμός εκκινητών 48-56°C για 1 λεπτό Επιμήκυνση 72°C για 1 λεπτό/ Kb προϊόντος Τελική επιμήκυνση 72°C για 10 λεπτά



2.8.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR)

Η PCR αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription PCR, RT-PCR) χρησιμοποιείται για την παραγωγή συμπληρωματικού DNA (cDNA) από RNA. Εδώ χρησιμοποιείται μια RNA εξαρτώμενη πολυμεράση, η αντίστροφη μεταγραφάση που χρησιμοποιεί ως μήτρα RNA. Ως εκκινητής χρησιμοποιήθηκαν 12 – 18μερή ολιγο (dT)

> Σε ειδικό σωλήνα eppendorf (500 ή 100 μl) προστίθενται τα παρακάτω:

Μήτρα RNA	1 μg
Εκκινητής ολιγο (dT)12 – 18μερή (500 μg/ml)	1 μl
Μίγμα dNTPs (10 mM το καθένα)	1 μl
ddH ₂ O έως τελικό όγκο	12 μl

Το RNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 65°C για 5 λεπτά, ώστε να επιτραπεί ο υβριδισμός εκκινητή – RNA.

Το δείγμα μεταφέρεται αμέσως σε πάγο για να διατηρηθεί σε μονόκλωνη κατάσταση.

> Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση και προσθήκη και των παρακάτω:

Το δείγμα προθερμαίνεται στους 42°C για 2 λεπτά πριν την προσθήκη 1 μl της αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript II (200 units/μl)

- Ακολουθεί επώαση του δείγματος στους 42°C για 50 λεπτά
- > Η αντίδραση σταματά με θέρμανση του δείγματος στους 70°C για 15 λεπτά

2.8.3 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR -qrt PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της προόδου μιας αντίδρασης PCR σε πραγματικό χρόνο. Επίσης, είναι δυνατή η ποσοτικοποίηση μιας πολύ μικρής ποσότητας προϊόντος PCR (DNA, cDNA ή RNA) με πολύ μεγάλη ακρίβεια. Βασίζεται στην ανίχνευση του φθορισμού, ο οποίος εκπέμπεται όταν κάποιο μόριο αναφοράς (SYBR [®] Green) προσδεθεί στη μικρή αύλακα της δίκλωνης έλικας ενός μορίου DNA (προϊόντος της PCR). Τα προϊόντα της PCR συσσωρεύονται μετά από κάθε κύκλο ενίσχυσης των ακολουθιών, γι' αυτό με την πρόοδο της αντίδρασης ο φθορισμός που παράγεται από το μόριο αναφοράς αυξάνει. Με αυτό τον τρόπο διευκολύνεται η παρακολούθηση της αντίδρασης ενώ αυτή βρίσκεται σε εξέλιξη. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η SYBR Green παράγει φθορισμό όταν προσδένεται σε οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA, όπως διμερή εκκινητών ή ανεπιθύμητα προϊόντα της αντίδρασης του PCR. Λόγω αυτού του φαινόμενου ο προσεκτικός σχεδιασμός των εκκινητών και οι προσεκτικοί χειρισμοί κατά την διάρκεια των πειραμάτων είναι αναγκαίοι για την αποφυγή μολύνσεων και κατ' έκταση την παραλαβή εσφαλμένων μετρήσεων φθορισμού.

Η PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης. Στα πλεονεκτήματά της ανήκουν η ικανότητά της να μετρά τις συγκεντρώσεις των νουκλεϊνικών οξέων σε ένα άπειρο δυναμικό εύρος, η υψηλή ευαισθησία της και η ικανότητα να επεξεργάζεται πολλά δείγματα ταυτόχρονα. Επιπλέον, η PCR πραγματικού χρόνου επιτρέπει την ανίχνευση των προϊόντων της PCR κατά τα πρώτα στάδια της αντίδρασης. Αυτή η ικανότητά της να μετρά την κινητική της αντίδρασης σε αυτά τα αρχικά στάδια της PCR παρέχει ένα συγκριτικό πλεονέκτημα έναντι της παραδοσιακής PCR που περιγράφηκε νωρίτερα. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η iTaq SYBR Green Supermix με ROX (Applied Biosystems, Austin, TX, USA). Η ROX χρησιμοποιείται ως χρωστική αναφοράς για την εξομάλυνση μικροδιαφορών μεταξύ των διαφορετικών αντιδράσεων. Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων qRT-PCR χρησιμοποιήθηκε ο θερμοκυκλοποιητής Step One Plus (Applied Biosystems, Austin, TX, USA). Για μία τυπική αντίδραση τελικού όγκου 10 μl αναμιγνύονται:

Μήτρα cDNA	. 1 μl
SYBR Select Master Mix (μείγμα πολυμεράσης)	. 5 µl
Εκκινητής 1 (0,5 μΜ)	. 2 µl
Εκκινητής 2 (0,5 μΜ)	. 2 µl

Η αντίδραση ξεκινά με αρχική ενεργοποίηση της πολυμεράσης στους 95°C για 10 λεπτά, ακολουθούν 40 κύκλοι με το στάδιο αποδιάταξης στους 95°C για 45 δευτερόλεπτα και ένα στάδιο υβριδισμού και επιμήκυνσης στου 60°C για 1 λεπτό. Στο τέλος κάθε κύκλου η λαμβάνονται οι τιμές απορρόφησης για τις χρωστικές SYBR Green και ROX. Όταν ολοκληρωθούν οι 40 κύκλοι τα ενισχυμένα τμήματα αποδιατάσσονται σταδιακά με αύξηση της θερμοκρασίας κάθε 30 δευτερόλεπτα κατά 0,5°Cαπό τους 60°C έως τους 95°C και λαμβάνεται η καμπύλη τήξης του καθενός με σκοπό τον έλεγχο της εξειδίκευσης των εκκινητών, όταν ενισχύεται ένα μόνο προϊόν η καμπύλη έχει μια κορυφή. Επιπλέον τα δείγματα αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης 4 % (w/v) για την επιβεβαίωση της παρουσίας μοναδικού προϊόντος και κατά συνέπεια της καταλληλότητας των εκκινητών.

Για την κανονικοποίηση μικρών διαφορών μεταξύ των ποσοτήτων των μητρών του cDNA χρησιμοποιούνται ως εσωτερικοί μάρτυρες τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς, ενώ ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε με τη χρήση του εξειδικευμένου λογισμικού Geneious (Biommaters,Ltd, New Zealand) και το μέγεθος της ενισχυόμενης περιοχής κυμαίνεται από 70 έως 150 ζεύγη βάσεων.

Για τη σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων χρησιμοποιείται μια τροποποιημένη μορφή της μεθόδου σύγκρισης των κύκλων όπου εμφανίζεται το κατώφλι (threshold) της αντίδρασης PCR . Αναλυτικότερα, τα σχετικά επίπεδα των μεταγραφημάτων του υπό μελέτη γονιδίου υπολογίζονται ως ένα ποσοστό των μεταγραφημάτων των γονιδίων αναφοράς (*dnaK* και *gyrA* που κωδικοποιούν για μία τσαπερόνη και την Α υπομονάδα της γυράσης του βακτηρίου αντίστοιχα), και συγκεκριμένα, ως (1+E)^{-ΔCt}, όπου το ΔCt ισούται με Ct^X-Ct^U (με Ct^X να είναι το αποτέλεσμα Ct του γονιδίου υπό δειρεύνηση και Ct^Y ο γεωμετρικός μέσος των Ct των δύο γονιδίων αναφοράς) και Ε είναι η αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR (PCR efficiency). Η Ε για κάθε ένα από τα γονίδια που ενισχύονται υπολογίζεται από το λογισμικό LinRegPCR (Ramakers et al., 2003), το οποίο εφαρμόζει τη μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης στο λογάριθμο των τιμών του φθορισμού που δίνονται ανά κύκλο της αντίδρασης. Όλες οι αντιδράσεις qRT-PCR πραγματοποιούνται σε τουλάχιστον τρεις βιολογικές επαναλήψεις.

2.9 Ανάλυση μεταβολιτών με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS)

2.9.1 Εκχύλιση μεταβολιτών

Η εκχύλιση μεταβολιτών από τα βακτηριακά κύτταρα έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο της κρύας μεθανόλης που προτείνεται ως μία από τις πιο αξιόπιστες μεθόδους εκχύλισης αφού συγκριτικά με άλλες για τα αρνητικά κατά Gramm βακτήρια (Maharjan και Ferenci, 2006).

Τα βακτήρια αναπτύχθηκαν και συλλέχθηκαν κατά την εκθετική τους φάση ανάπτυξης, στη συνέχεια επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 150 mm NaCl και επαναφυγοκεντρήθηκαν για να απομακρυνθούν τα κατεστραμένα κύτταρα και οι εξωκυτάριοι μεταβολίτες, ενώ στη συνέχεια οδηγήθηκαν για λυοφιλίωση.

Τα λυοφιλιωμένα βακτήρια ομογενοποιήθηκαν σε γουδί λειοτριβήσεως παρουσία υγρού αζώτου.

> 10 mg ομογενοποιημένου υλικού μεταφέρονται σε σωλήνα eppendorf που περιέχει 400 μl κρύου διαλύματος εκχύλισης **MEB**. > Ακολουθεί ανάδευση με χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex).

Τα δείγματα τοποθετούνται σε θερμο-αναδευτήρα (Eppendorf, Hamburg, Germany), όπου επωάζονται στους 70°C για 15 λεπτά με ήπια ανάδευση στις 1.200 rpm

> 200 μΙ χλωροφόρμιο προστίθενται στο δείγμα.

Ακολουθεί επώαση υπό συνεχή ανάδευση στις 1.200 rpm για 5 λεπτά στους
 37°C.

> 400 μl ddH₂O προστίθενται στο δείγμα.

Ακολουθεί ανάδευση με μηχανικό αναδευτήρα (vortex) και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

100 μl από το υπερκείμενο μεταφέρονται σε νέο σωλήνα eppendorf.

Τα δείγματα εξατμίζονται με αέριο άζωτο.

2.9.2 Παραγωγοποίηση (derivatization)

Με την παραγωγοποίηση, μια χημική ένωση μετατρέπεται σε ένα νέο προϊόν παρόμοιας χημικής σύστασης με νέες χημικές ιδιότητες. Οι νέες ιδιότητες καθιστούν τα μόρια καταλληλότερα για διαχωρισμό και ποσοτικοποίηση κατά τη χρωματογραφική ανάλυση. Με την τεχνική του GC-MS μπορούν να αναλυθούν μόνο ενώσεις που είναι πτητικές και θερμοσταθερές. Η χημική παραγωγοποίηση των δειγμάτων είχε ως στόχο να αποδώσει στις προς ανάλυση ουσίες αυτές τις δύο ιδιότητες και για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν δύο χειρισμοί:

Α) Προσθήκη της ομάδας CH₃-O-NH₂ (methoxyamine). Με αυτόν το χειρισμό επιτυγχάνεται η σταθεροποίηση των ομάδων καρβονυλίων (=C=O). Παρεμποδίζεται ο *κετο-ενολ* ταυτομερισμός και ο σχηματισμός πολλαπλών ακέτυλ- ή κέτυλ- δομών.

B) Προσθήκη πυριτικής ομάδας (σιλανοποίηση). Κατά την αντίδραση αυτή ένα ενεργό πρωτόνιο αντικαθίσταται από μια αλκυλοσιλομάδα, συνήθως τριμεθυλοσιλυλομάδα. Τα σιλανοπαράγωγα δημιουργούνται από αντικατάσταση

του ενεργού πρωτονίου ομάδων όπως -OH, -COOH, =NH, -NH₂, -SH από την ομάδα – Si(CH₃)₃.

Με τον τρόπο αυτό, μη πτητικές ενώσεις μπορούν να μετασχηματιστούν σε περισσότερο πτητικά προϊόντα, καθώς με την προσθήκη μιας νέας ομάδας μετατρέπονται σε λιγότερο πολικές ενώσεις.

Η παραγωγοποίηση πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία:

> Στα δείγματα προστίθενται 25 μl **MOX**.

Τα δείγματα τοποθετούνται σε θερμο-αναδευτήρα και αναδεύονται στις 1.200 rpm για 90 λεπτά στους 30°C.

> Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 30 sec.

 75 μl MSTFA (N-methyl-N- (trimethylsilyl) trifluoroacetamide) προστίθενται στα δείγματα.

Τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 30 min με ήπια ανάδευση στις 1.200 rpm.

> Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 2 λεπτά στους 20°C.

Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε 100 μl glass micro-inserts (0.1 mm x 15 mm, VWR, Darmstadt, Germany) και τα micro-inserts τοποθετούνται σε 1.5 ml γυάλινα φιαλίδια αέριας χρωματογραφίας (VWR, Darmstadt, Germany) τα οποία με τη βοήθεια ειδικού εργαλείου σφραγίζονται αεροστεγώς με ειδικά καπάκια (VWR, Darmstadt, Germany).

> Τα δείγματα αφήνονται σε ηρεμία για 2 ώρες πριν εγχυθούν στο GC-MS.

Για την ανάλυση των μεταβολιτών χρησημοποιήθηκαν τουλάχιστον 4 βιολογικές επαναλήψεις στην περίπτωση του μάρτυρα και 5 βιολογικές επαναλήψεις στην περίπτωση των ανθεκτικών βακτηρίων.

2.9.3 Αέρια χρωματογραφία-Φασματομετρία μάζας (GC-MS)

Η αεριοχρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με αέριο χρωματογράφο Agilent (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) GC 7890N ο οποίος είναι εξοπλισμένος με τετραπολικό φασματογράφο μάζας ως ανιχνευτή 5975C Inert XL EI/CI (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). 1 μl δείγματος εγχύθηκε στο σύστημα GC-MS με τη βοήθεια αυτόματου δειγματολήπτη (MPS2-XL, GERSTEL, Mülheim, Germany) σε θερμοκρασία 230 °C. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε He με ρυθμό ροής 1.1 ml/min. Η θερμοκρασία του θαλάμου μεταβαλλόταν σύμφωνα με προκαθορισμένο πρόγραμμα: 80 °C για 2 λεπτά και αύξηση στους 325°C με ρυθμό 5°C/min όπου διατηρείται για 10 λεπτά. Ο συνολικός χρόνος διέλευσης ήταν 61 λεπτά. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν HP-5MS 5% Phenyl Methyl Silox, μήκος: 30 m, διάμετρος: 0.25 mm, πάχος: 0.25 μm (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

Για την ανάλυση των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution και Identification System, version 2.71) που παρέχεται από το NIST (National Institute of Stκαιards και Technology, Gaithersburg, MD, USA). Η ταυτοποίηση των ουσιών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τις βιβλιοθήκες FiehnLab και Golm με βάση το χρόνο έκλουσης από τη χρωματογραφική κολώνα και την ομοιότητα των φασμάτων μαζών.

Η επαναληψιμότητα των μεταβολιτών ελέχθηκε για κάθε έναν μεταβολίτη χωριστά και κάποιος μεταβολίτης απορρίπτονταν στην περίπτωση που δεν επαναλαμβανόταν. Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές του εμβαδού της κορυφής του κάθε μεταβολίτη (Xi). Η κανονικοποίηση έγινε ως προς την τιμή που λήφθηκε για τη ριβιτόλη που είχε προστεθεί σε όλα τα δείγματα ως μεταβολίτης αναφοράς, καθώς επίσης και ως προς το φρέσκο βάρος του κάθε δείγματος, σύμφωνα με τον τύπο:

Ni = Xi x Xis⁻¹ x φρέσκο βάρος⁻¹

όπου Ni η σχετική απόκριση του κάθε μεταβολίτη και Xis το εμβαδό της καμπύλης του μεταβολίτη αναφοράς.

2.10 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε εφαρμόζοντας t-test ανά ζεύγος. Όταν τα δείγματα δεν παρουσίαζαν κανονικότητα, εφαρμόζονταν Mann-Whitney Rank Sum test. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη χρήση του προγράμματος SigmaStat 3.5. Όπου σαφώς αναφέρεται, πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης (ONE WAY ANOVA) και έλεγχος δοκιμών μέσω της δοκιμασίας Student t-test και Tukey. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS Statistics 17.0. Τέλος, πραγματοποιήθηκε πολυμεταβλητή ανάλυση με τη μέθοδο των κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) για την ομαδοποίηση των δειγμάτων με χρήση του λγισμικού Past 3. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν για τιμές ανεξάρτητων σετ φυτών που χρησιμοποιήθηκαν ως βιολογικές επαναλήψεις. Η μεταβολομική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε πέντε ανθεκτικές αποικίες που αναπτύχθηκαν ανεξάρτητα χρησιμοποιώντας τα ως βιολογικές επαναλήψεις.
2.11 Σύνθεση διαλυμάτων και θρεπτικών μέσων

2.11.1 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης βακτηρίων

LB

Σε 1 l dH₂O προστίθενται 10 gr Bacto-tryptone, 5 g Yeast extract και 5 g NaCl. Για την παρασκευή τρυβλίων προστίθενται 15 g Agar. Το θρεπτικό διάλυμα αποστειρώνεται και φυλάσσεται στους 4°C. Ανάλογα με την περίπτωση προστίθεται 0.7% άγαρ (αγαρόζη κορυφής, top agar), 1.2% άγαρ (στέρεο υπόστρωμα, bottom agar).

2.11.2 Διαλύματα απομόνωσης DNA

DEB

```
100 mM Tris-HCl pH 8,0 , 50 mM NaCl, 10 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη, 50 mM EDTA
```

RNase A

10 mg RNase A διαλύονται σε 1 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,5 / 15 mM NaCl. Το διάλυμα θερμαίνεται στους 100°C για 15 λεπτά, με σκοπό την αδρανοποίηση τυχόν δράσης DNase, αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου και φυλάσσεται στους -20°C

2.11.3 Διαλύματα απομόνωσης ολικού RNA

3Μ οξικό νατρίο pH 5,2

Σε τελικό όγκο 1 lt ddH₂O διαλύονται 246,09 g άνυδρο οξικό νάτριο. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 5,2 με την προσθήκη πυκνού οξικού οξέος. Το τελικό διάλυμα αποστειρώνεται και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

10T/10E

10 mM Tris-HCl pH 8,3, 10 mM EDTA.

TE

10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA.

2.11.4 Διαλύματα ανάλυσης νουκλεϊνικών οξέων

1X TAE

40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA.

50X TAE

Για την παρασκευή 1 | πυκνού διαλύματος διαλύονται 242 g Tris base, 57,1 ml οξικού οξέος και 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 σε ddH₂O, μέχρι τελικού όγκου 1 l.

Βρωμιούχο αιθίδιο

Το βρωμιούχο αιθίδιο παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 0,5 mg/ml σε ddH₂O και φυλάσσεται στους 4°C. Η τελική συγκέντρωση του βρωμιούχου αιθιδίου στην πηκτή είναι 0,5 μ g/ml.

DLB

0.25% Μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου και 30% γλυκερόλη. 10X LIB

0,66 M Tris-HCl pH 7,6 , 50 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 10 mM ATP. Το πυκνό ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης φυλάσσεται σε μικρές ποσότητες στους -20°C.

2.11.5 Διαλύματα αντιδράσεως PCR

10Χ ρυθμιστικό διάλυμα PCR

100 mM Tris-HCl pH 8,3 , 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0,1% (w/v) gelatin.

2.11.6 Διαλύματα εκχύλισης και παραγωγοποίησης μεταβολιτών

MEB

Για τη παρασκευή 10 ml MEB αναμιγνύονται 9.875 ml μεθανολη και 0.125 ml διάλυμα ριβιτόλης.

Διάλυμα ριβιτόλης

Σε 1 ml ddH₂O διαλύεται 1 mg ριβιτόλη.

ΜΟΧ

Σε 1 ml άνυδρης πυριδίνης διαλύονται 20 mg υδροχλωρική μεθοξυαμίνη.

3

<u>Κεφάλαιο</u>

Αποτελέσματα και Συζήτηση



3 Αποτελέσματα και Συζήτηση

3.1 Γενικά

Η συνεχόμενα αυξανόμενη ανάγκη για παραγωγή από τον αγροτικό τομέα έχει οδηγήσει σε εντατικοποίηση της παραγωγής σε μεγάλο βαθμό. Σαν αποτέλεσμα παρατηρείται χρήση αντιβιοτικών σε μεγάλη κλίμακα. Ο βιολογικός έλεγος παθογόνων βακτηρίων με βακτηριοφάγους έχει προταθεί σαν μια σοβαρή εναλλακτική μέθοδο κατασταλτικά και προληπτικά, ενώ δείχνει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα (Stone, 2002; Sulakvelidze, 2011; Jassim και Limoges, 2014). Η πρόοδος στις τεχνολογίες αλληλούχισης έχει προωθήσει την αλληλούχιση φαγικών γονιδιωμάτων και τη συγκριτική γονιδιωματική τους εφοδιάζοντάς μας πλέον με πληροφορίες εξαιρετικού βιολογικού ενδιαφέροντος, αποκαλύπτοντας βιοχημικά μονοπάτια εκείνων και των ξενιστών τους που μπορούν να έχουν αντίκτυπο στην προσπάθεια βελτίωσης χρήσης τους. Είναι εξαιρετικά σημαντικό να χαρακτηρίζονται γονίδια σχετικά με την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά σε ιούς, αλλά επίσης και να χαρακτηρίζονται πλήρως οι βακτηριοφάγοι και η βιολογία τους (Muniesa et al., 2004; Modi et al., 2013).

Αν και το γονιδίωμα του T4 βακτηριοφάγου έχει αλληλουχηθεί και χαρακτηριστεί αρκετά χρόνια τώρα (Miller et al., 2003b), η ανάγκη για απομόνωση και χαρακτηρισμό νέων T4-like βακτηριοφάγων με διαφορετικούς ξενιστές παραμένει μεγάλο, λόγω κυρίως της καλής λυτικής ικανότητας που διαθέτουν και το μεγάλο εύρος ξενιστών τους (Klumppetal.,2012). Είναι φυσιολογικό οι λυτικοί βακτηριοφάγοι να διαθέτουν γονιδιακά «εργαλεία» για μεταβολικό επαναπρογραμματισμό των ξενιστών τους την ώρα της μόλυνσης, ώστε να καταφέρουν έναν αποδοτικό πολλαπλασιασμό του γονιδιωματος τους πριν το πακετάρισμα στο καψίδιό. Επεκτείνοντας τη γνώση γύρω από γονιδιακά χαρακτηριστικά και κατανοώντας καλύτερα το πολύπλοκο σύστημα και τη βιοχημική αλληλεπίδραση, μπορούμε να καταλήξουμε πιθανά σε μια πιο αποδοτική εφαρμογή των ιών στο μέλλον.

Ταυτόχρονα είναι φυσιολογικό να δημιουργούνται ερωτήματα γύρω από την ανθεκτικότητα των βακτηρίων στους ιούς. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή γίνεται μελέτη διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη μεταφορά σακχάρων και αμινοξέων, καθώς επίσης και του μεταβολισμού των βακτηρίων που έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα σε διαφορετικούς ιούς χρησιμοποιώντας το *Vibrio alginolyticus* σαν οργανισμό μελέτης. Τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσαν να δώσουν μία νέα οπτική γωνία σχετικά με την ανθεκτικότητα των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων έναντι στους βακτηριοφάγους, αλλά και να επεκτείνουν τη γνώση γύρω από τον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό που συμβαίνει και που θα μπορούσε να γίνει αντικείμενο αξιοποίησης από τους ερευνητές.

3.2 Απομόνωση, χαρακτηρισμός και γονιδιωματική ανάλυση βακτηριοφάγων

3.2.1 Απομόνωση και επιλογή βακτηριοφάγων

Κατά τη διάρκεια της παρούσας διδακτορικής διατριβής έγιναν συνολικά πάνω από 200 δειγματοληψίες (Εικόνα 3.1) και εμπλουτισμοί από παράκτιες περιοχές, αλλά και υδατοκαλλιέργειες της Ελλάδας κατά τη διάρκεια ολόκληρου του χρόνου.



Εικόνα 3.1: Σχηματική απεικόνιση των δειγματοληψιών από τον Ελλαδικό χώρο που έγιναν προκειμένου να διερευνηθεί τυχόν παρουσία βακτηριοφάγων. Με κόκκινο απεικονίζονται τα σημεία που δεν βρέθηκε ιός ικανός να μολύνει τα γένη *Vibrio* και με ανοιχτό πράσινο σημεία που υπήρχε επιτυχημένη απομόνωση. Πολλαπλές δειγματοληψίες σε διαφορετική χρονική περίοδο λάβανε χώρα σε ίδια σημεία.

Στη βιοτεχνολογία το μεγαλύτερο «όπλο» που προσπαθούν να εκμεταλλευτούν οι επιστήμονες είναι η βιοποικιλότητα που προσφέρει από μόνη της η φύση. Λαμβάνοντας υπόψιν μία βιοτεχνολογική σκοπιά, οι δειγματοληψίες έλαβαν χώρα σε όσο το δυνατόν κοντινότερες περιβαλλοντικές συνθήκες που να ευνοούν την ανάπτυξη και παρουσία βακτηρίων του γένους *Vibrio*, γεγονός που θα σήμαινε και αυξημένες πιθανότητες παρουσίας βακτηριοφάγων με δυνατότητα να τα μολύνουν. Για αυτόν το λόγο επιλέχτηκαν κατά κύριο λόγο περιοχές είτε κοντινές σε υδατοκαλλιέργειες, ενώ ως επί το πλείστον οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε θερινούς μήνες ή φθινοπωρινούς μήνες, όπου η θερμοκρασία της θάλασσας διατηρεί τα υψηλότερα επίπεδα από όλο τον χρόνο.

Γενικά τα βακτήρια του γένους *Vibrio* ευδοκιμούν σε συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών και τους θερινούς μήνες (Li et al., 2009) με αποτέλεσμα να αυξάνονται και οι πιθανοτήτες εντοπισμού βακτηριοφάγων τους φθινοπωρινούς μήνες από παράκτιες περιοχές. Ταυτόχρονα ένας ακόμα παράγοντας που συμμετέχει στην ανάπτυξη του *V. alginolyticus* είναι τα λιμνάζοντα ύδατα, όπου η θερμοκρασία του νερού είναι ακόμα υψηλότερη και οι πληθυσμοί του γένους *Vibrio* ακόμα μεγαλύτεροι. Για αυτόν τον σκοπό οι δειγματοληψίες έλαβαν χώρα και από κλειστούς κόλπους με στόχο να γίνει πιο αποτελεσματική η απομόνωση βακτηριοφάγων.

Κατά τη διάρκεια της παρούσας διδακτορικής διατριβής απομονώθηκαν βακτηριοφάγοι για τα στελέχη Vibrio alginolyticus V1, Vibrio anguillarum 572 NCIMB, Vibrio anguillarum LGM 4437, Vibrio anguillarum Va23 με διαφορετικές λυτικές ικανότητες για το κάθε στέλεχος (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1: Αριθμός απομονωμένων βακτηριοφάγων με στοιχεία από τις περιοχές που απομονώθηκαν, τον ξενιστή τους, τη λυτική τους ικανότητα (+) και την παρουσία (✓) ή μη (-) κριτηρίων για περαιτέρω μελέτη.

Περιοχή δειγματο-	Αριθμός	Ξενιστές (στελέχη)	Λυτική ικανότητα αντί-	Διαυγείς και	Ευκολος
ληψιών	πιθανών	βακτηριοφάγων	στοιχα	επεναλαμβα-	χειρισμός
	βακτηριο-			νόμενες	
	φάγων			λυτικές πλά-	
				κες αντί-	
				στοιχα	
Περιοχή μικρολίμα-	1	V1		√	✓
νου (Αττική)	-		TTT	·	·
Περιοχή μαρίνας Φλοίσβου (Αττική)	3	V1/V1/VA775	+++/+++/+	√ √ -	√ - -
Περιοχή παραλίας Καλλιθέας (Αττική)	2	V1/VA775	+++/++	√/-	\checkmark
Περιοχή Μαρίνας Αλίμου (Αττική)	2	V1/VA775	+++/+	√/-	\checkmark
Περιοχή παραλίας Γλυφάδας (Αττική)	1	V1	+++	\checkmark	\checkmark
Περιοχή παραλίας Καβουρίου (Αττική)	1	V1	++	-	-
Περιοχή παραλίας Βάρκιζας (Αττική)	2	V1/VA775	+/++	-/-	-/-
Περιοχή Αγ. Νικολάου	1	V1	+	-	-
Περιοχή Λιμανιού Πεύκης	3	V1/VA775/VH4	+++/+++/+++	√ √ √	√/-/-
Περιοχή Αρτάκη	1	V1	+	-	-
Περιοχή Μαραθώνα (Αττική)	1	VA775	+	-	-
Περιοχή παραλίας Ξυλοκάστρου (Κοριν- θία)	1	V1	+	-	-
Περιοχή παραλίας παλουκίων (Σαλαμί- να)	3	V1/LG/572 NCIMB	+++/+++/+++	$\checkmark \checkmark \checkmark$	√ √ -
Περιοχή Ασπροπύρ- γου Α	4	V1/VA775/LG/572 NCIMB	+/+/++++/+	-/-/√/-	- - √ -
Περιοχή Ασπροπύρ- γου Β	4	V1/VA775/LG/572 NCIMB	++/+/+++/+++	√ - √ √	- - √ √
Περιοχή παραλίας Αγ. Κοσμά	3	V1/VA775/572 NCIMB	+/+/+	-/-/-	-/-/-
Παράκτια περιοχή Πύργου (Ηλία)	2	V1/572 NCIMB	+/++	-/-	-/-

Στη συνέχεια δημιουργήθηκε ένας κατάλογος ιδιοτήτων που θα έπρεπε να πληροί κάποιος βακτηριοφάγος ώστε να αναλυθεί περισσότερο. Τα σημαντικά σημεία που θα έπρεπε να διαθέτει είναι τα ακόλουθα:

Να σχηματίζει διαυγείς και επαναλαμβανόμενες λυτικές πλάκες.

Να χειρίζεται εύκολα και γρήγορα στο εργαστήριο έχοντας συνεπή αύξηση τίτλου σε συγκαλλιέργεια με τον κύριο ξενιστή τους.

Να υπάρχει όσο το δυνατόν μεγαλύτερη διαφορά σε σχέση με άλλους βακτηριοφάγους τόσο σε μέγεθος και σχήμα λυτικών πλακών, εύρος ξενιστών όσο και φυλογενετικές διαφορές που φαίνονται μετά από παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Να έχει ανοχή στο χλωροφόρμιο, καθώς αυτό σημαίνει ότι το καψίδιό τους είναι αποκλειστικά πρωτεϊνικής φύσης (Jun et al., 1978).

Οι περιπτώσεις βακτηριοφάγων που τηρούσαν τα παραπάνω κριτήρια ήταν τουλάχιστον **δέκα**. Αφού καθαρίστηκαν με συνεχείς επιστρώσεις τριβλύων και διαλογή μίας αποικίας κάθε φορά με σκοπό ο τελικός πληθυσμός να έχει προκύψει από μονοκλωνικό ομοιογενή βακτηριοφάγο, αυξήθηκε ο τίτλος τους και αποθηκεύτηκαν στους 4[°] C. **Τρεις** από αυτούς τους βακτηριοφάγους με βάση τα παρακάτω κρίτηρια οδηγήθηκαν για λεπτομερή χαρακτηρισμό των βιολογικών τους χαρακτηριστικών και αλληλούχιση και χαρτογράφηση του γονιδιώματός τους:

- Είχαν επαναλαμβανόμενη υψηλή λυτική ικανότητα και συνέπεια αύξησης
 τίτλου σε συγκαλιέργεια με τον ξενιστή.
- Είχαν διαφορετικό μέγεθος και σχήμα λυτικών πλακών.
- Είχαν απομονωθεί από διαφορετική γεωγραφική περιοχή μειώνοντας τις πιθανότητες να είναι ο ίδιος βακτηριοφάγος.
- > Είχαν τον ίδιο ξενιστή (Vibrio alginolyticus στέλεχος V1).
- > Είχαν ανοχή στην παρουσία χλωροφορμίου.

Ακόμη για αλληλούχιση και ανάλυση του γονιδιώματός τους οδηγήθηκαν και **δύο** βακτηριοφάγοι οι οποίοι είχαν χαρακτηριστεί βιολογικά στο παρελθόν και είχαν εξε-

ταστεί ως σημαντικοί υποψήφιοι για βιολογικό έλεγχο του παθογόνου *V. alginolyticus* σε *in vivo* καλλιέργειες ζωντανής τροφής Αρτεμισίνης (Kalatzis et al., 2016).

3.2.2 Γονιδιωματική ανάλυση βακτηριοφάγων

3.2.2.1 Ο χαρακτηρισμός φαγικών γονιδιωμάτων είναι υψηλής σημαντικότητας

Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι οι βακτηριοφάγοι μπορούν να αποτελέσουν ένα σύγχρονο κατασταλτικό και προφυλακτικό μέσο για την καταπολέμηση των βακτηριακών λοιμώξεων, συμπεριλαμβανομένων και των υδατοκαλλιεργειών (Stone, 2002, Sulakvelidze, 2011, Jasmin και Limoges, 2014). Σε συνέργεια με την πρόοδο στις τεχνολογίες γονιδιωματικής αλληλούχισης, οι απομονωμένοι βακτηριοφάγοι, μπορούν να μας δώσουν ένα μεγάλο αριθμό πληροφοριών για την πολύπλοκη βιολόγια τους, αλλά και την αλληλεπίδραση τους με τον ξενιστή. Ακόμη ο γονιδιωματικός χαρακτηρισμός και η λεπτομερής τους ανάλυση θα μπορούσε να παίξει σημαντικό ρόλο προς τη φυσιολογία τους και την ασφάλειά τους σαν θεραπευτικό μέσο, αφού είναι υψηλής σημαντικότητας να αποφεύγεται η χρήση βακτηριοφάγων που χαρακτηρίζονται ως ήπιοι ή λυτικοί που φέρουν ενδοτοξίνες ή γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά για βιολογικό έλεγχο παθογόνων βακτηρίων (Muniesa et al., 2004, Modi et al., 2013).

Αν και έχουν περάσει αρκετά χρόνια από την «αποκρυπτογράφηση» του γονιδιώματος του βακτηριοφάγου T4 (Miller et al., 2003b) η ανάγκη για περισσότερες απομονώσεις και πλήρη χαρακτηρισμούς βακτηριοφάγων, ειδικά με μεγάλο εύρος ξενιστών, δεν παύει να είναι υψηλής προτεραιότητας και καινούρια γονιδιώματα προστίθενται συνεχώς στην παγκόσμια τράπεζα γονιδιωμάτων (Klumpp et al., 2012). Αφού οι βακτηριοφάγοι χαρακτηρίστηκαν μερικώς καταγράφοντας τα βιολογικά και φυλογενετικά τους χαρακτηριστικά, έγινε αλληλούχιση των γονιδιωμάτων τους με σκοπό την συγκριτική γονιδιωματική τους ανάλυση. Το πρώτο βήμα για να γίνει μια τέτοια έρευνα ήταν η απομόνωση του DNA των βακτηριοφάγων. Το DNA που απομονώθηκε ήταν πολύ υψηλής ποιότητας και μηδαμινά κατακερματισμένο, γεγονός που διαπιστώθηκε με μετρήσεις σε σπεκτοφωτόμετο και σε γέλη αγαρόζης (1.5 %) (Εικόνα 3.2). Ταυτόχρονα κατά τη διάρκεια της απομόνωσης και πριν την λύση των καψιδίων, πραγματοποιήθηκε PCR με εκκινητές της 16s rRNA ριβοσωμικής ομάδας με σκοπό να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή όχι DNA του βακτηριακού ξενιστή, που θα μπορούσε να επιμολύνει τις αλληλουχίσεις των γονιδιωμάτων.



Εικόνα 3.2: Ποιοτική απεικόνιση στην πηκτή αγαρόζης 1.5% του DNA δύο γονιδιωμάτων βακτηριοφάγων.. Διακρίνεται η μηδαμινή κατακερμάτιση του DNA σε 500 ng DNA.





Στη συνέχεια έγινε η κατασκευή των γονιδιωματικών βιβλιοθηκών και η αλληλούχιση. Τα αρχικά αποτελέσματα αφορούσαν τις αλληλουχίσεις χωρίς ποιοτικό έλεγχο και παρουσιάζονται στον πίνακα 3.6 και ενδεικτικά στο διάγραμμα 3.1 για τον βακτηριοφάγο *φ*Grn1, που όμως αντιπροσωπεύει και τους υπόλοιπους. Πίνακας 3.2:Συγκεντρωτική ανασκόπηση των αρχικών αποτελεσμάτων της αλληλούχισης για τους πέντε βακτηριοφάγους. Διακρίνεται ο αριθμός των αλληλουχιών 125 βάσεων που παρήχθησαν, το σύνολο των βάσεων που αλληλουχήθηκαν, ο ποσοστιαίος δείκτης Q20 που αφορά την πιθανότητα που υπάρχει να έχει γίνει σωστή η αναγνώριση της βάσης και το περιεχόμενο των αλληλουχιών σε GC (%).

#	Βακτηριοφάγος	Αλληλουχημέ- νο μέγεθος (Read length)	Αριθμός Αλ- ληλουχιών	Σύνολο βάσεων	Q20 (%)	GC(%)
1	øGrn1	125	1087184	135898000	93.33; 85.85	41.28
2	φSt2	125	1087252	135906500	93.62; 85.97	41.25
3	Aphrodite1	125	1083828	135478500	91.59; 84.07	43.93
4	Ares1	125	1082842	135355250	91.38; 82.76	44.23
5	Athena1	125	1083716	135464500	91.89; 82.80	44.35

Διακρίνεται ο μεγάλος αριθμός αλληλουχιών που παρήχθησαν (τουλάχιστον 500 φορές του πραγματικού μεγέθους του κάθε γονιδιώματος) και η υψηλή ποιότητα του αλληλούχισης, με μια μικρή πτώση της ποιότητας στην αρχή και στο τέλος κάθε 125 βάσεων, δηλαδή στην αρχή και στο τέλος κάθε αλληλουχίας των βιβλιοθηκών.



Διάγραμμα 3.1: Ποιοτική απεικόνιση των αποτελεσμάτων μετά την αλληλούχιση για τον βακτηριοφάγο φGrn1. Παρόμοιο αποτελέσματα ισχύουν και για τους υπόλοιπους 4 βακτηριοφάγους. Διακρίνεται η πτώση της ποιότητας αλληλούχισης στην αρχή και στη μέση των διαγραμμάτων, που αντιπροσωπεύει την αρχή και το τέλος κάθε βιβλιοθήκης και την έναρξη αλληλούχισης της επόμενης.

Στη συνέχεια τα δεδομένα λήφθηκαν, αφού είχε γίνει αποκοπή των εκκινητών και των βοηθητικών αλληλουχιών (adapters) γύρω από τις περιοχές αλληλούχισης που μας ενδιέφεραν, ακολούθησε η βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 3.4: Εικόνα μετά την αλληλούχιση και πριν την αποκοπή των χαμηλής ποιότητας βάσεων. Διακρίνεται το μέγεθος των κομματιών που έχουν αλληλουχιθεί (125 bp). Ανάλογα με την ένταση του μπλε χρώματος αντιστοιχεί και η ποιότητα της αλληλούχισης των βάσεων.

Αρχικά έλαβε χώρα ποιοτικός έλεγχος (trimming) των ακολουθιών με όριο σφάλματος 0.05. Αν για κάποια βάση το χρωματογραφικό «αποτύπωμά» της δεν ξεπερνούσε τον βαθμό εμπιστοσύνης 95%, απαλειφόταν και δεν λαμβανόταν υπόψη για την μετέπειτα ανασύσταση των γονιδιωμάτων. Συνήθως χαμηλής ποιότητας βάσεις υπάρχουν στην αρχή και στο τέλος των αλληλουχιών. Η βιβλιοθήκη που χρησιμοποιήθηκε για την αλληλούχιση των γονιδιωμάτων ήταν η PE125 (Pair-End 125 bp), με εκτιμώμενο μέγεθος ένθεσης 800 bp, που σημαίνει ότι κάθε γονιδιωματική βιβλιοθήκη αλληλουχήθηκε με κατεύθυνση και από την 5' \rightarrow 3' περιοχή και από την 3' \rightarrow 5' περιοχή. Για αυτό η λογική συνέχεια ήταν να ενωθούν οι αναγνωσμένες αλληλουχίες και να σημανθούν ότι πρόκειται για την ίδια αλληλουχία αναγνωσμένη και από τους δύο προσανατολισμούς (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5: Η μέθοδος ανάγνωσης των αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκε και στη συνέχεια ο τρόπος της ευθυγράμμισης των αλληλουχιών κατά τη διάρκεια της ανασύστασης των γονιδιωμάτων.

Το πιο σημαντικό βήμα αφορούσε την *de novo* ανασύσταση των γονιδιωμάτων με το λογισμικό Velvet. Ελέγχτηκαν πολλοί διαφορετικοί παράμετροι ανασύστασης, λαμβάνοντας υπόψη κυρίως την μεταβλητή k-mer, και επιλέχθηκαν τα ποιοτικά καλύτερα αλληλουχημένα κομμάτια (contigs) που ήταν μοναδιαία τμήματα (single contigs) για κάθε βακτηριοφαγικό γονιδίωμα. Η πρόβλεψη των πιθανών γονιδίων έγινε κυρίως με τον αλγόριθμο Glimmer 3 που προβλέπει προκαρυωτικά ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια (Open Reading Frames, ORFs), ενώ με αυτόν τον τρόπο εντοπίστηκαν και πιθανά γονίδια που κωδικοποιούν για μεταφορικά RNA (tRNA) στα γονιδιώματα. Τα γονίδια προβλέφθηκαν και επιβεβαιώθηκαν προτού επισημανθούν πάνω στα γονιδιώματα, ενώ αυτή η εργασία μας αποκάλυψε και με μεγαλύτερη ακρίβεια την φυλογένεια του κάθε βακτηριοφάγου και σε ποιον κλάδο ανήκει. Τέλος προετοιμάστηκαν κατάλληλα για κατάθεση στην παγκόσμια τράπεζα γονιδιωμάτων, όπου ελέγχθηκαν και έλαβαν αριθμό ένταξης (Accession Number).

Για να γίνει αξιολόγηση των συναρμολογημένων γονιδιωμάτων στην παρούσα διδακτορική διατριβή μετά την αλληλούχιση και για να φανεί αν η *in silico* πρόβλεψη των γονιδίων έχει γίνει με γνώμονα την κύρια μεταφραζόμενη αλυσίδα του DNA τους δημιουργήθηκαν σωρευτικά διαγράμματα GC (Εικόνες 3.19, 3.32, 3.35, 3.38) που εμφανίζουν το ποσοστό GC να συσσωρεύεται από το μικρότερο ποσοστό σε μεγαλύτερο. Γενικά το ποσοστό GC των φαγικών γονιδιωμάτων που μολύνουν βακτήρια του είδους *Staphylococcus aureus* (Kwan et al., 2005) έχει συνδεθεί στο παρελθόν και με το ποσοστό GC του ξενιστή τους, αν και έχουν εκφραστεί και διαφορετικές απόψεις πιο πρόσφατα (Wittmann et al., 2014). Τα παρόντα σωρευτικά GC διαγράμματα των γονιδιωμάτων βοήθησαν και στην ανίχνευση των σημείων της έναρξης και της λήξης της αντιγραφής όπως έχει περιγραφεί και στο παρελθόν (Grigoriev, 1998, 1999; Uchiyamaetal., 2008; Jin et al., 2014). Όλα τα σωρευτικά διαγράμματα GC που παρουσιάζονται συμφωνούν με την κατεύθυνση της μεταγραφής των περισσοτέρων κωδικών περιοχών. Η συσσώρευση πουρινών στις γονιδιωματικές αλληλουχίες είναι άμεσα συσχετισμένη με την κύρια κωδική αλυσίδα της μεταγραφής (Freeman, 1998).

3.2.2.2 Οι βακτηριοφάγοι φGrn1 και φSt2 ως αντιμικροβιακό μέσο στις υδατοκαλλιέργειες

Έχοντας μεγάλο μέγεθος και ένα εντυπωσιακό εύρος ξενιστών (αντίστοιχο έχει παρατηρηθεί με τους βακτηριοφάγους KVP40 (Miller et al., 2003a) και φ pp2 (Lin and Lin, 2012)) και χωρίς να έχουν εξεταστεί πολλά είδη Vibrio ακόμα, οι βακτηριοφάγοι φGrn1 και φSt2 έχουν ήδη μελετηθεί περαιτέρω σαν υποψήφιοι για χρήση σε in vivo καλλιέργειες Artemia, που αποτελεί ζωντανή τροφή στις ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες. Γενικά οι ζωντανές τροφές που δίνονται στα ψάρια, μπορούν να αποτελέσουν δίοδο παθογόνων βακτηρίων, αφού έχουν τη δυνατότητα να βιοσυσσωρεύουν μικροοργανισμούς κατά την ανάπτυξή τους (Goulden et al., 2013). Από τις φωτογραφίες της μορφολογίας των βακτηριοφάγων φάνηκε ότι ανήκουν στην οικογένεια Myoviridae και παρά τις ομοιότητές τους, έχουν διαφορετικό μέγεθος κεφαλής. Το εμφανές νηματοειδές εξόγκωμα που φέρουν στην κεφαλή είναι αρκετά πιθανό να χρησιμοποιείται για διευκόλυνση κατά την διαδικασία της πρόσδεση στον ξενιστή, όπως έχει παρατηρηθεί και σε βακτηριοφάγους του είδους Caulobacter crescentus (Guerrero-Ferreira et al., 2011) δίνοντας τους πιθανά ένα επιπλέον πλεονέκτημα σε σχέση με άλλους βακτηριοφάγους. Κατά την in vivo εξέταση των βακτηριοφάγων σε ζωντανές τροφές Artemia (Kaltzis et al., 2016).



Εικόνα 3.6: Ο πληθυσμός του *V. alginolyticus* με και χωρίς την εφαρμογή των βακτηριοφάγων φGrn1 και φSt2 σε ζωντανές καλλιέργειες Artemia στις χρονικές στιγμές Ο ώρες και 4 ώρες (±SE) μετά την μόλυνση με V. alginolyticus. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στον μάρτυρα και την εφαρμογή των ιών (Kalatzis et al., 2016).

Τα αποτελέσματα αυτά ενίσχυσαν την ανάγκη για περαιτέρω «αποκρυπτογράφηση» των γονιδιωμάτων των δύο βακτηριοφάγων και την διαλεύκανση των μοριακών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της μόλυνσης στο βακτήριο-στόχο.

3.2.3 Ο βακτηριοφάγος φGrn1

Ο πρώτος βακτηριοφάγος του οποίου μελετήθηκε το γονιδίωμα και παρουσιάζεται στην παρούσα διδακτορική διατριβή απομονώθηκε στην περιοχή Γούρνες Ηρακλείου Κρήτης από ερευνητές του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.) και από την παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο φάνηκε ότι μορφολογικά ανήκει στην οικογένεια *Myoviridae* με μία μακριά κεφαλή και μια συσπασσώμενη ουρά, ενώ φέρει και αυτός ένα νηματοειδές εργαλείο προσάρτησης στο πάνω μέρος της κεφαλής (Εικόνα 3.7).



Εικόνα 3.7: Ηλεκτρονική μικροσκοπία του βακτηριοφάγου *φ*Grn1. Διακρίνεται η μεγάλη σε μέγεθος κεφαλής, η συσπασώμμενη ουρά, ενώ με άσπρο βέλος ένα νηματοειδές εργαλείο προσάρτησης στον ξενιστή (Kalatzis et al., 2016).

Έχει πλάτος κεφαλής 75 nm και μήκος 138 nm, ενώ η ούρα έχει μήκος 134 nm και πλάτος 20 nm. Χρειάζεται 25 min για να προσκολληθούν το 95 % των ιοσωματιδίων στον ξενιστή, έχει λανθάνουσα περίοδο 30 min και μέγεθος έκρηξης τους ~44 φά-γους/βακτήριο. Έχει εύρος ξενιστών ικανό να λύσει διαφορετικά στελέχει του *Vibrio alginolyticus*, αλλά και διαφορετικά είδη *Vibrio*, όπως τα *Vibrio harveyi* και *Vibrio parahaemolyticus*. Μπορεί με αναλογία ιού: ξενιστή (MOI) 100:1 MOI να καταστείλει την βακτηριακή ανάπτυξη για πάνω από 16 ώρες. Η πέψη του γονιδιώματος με περιοριστικές ενδονουκλεάσες έδειξε ότι πρόκειται για βακτηριοφάγο που πιθανά μεθυλιώνει το γονιδίωμά του ή δεν έχει τις θέσεις αναγνώρισης για αυτά, αφού δε φαίνεται να δρουν αρκετές από αυτές, όπως η περιοριστική ενδονουκλεάση Ncol (Εικόνα 3.9), αλλά και οι Haell, HaellI και BamHI (Kalatzis et al., 2016). Τέλος φάνηκε και το μοναδικό μοτίβο πέψης με άλλα ένζυμα που έδρασαν, γεγονός που δείχνει ότι δεν πρόκειται για κάποιον ίδιο βακτηριοφάγο με άλλους που αναλύθηκαν.



Εικόνα 3.8: Ανάλυση πηκτής αγαρόζης περιοριστικών ενδονουκλεασών του γονιδιώματος τουβακτηριοφάγου φGrn1 με 2 επαναλήψεις για κάθε "πέψη". Στις θέσεις 1, 2 το γονιδιώμα είναι μετά από "πέψη" με το ένζυμο Ncol, στις θέσεις 3, 4 έχει γίνει "πέψη" με το ένζυμο Kpnl και τέλος στις θέσεις 5, 6 έχει γίνει "πέψη" με το ένζυμο Scal.

3.2.4 Ο βακτηριοφάγος φSt2

Ο δεύτερος βακτηριοφάγος του οποίου το γονιδίωμα αναλύεται στην παρούσα διδακτορική διατριβή, απομονώθηκε από ερευνητές του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.) μετά από εμπλουτισμούς σε δείγματα από την θαλάσσια περιοχή του Ηρακλείου Κρήτης. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM) αποκάλυψε ότι μορφολογικά είναι πολύ κοντά με τον φGrn1 και πρόκειται για έναν βακτηριοφάγο της οικογένειας *Myoviridae* με μακριά κεφαλή και συσπασώμενη ουρά ενώ διακρίνεται και σε αυτόν ένα οργανίδιο στην κεφαλή που πιθανά είναι ένα νηματοειδούς φύσης προσάρτημα (Εικόνα 3.9), ικανό να βοηθάει τον βακτηριοφάγο να προσδένεται σε οργανίδια του ξενιστή αυξάνοντας τις πιθανότητες να έρθει σε επαφή με αυτόν και να ξεκινήσει η μόλυνση και ο πολλαπλασιασμός του.



Εικόνα 3.9: Ηλεκτρονική μικροσκοπία του βακτηριοφάγου φSt2. Διακρίνεται η μεγάλη σε μέγεθος κεφαλής, η συσπασώμμενη ουρά, ενώ με άσπρο βέλος ένα νηματοειδές εργαλείο προσάρτησης στον ξενιστή (Kalatzis et al., 2015).

Η κεφαλή του βακτηριοφάγου είναι περίπου 81 nm σε πλάτος και 151 nm σε μήκος, ενώ η ουρά του περίπου 132 nm. Το μεγάλο μέγεθος κεφαλής από την πρώτη στιγμή ήταν ένδειξη και ενός μεγάλου σε μέγεθος γονιδιώματος (Cui et al., 2014). το εύρος ξενιστών που πραγματοποιήθηκε απέδειξε ένα αρκετά μεγάλο εύρος τόσο σε επίπεδο διαφορετικών στελεχών του Vibrio alginolyticus, όσο και μεταξύ διαφορετικών ειδών Vibrio, όπως τα Vibrio harveyi και Vibrio parahaemolyticus. Η μελέτη των βιολογικών χαρακτηριστικών του έδειξε ότι πρόκειται για έναν βακτηριοφάγο με το 95 % των φάγων να έχουν προσκολληθεί στον ξενιστή σε μόλις 15 λεπτά, με λανθάνουσα περίοδο τα 30 min και μέγεθος έκρηξης ~97 βακτηριοφάγους/κύτταρο. Η in vitro λυτική ικανότητά του έδειξε ότι μπορεί με αναλογία ιού: ξενιστή (MOI) 100:1 μπορεί να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό του ξενιστή του για περισσότερο από 16 ώρες. Όπως και στην περίπτωση του φGrn1 πολλά ένζυμα περιορίσμου έδειξαν να μην δρουν, ενώ ταυτόχρονα φάνηκε και διαφορετικό μοτίβο με τον φGrn1, αφού φαίνεται ότι σε αυτήν την περίπτωση η περιοριστική ενδονουκλεάση Kpnl δεν δρα σε αντίθεση με το γονιδίωμα του φGrn1 (Εικόνα 3.10).



Εικόνα 3.10: Ανάλυση πηκτής αγαρόζης περιοριστικών ενδονουκλεασών του γονιδιώματος του βακτηριοφάγου φSt2 με 2 επαναλήψεις για κάθε πέψη. Στις θέσεις 1, 2 το γονιδίωμαα είναι μετά από πέψη με το ένζυμο Ncol, στις θέσεις 3, 4 έχει γίνει πέψη με το ένζυμο Kpnl και τέλος στις θέσεις 5, 6 έχει γίνει "πέψη" με το ένζυμο Scal.

3.2.5 Συγκριτική γονιδιωματική ανάλυση των βακτηριοφάγων φGrn1 και φSt2

3.2.5.1 Ανάλυση των γονιδιωμάτων των φGrn1 και φSt2, in silico πρόβλεψη των γονιδίων και φυλογένεια

Η συγκριτική γονιδιωματική μελέτη των δύο συγκεκριμένων βακτηριοφάγων πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά, αφού η φυλογένεια και ο κλάδος τους, όπως θα δούμε παρακάτω, είναι αρκετά ετερογενείς με σχέση τους υπόλοιπους βακτηριοφάγους της παρούσας διδακτορικής διατριβής, αλλά ταυτόχρονα και πολύ κοινή μεταξύ τους. Τα γονιδιώματα των δύο βακτηριοφάγων καθορίστηκαν στις 248605 bp για τον *φ*Grn1 με περιεχόμενο GC 38.8% και 250485 bp για τον *φ*St2 με περιεχόμενο GC 42.6%. Το γονιδιώματα του *φ*St2 είναι το μεγαλύτερο σε μέγεθος γονιδίωμα Vibrioφάγου που έχει βρεθεί ως σήμερα σύμφωνα με την Genbank (Φεβρουάσριος, 2018). Με στόχο να εντοπιστούν τα σημεία έναρξης και λήξης της μεταγραφής των γονιδιωμάτων κατασκευάστηκαν σωρρευτικά διαγράμματα GC (Εικόνα 3.11). Για τον βακτηριοφάγο *φ*Grn1 φαίνεται ότι το σημείο έναρξης είναι στις 51089 βάσεις και λήξης στις 24761, ενώ για τον *φ*St2 αντίστοιχο στην βάση 1 και στις 242751 βάσεις.



Εικόνα 3.11: Σωρευτικά διαγράμματα GC που δείχνουν κάποια από τα πιθανά σημεία έναρξης και λήξης της μεταγραφής για κάθε γονιδίωμα, που εξαρτώνται από το ποσοστό GC.

Συνολικά επισημάνθηκαν 410 γονίδια για τον φ Grn1 και 412 γονίδια για τον φ St2 (Εικόνες 3.12, 3.13, Πίνακας 3.4, Πίνακας 3.5). Τα γονίδια που εντοπίστηκαν και επισημάνθηκαν, χαρακτηρίστηκαν και ομαδοποιήθηκαν ανάλογα με την λειτουργία τους. Χρησιμοποιώντας την βιοπληροφορική πλατφόρμα Coregene, εντοπίστηκαν 77 ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια κοινά ανάμεσα στους συγκεκριμένους βακτηριοφάγους, τον Τ4 βακτηριοφάγο μοντέλο και τους υπόλοιπους Vibrio φάγους του κλάδου "schizoT4like". Όταν όμως συμπεριλήφθηκαν στην ίδια ανάλυση μόνο οι βακτηριοφάγοι "schizoT4like", αυτός ο αριθμός αυξήθηκε στις 271 πρωτεΐνες από τις συνολικά 381 του KVP40, βακτηριοφάγου μοντέλο για τους "schizoT4like". Ταυτόχρονα έγινε εντοπισμός και επιβεβαίωση των tRNA των δύο βακτηριοφάγων, τα οποία και βρέθηκαν σε συστάδες σε μία μόνο γονιδιακή περιοχή για τον καθένα. Πιο συγκεκριμένα για τον βακτηριοφάγο φGrn1, τα 28 tRNA, βρίσκονται σε μια περιοχή περίπου 10 kbp (37088 έως 46099) και τα 27, για τον φSt2, σε μια περιοχή περίπου 8 kbp. Και οι δύο περιέχουν δύο ψευδο-tRNA με αντικωδικόνια GCA και TGC. 10 και 7 υποθετικές πρωτεΐνες (hypothetical proteins) είναι σκορπισμένες ανάμεσα στα tRNA αντίστοιχα.

1	1,000	2,000	3,000	4,000	5,000	6,000	7,000	8,000	9,000	10,000	11,000	12,000	13,000	14,000	15,000	16,000
\rightarrow —	\rightarrow			$\rightarrow \rightarrow \frown$		\rightarrow		→ —	•⇒	\rightarrow	,⇒,	<u> </u>		⇒	\Rightarrow	
17,000	18,000	19,000	20,000	21,000	22,000	23,000	24,000	25,000	26,00	27,000	28,000	29,000	30,000	31,000	32,000	33,000
		1 1						Î							Ì	
3	4,000	35,000	36,000 3	7,000	38,000 39	,000 40	,000 41	.000	42,000	43,000	44,000	45,000	46,000	47,000	48,000	49,000
		\rightarrow —	\rightarrow	- 4 - 4	444 🚄 44 - 4	••	44.4	4 4 4 4	144444		÷ –	4444	• •			
50,000	51,000	52,000	53,000	54,000	55,000	56,000	57,000	58,000	59,000	60,000	61,000	62,000	63,000	64,000	65,000	66,000
			_ _													3
67.0	00 68	,000 69,	000 70,0	00 71	,000 72,00	0 73,00	0 74,00	0 7	5,000 7	6,000 77	7,000 78	.000 79.	.000 80	.000 81	1,000 82	2,000
-	\rightarrow —	\rightarrow						⇒ -		\rightarrow	\rightarrow	-				
3,000	84,000	85,000	86,000	87,000	88,000	89,000	90,000	91,000	92,000	93,000	94,000	95,000	96,000	97,000	98,000	99,000
2			\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow		\rightarrow –	$\rightarrow \leftarrow$					<u> </u>			
100,000	101,00	102,00	0 103,000	0 104,00	105,000	106,000	107,000	108,0	000 109,0	000 110,0	111,00	112,00	113,0	00 114,0	00 115,0	00 116,000
	<u>_</u> ← – <u>→</u>															
	117,000	118,000	119,000	120,000	121,000 1	22,000 1	123,000 1	24,000	125,000	126,000	127,000	128,000	129,000	130,000	131,000	132,000
	\Longrightarrow		→ —→												\rightarrow	2
133,000	134,000	135,000	136,000	137,000	138,000	139,000	140,000	141,000	142,000	143,000	144,000	145,000	148,000	147,000	148,000	149,000
		⇒`		è =è		\rightarrow					⇒ ⇒					
150	,000 1	51,000 15	2,000 15	3,000 1	54,000 155.	,000 156	,000 157,	000	158,000	159,000	160,000 1	61,000 1	62,000 1	63,000 1	164,000	65,000
				••	\rightarrow	\rightarrow					à			<u> </u>		
166,000	167,000	168,000	169,000	170,000	171,000	172,000	173,000	174,000	175,000	176,000	177,000	178,000	179,000	180,000	181,000	182,000
183,0	00 184.	000 185,0	186,0	00 187	000 188,00	0 189,00	0 190,000) 19	1,000 193	2,000 193	1,000 194,	000 195.	000 196	.000 197	,000 198	,000
<u>_</u>	→	<u></u>								\rightarrow	\rightarrow		•			
99,000	200,000	201,000	202,000	203,000	204,000	205,000	208,000	207,000	208,000	209,000	210,000	211,000	212,000	213,000	214,000	215,000
<u>, →</u> —					\rightarrow											
216,000	217,000	218,000	219,000	220,000	221,000	222,000	223,000	224,00	225,0	226,00	227,000	228,000	229,00	0 230,00	0 231,00	0 232,000
		è =						·					· ·	`_		
2	33,000	234,000	235,000 2	36,000	237,000 23	38,000 23	39,000 24	0,000	241,000	242,000	243,000	244,000	245,000	246,000	247,000	248,000 248,605
															<u></u>	

Εικόνα 3.12: Γονιδιακός χάρτης του βακτηριοφάγου *φ*Grn1. Τα βέλη αναπαριστούν τις κωδικές περιοχές με τον αντίστοιχο προσανατολισμό. Χρώματα: Σκούρο πράσινο → Αντιγραφή και πακετάρισμα του DNA, Ανοιχτό πράσινο→ Μεταβολισμός RNA, Ανοιχτό μπλε→ Δομικά στοιχεία ουράς του ιού, λυσοζύμη βάσης και τριχοϊδή πόδια του, Κόκκινο 🛙 Καψιδιακές πρωτεΐνες, Σκούρο μπλε → NAD+ και μεταβολισμός νουκλεοτιδίων, Ροζ→Sir2/cobB δεακετυλάση, Καφέ → Άλλα, Γκρι→ Υποθετικές πρωτεΐνες, Φούξια→ επιβεβαιωμένα tRNA, Μαύρο→ Pseudo-tRNA.

Όπως προαναφέρθηκε, όταν αξιολογούμε βακτηριοφάγους για πιθανούς υποψήφιους για φαγοθεραπεία είναι πολύ σημαντικό να αναλύουμε προσεχτικά τα γονιδιώματά τους για πιθανά γονίδια που είναι γνωστό ότι μπορούν να συμβαλλουν σε πιθανή ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά αν μεταδοθούν κατά την αλληλεπιδράση στα βακτήρια ξενιστές (Balcazar, 2014), ειδικά όταν μπορούν να συσχετιστούν και με μεταθετά στοιχεία, όπως οι ΑΕ, στην περίπτωση των φGrn1 και φSt2. Η αυτόματη in silico πρόβλεψη των γονιδίων στα γονιδιώματα των δύο ιών, επεσήμανε ένα ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο για κάθε ιό που επισημάνθηκε αυτόματα σαν "beta-lactamase domain protein" (ALP47273 για φGrn1 και ALP47653 για φSt2). Πολύ ενδιαφέρον είναι ότι το ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο υπάρχει και στους υπόλοιπου "schizoT4like" βακτηριοφάγους (για τον KVP40 είναι η πρωτεΐνη με αριθμό NP_899337.1). Παρόλα αυτά η πρωτεϊνική ανάλυση και η ευθυγράμμιση που έγινε κατέδειξαν ότι πρόκειται για μια πρωτεΐνη με πολύ χαμηλό βαθμό συγγένειας με οποιαδήποτε γνωστή πρωτεΐνη β-λακταμάσης. Ακόμη περισσότερο απουσιάζουν και τα συντηρημένα μοτίβα αυτών των πρωτεϊνών και πιο συγκεκριμένα το μεταλλο-β-λακταμάσης (metallobeta-lactamase) μοτίβο, που είναι το πλέον σημαντικό για επιτυχή ενεργότητα και κατάλυση της εκφραζόμενης πρωτεΐνης (Moali et al., 2003), ενώ ακόμα απουσίαζε και οποιοδήποτε ενεργό κέντρο. Τέλος η ομοιότητα με την πολύ καλά χαρακτηρισμένη β-λακταμάση των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων του είδους Stenotrophomonas smaltophilia (EC: 3.5.2.6) ήταν μικρότερη του 1.4 %. Επομένως, αυτή η ανάλυση δεν μπορεί να υποστηρίξει την αυτόματη in silico πρόβλεψη του γονιδίου και αυτό το αναγνωστικό πλαίσιο δε φαίνεται να κωδικοποιεί για κάποια λειτουργική β-λακτάμαση, ούτε εμπεριέχει κάποιο συντηρημένο μοτίβο της. Περισσότερη έρευνα πρέπει να πραγματοποιηθεί για τον χαρακτηρισμό τέτοιων αναγνωστικών πλαισίων για να έχουμε μια πιο ξεκάθαρη εικόνα για την λειτουργία τους, καθώς θα ήταν ένα μεγάλο μειονέκτημα για την φαγοθεραπεία οι βακτηριοφάγοι να φέρουν τέτοιου είδους ένζυμα.

Για να διαπιστωθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια η φυλογένεια των βακτηριοφάγων έγινε ευθυγράμμιση πλήρων γονιδιωμάτων με τον αλγόριθμό LastZ. Φάνηκε ότι οι συγκε-

κριμένοι βακτηριοφάγοι, έχουν την μεγαλύτερη ομοιότητα με τον βακτηριοφάγο ValKK3 (Lal et al., 2016) έναν μη φυλογενετικά καθορισμένο αλλά πιθανά "schizoT4like" *Vibrio* βακτηριοφάγο και τον VH7D (Luo et al., 2015), έναν χαρακτηρισμένο "schizoT4like" *Vibrio* βακτηριοφάγο. Μεταξύ τους οι βακτηριοφάγοι φGrn1 και φSt2 εμφάνισαν 99.3 % ομολογία.

Η συντένια και η γονιδιακή οργάνωση των δύο βακτηριοφάγων ακόμη μελετήθηκε με το λογισμικό Mauve (Εικόνα 3.15), όπως έχει προταθεί και στο παρελθόν σε βακτηριοφάγους του γένους *Acinetobacter* (Jun et al., 2014). Πιο συγκεκριμένα δημιουργήθηκαν δύο μικρές συντενιακές περιοχές 3327 και 13585 βάσεων και 3 μεγαλύτερες 57120, 66636 και 106660 βάσεων, που σηματοδοτούν την ομολογία ανάμεσα στα γονιδιώματα. Στα διαγράμματα φαίνεται η πολύ υψηλή ομοιότητα μεταξύ των γονιδιωμάτων, αν και υπάρχουν και μοναδικές περιοχές για κάθε βακτηριοφάγο. Αν και φαίνεται να υπάρχει μία γονιδιακή αναδιοργάνωση μεταξύ αυτών των γονιδιακών περιοχών, η σειρά με την οποία εμφανίζονται αυτές οι περιοχές είναι ίδια για κάθε γονιδίωμα, γεγονός που μπορεί να δικαιολογηθεί από το φαινόμενο του κυκλικού τρόπου αντιγραφής των φαγικών γονιδιωμάτων (Petrov et al., 2006, 2010). Η ευθυγράμμιση που έλαβε χώρα επιβεβαίωσε την υψηλή συντήρηση των γονιδιωμάτων με τους υπόλοιπους γνωστούς "schizoT4like" βακτηριοφάγους.

1 1,000	2,000	3,000	4,000	5,000 6,000	7,000	8,000 9,000	10,000	11,000	12,000	13,000	14,000	15,000	16,000	17,000 1	19,000 19,00
\longrightarrow	\Rightarrow	⇒⇒⊧				⇒<		⇒	,──→	→		⇒⇒ —	\Rightarrow	⇒	→ _{→→} -
20,000	21,000 2	2,000 23	3,000 24,	000 25,000	26,000 27,	000 28,000	29,000	30,000 3	1,000 3	2,000 33	,000 34,	000 35,0	000 36,	000 37,00	0 38,000
39,000 40,0		▶ ⇒	43,000	44,000 4	5,000 46,000	47,000 4	→ → → → → → → → → → → → → → → → → → →	,000 50,00	→→ 0 51,00	0 52,000	53,000	54,000	55,000	56,000	57.000
→→→→ 58.000 59.000	60,000	61,000	→ 62,000	63,000 64,00	→ →→ -	→→→ 		→→→→ ••••••	70,000	71,000	72,000	• •••••	74,000	75,000	76,000 77,
78,000	¥ 79,000	80,000	81,000	→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→	>← → →→ 84.000	85.000 86.000	87,000	88.000	➡ 89,000	90,000	91,000	92,000	⇒► ►⇒ 93,000	94,000 95	.000 96.000
→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→	98,000 99	.000 100	,000 101,0	100 102,000	103,000 104,0	000 105,000	106,000	107,000 108	8,000 10	9,000 110	,000 111,0	00 112,0	00 113 ₁ 0		+ + + + + + + + + + + + + + + + + + +
116.000 117.0	 ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲		120.000		2.000 123.000	124.000 12	5.000 126.		0 128.00	0 129.000	130.000	131.000	132.000	133.000	134.000
															
135,000 136,000	137,000	138,000	139,000	140,000 141,00	0 142,000	143,000 144,000	0 145,000	146,000	147,000	148,000	149,000	150,000	151,000	152,000	153,000 154,
155,000	156,000	157,000 1	158,000 15	9,000 160,000	161,000 16	82,000 163,000	164,000	165,000	166,000	167,000 1	68,000 16	9,000 17	0,000 17	71,000 172	000 173,000
		;		← <	←		<u>`</u>					→	\rightarrow		\longrightarrow
174,000 17	5,000 176	000 177.0	000 178,00	0 179,000	180,000 181,00	182,000	183,000 1	84,000 185.	000 186	000 187,0	00 188,00	0 189 _, 00	190,00	00 191,000	192,000
'		→ ,	→ →	→→		→ ─	<mark>>→</mark>			<u>→</u> ⇒⇒.		\implies	$\rightarrow \longrightarrow$		→
193,000 194,00	195,000	196,000	197,000	198,000 199	000 200,000	201,000 202,	000 203,0	00 204,000	205,000	206,000	207,000	208,000	209,000	210,000	211,000
			\rightarrow \rightarrow $$		 `	*	\rightarrow $-$			•	<u> </u>	$\rightarrow \rightarrow \rightarrow$		→	
212,000 213,000	214,000	215,000	216,000	217,000 218,000	219,000	220,000 221,000	222,000	223,000	224,000	225,000	226,000	227,000	228,000	229,000 2	30,000 231,0
232,000	233,000 2	34,000 23	35,000 236	,000 237,000	238,000 239	240,000	241,000	242,000 2	43,000 2	44,000 24	⇒ ⇒⇒ 15,000 246	247	,000 248	3,000 249,0	00 250,-
		⊳⇒ _⇒ ⇒		→	$\rightarrow \rightarrow $			\rightarrow –			\rightarrow	→	⇒ _è ⇒	•⇒←	→ →

Εικόνα 3.13: Γονιδιακός χάρτης του βακτηριοφάγου *φ*St2. Τα βέλη αναπαριστούν τις κωδικές περιοχές με τον αντίστοιχο προσανατολισμό. Χρώματα: Σκούρο πράσινο → Αντιγραφή και πακετάρισμα του DNA, Ανοιχτό πράσινο → Μεταβολισμός RNA, Ανοιχτό μπλε → Δομικά στοιχεία ουράς του ιού, λυσοζύμη βάσης και τριχοειδή πόδια του, Κόκκινο → Καψιδιακές πρωτεΐνες, Σκούρο μπλε → NAD+ και μεταβολισμός νουκλεοτιδίων, Ροζ → Sir2/cobB δεακετυλάση, Καφέ → Άλλα, Γκρι → Υποθετικές πρωτεΐνες, Φούξια → επιβεβαιωμένα tRNA, Μαύρο → Pseudo-tRNA.

131

Αναλυτικά η ομοιότητα παρουσιάζεται στον πίνακα 3.3. Όπως είναι φυσικό έχοντας μόλις 168903 bp η ομολογία με τον βακτηριοφάγο T4 είναι αρκετά μικρή. Λαμβάνοντας υπόψη τη συγκεκριμένη παραλλακτικότητα δημιουργήθηκε ένα φυλογενετικό δέντρο που δείχνει την φυλογένεια των βακτηριοφάγων σε σχέση με όλους τους γνωστούς ως τώρα "schizoT4like" *Vibrio* βακτηριοφάγους (Εικόνα 3.14).

Πίνακας 3.3: Ποσοστό ομοιότητας μεταξύ των βακτηριοφάγων που παρουσιάζονται στη διδακτορική διατριβή και ήδη χαρακτηρισμένων γονιδιακά "schizoT4like" και του T4 βακτηριοφάγων.

Βακτηριοφάγοι (Αριθμός καταχώρησης)	φSt2	φGrn1
φSt2		99.30%
φGrn1	99.30%	
KVP40 (AY283928)	93.30%	94.10%
nt-1 (HQ317393)	86.90%	81.88%
φpp2 (JN849462)	93.57%	94.50%
VH7D (KC131129)	99.24%	98.74%
ValKK3 (K671755)	98.53%	98.53%
T4 (AF138101)	61.94%	55.90%



Εικόνα 3.14: Φυλογενετικό κοινό δέντρο μετά την ευθυγράμμιση πλήρων γονιδιωμάτων "schizoT4like" βακτηριοφάγων με τον αλγόριθμο LastZ (Neigbor-joining consensus tree). Οι αριθμοί δίπλα στις διακλαδώσεις αντιπροσωπεύουν τις τιμές αυτοδυναμίας (bootstrap support) για 10 επαναλήψεις. **Πίνακας 3.4**. Τα αναγνωρισμένα γονίδια του βακτηριοφάγου φGrn1 και τα αντίστοιχα ID των πρωτεϊνών του. Η τελευταία στήλη δείχνει την ύπαρξη ομόλογων γονιδίων (✓) ή την απουσία αυτών σε άλλους δημοσιευμένους *Vibrio* "schizoT4like" φάγους (KVP40, φpp2, nt-1 και VH7D) έχοντας όριο e-value 1.0 e⁻¹⁰. Η τονισμένη γραφή δείχνει το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη Sir2/cobB και τα *italic* τονισμένη γραφή την μοναδική homing ενδονουκλεάση του βακτηριοφάγου (Skliros et al., 2016).

Λειτουργία γονιδίων του φGrn1

Προϊόν	Αρχή	Τέλος	nt (bp) к	ατεύθυνση	protein_id	Παρ	ών ή ό	χι στο	υς
						KVP40	φpp2	nt-1	VH7D
Ribonucleoside diphosphate reductase alpha subunit	4386	6611	2226	forward	ALP46965	✓	✓	✓	✓
Ribonucleoside diphosphate reductase beta subunit	6621	7745	1125	forward	ALP46998	\checkmark	\checkmark	✓	✓
Thioredoxin	7747	8046	300	forward	ALP47203	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Transglycosylase	8121	8693	573	forward	ALP47078	\checkmark	\checkmark	✓	\checkmark
Thioredoxin	8980	9984	1005	forward	ALP47011	\checkmark	\checkmark	✓	\checkmark
DNA topoisomerase	10030	11316	1287	forward	ALP46989	✓	\checkmark	✓	\checkmark
Queuosine biosynthesis QueE radical SAM	11567	12451	885	forward	ALP47028	✓	\checkmark	✓	\checkmark
Putative ATPase	15570	16274	705	forward	ALP47051	✓	\checkmark	✓	\checkmark
Anti-sigma factor	17553	17852	300	forward	ALP47202	✓	\checkmark	✓	\checkmark
Tail fibers protein	18817	23016	4200	reverse	ALP46957	✓	\checkmark	✓	
Tail fibers protein	23087	23911	825	reverse	ALP47036	\checkmark	\checkmark	✓	
Tail fibers protein	28318	29856	1539	reverse	ALP46978	\checkmark	\checkmark	✓	\checkmark
Putative ribonuclease with DUF458 domain	29924	30448	525	reverse	ALP47094	✓	\checkmark	✓	\checkmark
Deoxynucleotide monophosphate kinase	47493	48137	645	reverse	ALP47061	\checkmark	\checkmark	✓	\checkmark
Tail completion protein	48367	48903	537	reverse	ALP47091	\checkmark	\checkmark	✓	\checkmark
Baseplate hub assembly chaperone	51043	51891	849	reverse	ALP47032	\checkmark	\checkmark	✓	\checkmark
Baseplate tail tube initiator	51904	52650	747	reverse	ALP47043	\checkmark	\checkmark	✓	\checkmark
DNA end protector during packaging	52654	53250	597	reverse	ALP47070	\checkmark	\checkmark	✓	\checkmark
Head completion protein	53643	54098	456	reverse	ALP47127	\checkmark	\checkmark	✓	
Baseplate tail tube cap	54167	55303	1137	forward	ALP46997	\checkmark	\checkmark	✓	\checkmark
Baseplate wedge subunit	55300	55878	579	forward	ALP47075	\checkmark	\checkmark	✓	\checkmark
Baseplate hub protein	55880	57151	1272	forward	ALP46991	\checkmark	\checkmark	✓	\checkmark
Baseplate hub subunit/Tail lysozyme	57157	58368	1212	forward	ALP46994	\checkmark	\checkmark	✓	\checkmark
Baseplate wedge subunit	60570	60989	420	forward	ALP47140	\checkmark	\checkmark	✓	\checkmark
Baseplate wedge subunit (T4-like gp6)	61075	63033	1959	forward	ALP46969	\checkmark	\checkmark	✓	\checkmark

Αποτελέσματα και Συζήτηση			135							
Baseplate wedge subunit	63033	66530	3498	forward	ALP46959	\checkmark	\checkmark	✓	\checkmark	
Baseplate wedge subunit	66532	67554	1023	forward	ALP47008	\checkmark	\checkmark	√	\checkmark	
Baseplate wedge tail fiber connector	67608	68564	957	forward	ALP47014	\checkmark	\checkmark	√	\checkmark	
Baseplate wedge subunit και tail pin	68574	70820	2247	forward	ALP46963	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	
Baseplate wedge subunit και tail pin	70820	71506	687	forward	ALP47054	\checkmark	✓	\checkmark	✓	
Short tail fibers	71620	73044	1425	forward	ALP46985	✓	✓	\checkmark	✓	
Putative minor structural protein	73041	74468	1428	forward	ALP46984	✓	✓	\checkmark	✓	
Neck whiskers protein	74767	76449	1683	forward	ALP46974	✓	✓	\checkmark	✓	
Head completion neck hetero-dimeric protein	76460	77389	930	forward	ALP47018	✓	\checkmark	\checkmark	\checkmark	
Head completion neck hetero-dimeric protein	77393	78232	840	forward	ALP47034	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	
Tail assembly protein	78344	79303	960	forward	ALP47013	✓	✓	√	\checkmark	
Terminase small subunit	80015	80563	549	forward	ALP47086	✓	✓	√	\checkmark	
Terminase large subunit	80523	82325	1803	forward	ALP46971	\checkmark	\checkmark	√	\checkmark	
Tail sheath monomer	82372	84387	2016	forward	ALP46967	\checkmark	\checkmark	√	\checkmark	
Tail tube monomer	84440	84940	501	forward	ALP47103	\checkmark	\checkmark	√	\checkmark	
Portal vertex of the head	84980	86530	1551	forward	ALP46975	\checkmark	\checkmark	√	\checkmark	
Prohead core protein	86544	86711	168	forward	ALP47323	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	
Capsid kat scaffold protein	86712	87203	492	forward	ALP47109	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	
Prohead assembly (scaffolding) protein	87206	87847	642	forward	ALP47062	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	
Prohead assembly(scaffolding) protein	87880	88728	849	forward	ALP47031	\checkmark	✓	\checkmark	✓	
Major capsid protein	88799	90343	1545	forward	ALP46976	\checkmark	✓	\checkmark	✓	
Homing endonuclease (Seg-like)	90429	91145	717	forward	ALP47050					
tRNA nucleotylditransferase	91194	92291	1098	reverse	ALP47001		✓	\checkmark		
Inhibitor of prohead protease	92387	92884	498	forward	ALP47105	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	
DNA helicase	98501	100033	1533	forward	ALP46979	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	
Transamidase GatB domain protein	100520	100933	414	reverse	ALP47143	\checkmark	\checkmark	\checkmark		
Single strkated DNA-binding protein	100930	101343	414	reverse	ALP47144	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	
Tail connector protein	101512	104205	2694	reverse	ALP46961	\checkmark	\checkmark	√		
Straight tail fiber	104214	107897	3684	reverse	ALP46961	\checkmark	✓	\checkmark	\checkmark	
Ribonuclease H	107976	108908	933	forward	ALP47017	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	

Double-strkated DNA binding protein	108991	109272	282	forward	ALP47223	\checkmark	\checkmark	\checkmark	~
Transcriptional regulator	109256	109558	303	forward	ALP47199	\checkmark	\checkmark		~
DNA helicase loader	109593	110153	561	forward	ALP47081	\checkmark	\checkmark	\checkmark	~
Single strkated DNA-binding protein	110204	111130	927	forward	ALP47019	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Dihydrofolate reductase	111180	111725	546	forward	ALP47088	\checkmark	\checkmark	\checkmark	~
ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	111722	112438	717	forward	ALP47048	\checkmark	\checkmark	\checkmark	~
Recombination protein	112505	113605	1101	forward	ALP47000	\checkmark	\checkmark	✓	✓
DNA primase/helicase	114016	115299	1284	forward	ALP46990	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Putative anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase	115293	115538	246	forward	ALP47260	\checkmark	\checkmark	\checkmark	~
Ribonucleoside-triphosphtae reductase	115539	117374	1836	forward	ALP46970	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Ribonucleoside-triphosphtae reductase activating protein	118491	118967	477	forward	ALP47116	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Phosphoesterase	118967	119491	525	forward	ALP47093	√	\checkmark	✓	✓
DNA helicase	120405	121229	825	forward	ALP47037	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
DNA primase/ DNA helicase	121788	122846	1059	forward	ALP47003	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	122846	123343	498	forward	ALP47106	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Exonuclease A	123582	124274	693	forward	ALP47053	√	\checkmark	\checkmark	✓
Thymidylate synthase	126179	127078	900	forward	ALP47026	√	\checkmark	\checkmark	✓
NAD-dependent protein deacetylase of SIR2/cobB family	130642	131403	762	forward	ALP47040	√	\checkmark	\checkmark	✓
Topoisomerase IV subunit B	131538	133331	1794	forward	ALP46972	√	\checkmark	\checkmark	✓
Ser/Thr protein phosphatase family protein	134715	135443	729	forward	ALP47046	√	\checkmark	\checkmark	✓
Putative Hydrolase	136759	137352	594	forward	ALP47071	√	\checkmark	\checkmark	✓
DNA ligase	137847	139184	1338	forward	ALP46988	√	\checkmark	\checkmark	✓
RNA polymerase-ADP-ribosyltransferase Alt	140168	141709	1542	reverse	ALP46977	√	\checkmark	\checkmark	✓
Glutaredoxin	143541	143780	239	forward	ALP47267	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Capsid vertex protein	143836	144735	900	forward	ALP47025	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
RNA polymerase sigma factor	144744	145256	513	forward	ALP47096	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Putative 5'(3')-deoxyribonucleotidase	149037	149537	501	forward	ALP47104	\checkmark	\checkmark	\checkmark	✓
Recombination-related endonuclease	149534	150577	1044	forward	ALP47005	\checkmark	\checkmark	√	\checkmark
Recombination-related endonuclease	150794	153031	2238	forward	ALP46964	\checkmark	\checkmark	√	\checkmark
Sliding clamp DNA polymerase accessory protein	153793	154458	666	forward	ALP47058	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark

Αποτελέσματα και Συζήτηση			137							
Replication factor C small subunit / DNA polymerase clamp loader subunit	154525	155475	951	forward	ALP47058	\checkmark	\checkmark	√	\checkmark	
DNA polymerase clamp loader subunit	155486	155977	492	forward	ALP47110	✓	\checkmark	\checkmark	✓	
Endoribonulcease	156012	156392	381	forward	ALP47156	✓	\checkmark	\checkmark	✓	
DNA polymerase	157110	159662	2553	forward	ALP46962	✓	✓	√	✓	
RNA ligase A	159985	161130	1146	forward	ALP46996	\checkmark	\checkmark	✓	\checkmark	
Beta lactamase domain protein	162526	162759	234	forward	ALP47273	\checkmark	\checkmark	✓	\checkmark	
3'-phosphatase 5'-polynucleotide kinase	162768	163685	918	forward	ALP47022	\checkmark	\checkmark	√	\checkmark	
DCMP deaminase	178065	178517	453	forward	ALP47131	\checkmark	\checkmark		\checkmark	
NADPH-dependent 7-cyano-7-deazaguanine reductase	178572	179504	933	forward	ALP47016	✓	✓		✓	
GTP cyclohydrolase I	179572	180240	669	forward	ALP47057	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	
NADPH dependent preQ0 reductase	181650	182558	909	forward	ALP47024	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	
Queuosine Biosynthesis QueC ATPase	182614	183330	717	forward	ALP47049	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	
Head assembly chaperone protein	184726	185064	339	forward	ALP47177	\checkmark	\checkmark	\checkmark	✓	
Endonuclease	185485	185772	288	reverse	ALP47218	\checkmark	\checkmark	\checkmark		
RNA ligase	186335	187342	1008	forward	ALP47010	\checkmark	\checkmark	✓	\checkmark	
DNA methyltransferase	188780	189358	579	forward	ALP47076	\checkmark	✓	√	\checkmark	
RIIA lysis inhibitor	190701	192770	2070	forward	ALP46966	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	
RIIB lysis inhibitor	192763	193803	1041	forward	ALP47006	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	
CAMP-dependent Kef-type K+ transport system	194565	195167	603	forward	ALP47069		\checkmark	\checkmark	\checkmark	
Chromosome segregation protein	199153	199422	270	forward	ALP47235	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	
DNA helicase	199433	200698	1266	forward	ALP46992	~	~	~	~	
Nicotinamide-nucleotide adenylyltransferase NadM family /ADP-ribose pyrophosphatase	203205	204230	1026	forward	ALP47007	~	~	~	~	
Nicotinate-nucleotide adenylytransferase	204979	205515	537	forward	ALP47090	~	~	\checkmark	~	
Thymidine kinase	218342	218911	570	forward	ALP47080	~	~		~	
Endonuclease V	226420	226824	405	forward	ALP47148	~	~	\checkmark	~	
Nicotinamide-nucleotide adenylyltransferase NadR family/ Ribosylnicotinamide kinase	228909	229889	981	forward	ALP47012	~	~	\checkmark	~	
Ribosyl nicotinamide transporter PnuC-like	230840	231514	675	forward	ALP47056	✓.	✓	✓.	✓	
Adenylate cyclase	238503	239327	825	forward	ALP47035	✓.	✓	✓.	✓	
Nicotinamide phosphoribosyltransferase	246974	248467	1494	forward	ALP46980	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	

10000	20000	30000	40000	50000	60000	70000	80000	90000	100000	110000	120000	130000	140000	150000	160000	170000	180000	190000	200000	210000	220000	230000	240000
		and the second second	hand	and the second	home and a start			and the state	- Marthan	and the second second	All Can tal	Arrest and	and the	M. freestation and	anardamakar	and the first free of the second	Personal and an an	anyan ana ana ang	and a second second second	- and a gride of	Practice Mai	annahara	nampin
ui -																							5
Bacter	riopha	ge K	VP40																				
10000	20000	30000	40000	50000	60000	70000	80000	90000	100000	110000	120000	130000	140000	150000	160000	170000	180'000	190000	200000	210000	220000	230000	240000
Angeneral	Areas where a	a construction of the of	maker	munit	entryrenter	and a second	affection to	and and been	have been a second	and and		and and a	Jane Marked and	and a second second	al and a second	- And a start of the	t is with	tint fild bonks	Des TRANCE	and the second	12.10	and the second	and the second of the second se
Bacte	riopha	ige φ	Grn1		270						210												
1000	20000	30000	40000	50000	60000	70000	80000	90000	100000	110000	120000	130000	140000	150000	160000	170000	180000	190000	200000	210000	220000	230000	240000
Can Danishtanish	and the second				and the	and and a second se	margaret and	and a start of the	humber	IN A MANAGANA	and a large day	an a	Wanthank	and as Adred	and when a	a distanti	hi nella in al		and the	Res Branks	Arabin de		
Bacter	iopha	ge φ	St2																				
10000	20000	30000	40000	50000	60000	70000	80000	аороо	100000	110000	120000	130000	140000	150000	160000	170000	180'000	190'000	200000	210000	220000	230000	240000
alite a la della con	o il Alfandia		10-0-0-000			En sinders	iliter ilita b	it. Last.	and the second	He minim	this could					1000 - Arch				a surfacely		A MARTIN	1000
Bacter	iopha	ge Ø	pp2																				
10000	20000	30000	40000	50000	60000	70000	80000	90000	100000	110000	120000	130000	140000	150000	160000	170000	180000	190000	200'000	210000	220000	230000	240000
D AND AND	the Darksons	Contraction of the			an a com	West West	man	and and a second	BUNK CONTRACT	Artesta	and the stands	herenter	and the second	p-Andrew Varia	and the first	Andread	~~	work of		shine and	Sec. And and a	And State and	Annah and
Bacter	iopha	ge VI	H7D													277							I.
1000	0 20000	30000	40000	50000	60000	70000	80000	90000	100000	110000	120000	130000	140000	150000	160000	170000	180000	190000	200000	210000	220000	230000	240000
Contrast and subjects	國介國主國 植。	MIN ANA PA	ala isa sa	al e ani	A. M. Martin		Loug	ling	A M	an and so and	a appendix	and a stand of the second second		Andalda	- Walk	dit the links	A BOARD AND A BOARD			AND AND AND	CAR LAND		A LA ANDAL DAL

Bacteriophage nt-1

Εικόνα 3.15: Πολλαπλή ευθυγράμμιση πλήρων γονιδιωμάτων με το λογισμικό MAUVE. Τα γονιδιώματα όλων των γνωστών "schizoT4like" βακτηριοφάγων συγκρίθηκαν. Ίδιου χρώματος γονιδιακές περιοχές συμβολίζουν την συντένια μεταξύ των γονιδιωμάτων. Τα γραφήματα παρουσιάζουν το ποσοστό συντένιας για κάθε γονιδιακή περιοχή. Οι άσπρες περιοχές συμβολίζουν μοναδικές γονιδιακές περιοχές. **Πίνακας 3.5:** Τα αναγνωρισμένα γονίδια του βακτηριοφάγου φSt2 και τα αντίστοιχα ID των πρωτεϊνών του. Η τελευταία στήλη δείχνει την ύπαρξη ομόλογων γονιδίων (\checkmark) ή την απουσία αυτών σε άλλους δημοσιευμένους *Vibrio* "schizoT4like" φάγους (KVP40, φpp2, nt-1 και VH7D) έχοντας όριο e-value 1.0 e⁻¹⁰. Η τονισμένη γραφή δείχνει το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη Sir2/cobB και τα *italic* τονισμένη γραφή τις homing ενδονουκλεάσες του βακτηριοφάγου (Skliros et al., 2016).

140

Λειτουργία γονιδίων του φSt2

Προϊόν	Αρχή	Τέλος	nt (bp)	κατεύθυνση	protein_id	Παρά	ον ή όχι στο	ους	
						KVP40	φ p p2	nt-1	VH7D
RIIA lysis inhibitor	3229	5298	2070	forward	ALP47346	\checkmark	✓	\checkmark	\checkmark
RIIB lysis inhibitor	5291	6274	984	forward	ALP47392	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Homing endonuclease (segD)	6477	7172	696	reverse	ALP47432	\checkmark			
Chromosome segregation protein	13140	13409	270	forward	ALP47373	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
DNA helicase	13420	14685	1266	forward	ALP47373	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Nicotinamide-nucleotide adenylyltransferase NadM family/ADP-ribose pyrophosphatase	17192	18217	1026	forward	ALP47387	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Nicotinate nucleotide adenylyltransferase	18965	19501	537	forward	ALP47387	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Thymidine kinase	30891	31460	570	forward	ALP47460	\checkmark	\checkmark		\checkmark
Endonuclease V	38697	39101	405	forward	ALP47535	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Nicotinamide-nucleotide adenylyltransferase NadR family/Ribosylnicotinamide kinase	41381	42361	981	forward	ALP47393	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Ribosyl nicotinamide transporter	43313	43987	675	forward	ALP47436	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Nicotinamide phosphoribosyltransferase	59435	60928	1494	forward	ALP47363	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Ribonucleoside-diphosphate reductase alpha subunit	65364	67589	2226	forward	ALP47345	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Ribonucleoside-diphosphate reductase beta subunit	67599	68723	1125	forward	ALP47379	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Thioredoxin	68725	69024	300	forward	ALP47594	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Transglycosylase	69098	69670	573	forward	ALP47458	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Thioredoxin	69957	70961	1005	forward	ALP47391	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
DNA topoisomerase	71007	72293	1287	forward	ALP47370	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Queuosine biosynthesis QueE radical SAM	72544	73428	885	forward	ALP47407	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Putative ATPase	76549	77253	705	forward	ALP47429	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Anti-sigma factor	78533	78832	300	forward	ALP47593	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Tail fibers protein	79799	83812	4014	reverse	ALP47337	\checkmark	\checkmark	\checkmark	
Tail fibers protein	83884	85614	1731	reverse	ALP47353	\checkmark	\checkmark	\checkmark	
Tail fibers protein	89115	90650	1536	reverse	ALP47361	\checkmark	\checkmark	\checkmark	
Deoxynucleotide monophosphate kinase	107670	108314	645	reverse	ALP47441	\checkmark	\checkmark	\checkmark	

Αποτελέσματα και Συζήτηση			141	L					
						,		1	1
Tail completion protein	108544	109080	537	reverse	ALP47471	•	•	•	✓
Putative baseplate hub catalyst	111053	111220	168	reverse	ALP47703	•	•	•	
Baseplate hub assembly chaperone	111220	112068	849	reverse	ALP47411	•	•	•	•
Baseplate tail tube initiator	112081	112827	747	reverse	ALP47421	✓	•	v	✓
DNA end protector during packaging	112831	113427	597	reverse	ALP47449	,	•	•	
Head completion protein	113429	113884	456	reverse	ALP47512	v	•	•	
Baseplate tail tube cap	113952	115088	1137	forward	ALP47378	v	v	•	,
Baseplate wedge subunit	115085	115663	579	forward	ALP47455	√	√	√	√
Baseplate hub subunit/ Tail lysozyme	116942	118153	1212	forward	ALP47375	√	√	√	√
Phospholipase	118643	118939	297	forward	ALP47599	√	√	√	✓
Baseplate wedge subunit	120353	120772	420	forward	ALP47527	✓	✓	✓	✓
Baseplate wedge subunit	120858	122816	1959	forward	ALP47349	✓	✓	✓	✓
Baseplate wedge subunit	122816	126313	3498	forward	ALP47339	✓	✓	✓	✓
Baseplate wedge subunit	126315	127337	1023	forward	ALP47388	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Baseplate wedge tail fiber connector	127391	128347	957	forward	ALP47394	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Baseplate wedge subunit και tail pin	128357	130603	2247	forward	ALP47343	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Baseplate wedge subunit και tail pin	130603	131289	687	forward	ALP47435	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Straight tail fiber	131289	132827	1539	forward	ALP47360	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Tail fiber protein	132824	134251	1428	forward	ALP47360	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Neck whiskers protein	134551	136233	1683	forward	ALP47355	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Head completion neck hetero-dimeric protein	136244	137173	930	forward	ALP47398	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Head completion neck hetero-dimeric protein	137177	138016	840	forward	ALP47413	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Tail assembly protein	138026	139087	1062	forward	ALP47383	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Terminase small subunit	139799	140347	549	forward	ALP47467	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Terminase large subunit	140307	142109	1803	forward	ALP47351	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Tail sheath monomer	142156	144171	2016	forward	ALP47347	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Tail tube monomer	144223	144723	501	forward	ALP47486	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Portal vertex of the head	144763	146313	1551	forward	ALP47358	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Prohead core protein	146327	146494	168	forward	ALP47702	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
Capsid Kai scaffold	146495	146986	492	forward	ALP47491	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark

							1		
Prohead assembly (scaffolding) protein	146989	147630	642	forward	ALP47442	•	•	•	•
Prohead assembly (scaffolding) protein	147663	148511	849	forward	ALP47410	•	•	•	v
Major capsid protein	148582	150126	1545	forward	ALP47359	✓	•	•	✓
tRNA nucleotidyltransferase	150184	151281	1098	reverse	ALP47382	,	•	v	
Inhibitor of prohead protease	151377	151874	498	forward	ALP47488	√	√	√	√
DNA helicase	158008	159537	1530	forward	ALP47362	√	√	√	✓
Transamidase GatB domain protein	160023	160436	414	reverse	ALP47530	√	√	√	
Single strkated DNA-binding protein	160433	160846	414	reverse	ALP47531	√	√	√	✓
Tail connector protein	161015	163708	2694	reverse	ALP47341	✓	✓	√	
Short tail fiber protein	163717	167424	3708	reverse	ALP47338	✓	✓	√	
Ribonuclease H	167503	168435	933	forward	ALP47396	✓	✓	√	✓
Double-strkated DNA binding protein	168518	168799	282	forward	ALP47611	✓	✓	\checkmark	✓
Transcriptional regulator	168783	169085	303	forward	ALP47590	✓	✓		✓
DNA helicase loader	169120	169680	561	forward	ALP47462	✓	✓	✓	✓
Single strkated DNA-binding protein	169731	170657	927	forward	ALP47399	✓	✓	✓	✓
Dihydrofolate reductase	170707	171252	546	forward	ALP47469	✓	✓	✓	✓
ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	171249	171965	717	forward	ALP47427	✓	✓	✓	✓
Recombination protein	172032	173132	1101	forward	ALP47381	✓	✓	✓	✓
Head assembly protein	173187	173489	303	forward	ALP47589	✓	✓	✓	✓
DNA primase/helicase	173543	174826	1284	forward	ALP47371	✓	✓	✓	✓
Ribonucleoside-triphosphate reductase	175066	176901	1836	forward	ALP47350	✓	✓	✓	✓
Ribonucleoside-triphosphate reductase activating protein	178022	178498	477	forward	ALP47498	✓	✓	~	✓
Phosphoesterase	178498	179022	525	forward	ALP47473	✓	✓	~	✓
DNA helicase	179936	180760	825	forward	ALP47415	✓	✓	~	✓
DNA primase/ DNA helicase	181319	182377	1059	forward	ALP47384	✓	✓	~	✓
Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	182377	182874	498	forward	ALP47489	✓	✓	~	✓
DexA exonuclease A	183107	183799	693	forward	ALP47434	✓	✓	~	✓
Thymidylate synthase	185703	186602	900	forward	ALP47405	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
NAD-dependent protein deacetylase of SIR2/cobB family	190808	191569	762	forward	ALP47418	✓	✓	√	\checkmark
Topoisomerase IV subunit B	191704	193497	1794	forward	ALP47352	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark

λποτελέσματα και Συζήτηση	143								
Ser/Thr protein phosphatase family protein	194881	195609	729	forward	ALP47424	1	1	1	
DNA ligase	198013	199350	1338	forward	ALP47369	✓	√	v	✓
RNA polymerase-ADP-ribosyltransferase Alt	200334	201932	1599	reverse	ALP47357	√	√	√	
Glutaredoxin	203720	203959	240	forward	ALP47647	√	√	√	۷
Capsid vertex protein	204015	204914	900	forward	ALP47404	√	√	√	٧
RNA polymerase sigma factor $\gamma \iota \alpha$ late transcription	204923	205435	513	forward	ALP47478	✓	✓	√	۷
Putative 5'(3')-deoxyribonucleotidase	209207	209707	501	forward	ALP47487	✓	✓	√	۷
Recombination-related endonuclease	209704	210747	1044	forward	ALP47386	✓	✓	✓	v
Recombination-related endonuclease	210964	213201	2238	forward	ALP47344	\checkmark	\checkmark	\checkmark	۷
Sliding clamp DNA polymerase accessory protein	213963	214628	666	forward	ALP47438	\checkmark	\checkmark	\checkmark	۷
Replication factor C small subunit /DNA polymerase clamp loader subunit	214695	215645	951	forward	ALP47395	\checkmark	\checkmark	\checkmark	۷
DNA polymerase clamp loader subunit	215655	216146	492	forward	ALP47492	\checkmark	\checkmark	√	٧
Homing endonuclease (Seg-like)	216143	216727	585	reverse	ALP47453				
Endoribonulcease translational repressor of early genes regA	216793	217176	384	forward	ALP47542	\checkmark		\checkmark	۷
DNA polymerase	218252	220804	2553	forward	ALP47342	✓	✓	✓	۷
RNA ligase A	221127	222272	1146	forward	ALP47377	\checkmark	\checkmark	\checkmark	۷
Beta lactamase domain protein	223668	223901	234	forward	ALP47653	\checkmark	\checkmark	\checkmark	۷
3'-phosphatase 5'-polynucleotide kinase	223910	224827	918	forward	ALP47402	\checkmark	\checkmark	\checkmark	۷
DCMP deaminase	238156	238608	453	forward	ALP47515	\checkmark	\checkmark		۷
NADPH-dependent 7-cyano-7-deazaguanine reductase	238663	239595	933	forward	ALP47397	\checkmark	\checkmark		v
GTP cyclohydrolase I	239663	240337	675	forward	ALP47437	\checkmark	\checkmark	\checkmark	٧
Homing endonuclease (mob-like)	240309	241010	702	reverse	ALP47430		\checkmark		
DNA methyltransferase	244175	244678	504	forward	ALP47484				
NADPH dependent preQ0 reductase	244662	245573	912	forward	ALP47403	\checkmark	\checkmark	\checkmark	٧
Queuosine Biosynthesis QueC ATPase	245629	246345	717	forward	ALP47426	\checkmark	\checkmark	\checkmark	v
Head assembly chaperone protein	247742	248080	339	forward	ALP47563	\checkmark	\checkmark	√	۷
Endonuclease	248502	248930	429	reverse	ALP47524	\checkmark	\checkmark	√	
RNA ligase	249352	250359	1008	forward	ALP47390	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
3.2.5.2 Οι "schizoT4like" βακτηριοφάγοι φέρουν γονίδια βιοσύνθεσης NAD⁺ και μεταβολισμού νουκλεοτιδίων

Κατά την ανάλυση των γονιδιωμάτων των δύο βακτηριοφάγων φάνηκε ότι υπάρχουν παρόντα γονίδια που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση του Νικοτιναμιδό Αδενινό Δινουλεοτιδίου (NAD⁺) και στο μεταβολισμό ριβονουκλεοτιδίων. Γενικά οι βακτηριοφάγοι τείνουν να κατέχουν μωσαϊκά γονιδίων που συμπληρώνουν ή παρακάμπτουν βιοχημικά μονοπάτια στους ξενιστές τα οποία ονομάζονται βοηθητικά μεταβολικά γονίδια (Auxiliary Metabolic Genes, AMGs). Όπως ο T4 και ο KVP40, έτσι και εδώ οι δύο βακτηριοφάγοι κατέχουν γονίδια που χρησιμοποιούν για να χειραγωγήσουν κατάλληλα τις βοχημικές διεργασίες του ξενιστή κατά τη διάρκεια της μόλυνσης για δικό τους όφελος. Η ύπαρξη γονιδίων που έχουν τη δυνατότητα να βιοσυνθέσουν NAD⁺ στο γονιδίωμα του βακτηριοφάγου KVP40 έχει προηγουμένως περιγραφεί και σχολιαστεί σαν ένα πολύ ενδιαφέρον βιοχημικό μονοπάτι (Miller et al., 2003a). Πιστεύεται ότι τα μεγάλα φαγικά γονιδιώματα προϋποθέτουν και έναν βιοχημικό επαναπρογραμματισμό του ξενιστή λόγω των αυξημένων αναγκών σε ενέργεια που απαιτεί η αντιγραφή του DNA. Για αυτόν τον λόγο θα πρέπει να υπάρχει η κατάλληλη γονιδιακή δεξαμενή, ώστε να ενισχυθούν τα βιοχημικά μονοπάτια που ευθύνονται για την βιοσύνθεση όλων των νουκλεοτιδίων (Karam και Drake, 1994, De smet et al., 2016). Εκτός από το γονίδιο που κωδικοποιεί για την μονονουκλεοτιδική αδενυλμεταφοράση του νικοταμιδίου (nicotinamide mononucleotide adenyltransferase, NMNAT, ALP47012 για φGrn1 και ALP47393 για φSt2), ένα ένζυμο που κατέχει και ο ξενιστής, οι βακτηριοφάγοι κατέχουν ακόμα και το γονίδιο που κωδικοποιεί για φωσφορυβολμεταφοράση του νικοταμιδίου (nicotinamide phosphoribosyltransferase, NAMPT, ALP46980 για φGrn1 και ALP47363 για φSt2), το οποίο δεν υπάρχει ή δεν έχει επισημανθεί στον ξενιστή V. alginolyticus και μπορεί να χρησιμοποιεί νικοτιναμίδη σαν υπόστρωμα και να την μετατρέπει σε νικοτιναμίδη d-ριβονουκλεοτίδιο, κάνοντας μια συντόμευση της βιοχημικής «διαδρομής» προς την βιοσύνθεση του NAD⁺ (Εικόνα 3.16). Ακόμη οι δύο βακτηριοφάγοι φέρουν τις δύο υπομονάδες που απαρτίζουν μία ριβονουκλεοσιδική διφωσφορική αναγωγάση (nrdAB; ALP46965,

ΑLP46998 για φGrn1 και ALP47345, ALP47379 για φSt2) και την μία υπομονάδα που απαρτίζει μια ριβονουκλεοσιδική τριφωσφορική αναγωγάση (*nrdD*; ALP46970 για φGrn1 και ALP47350 για φSt2), όπου και οι δύο συμμετέχουν στα τελευταία στάδια της βιοσύνθεσης του dATP και dGTP. Επί προσθέτως υπάρχουν και άλλα ένζυμα που κωδικοποιούνται από φαγικά γονίδια και εμπλέκονται στο μεταβολισμό των πυριμιδών. Πιο συγκεκριμένα, μία dCMP δεαμινάση (ALP47131 για φGrn1 και ALP47515 για φSt2), μία κινάση θυμιδίνης (ALP47080 για φGrn1 και ALP47460 για φSt2) και μία συνθάση θυμιδιλάσης (*thyA*, ALP47026 για φGrn1 και ALP47405 για φSt2) με στόχο την επαγωγή της βιοσύνθεσης dTTP από dCTP και dUTP.



Εικόνα 3.16: Τα δύο βιοχημικά μονοπάτια βιοσύνθεσης NAD⁺ και μεταβολισμού νουκλεοτιδίων μαζί με τα γονίδια του βακτηριοφάγου που συμμετέχουν (έντονα γράμματα), όπως περγράφηκαν στον βακτηριοφάγο KVP40. Αντίστοιχα γονίδια φέρουν όλοι οι βακτηριοφάγοι "schizoT4like" ανάμεσά τους και οι φGrn1 και φSt2. Συντομογραφίες: NAm=νικοτινοαμίδιο, NMN=μονονουκλεοτίδιο του νικοτινοαμιδίου (Miller et al., 2003a).

Πιο αναλυτικά τα δύο βιοχημικά μονοπάτια αναλύονται στο κεφάλαιο 3.3 Μεταβολικός χειρισμός των κυττάρων ξενιστή.

3.2.5.3 Πολλαπλά tRNA παρόντα στα γονιδιώματα των φ Grn1 και φ St2

Η αντίληψη που επικρατούσε μετά την αλληλούχιση του γονιδιώματος του βακτηριοφάγου T4, ότι ο μέσος αριθμός των tRNA που φέρουν τα φαγικά γονιδιώματα είναι περίπου 10, αμφισβητήθηκε μετά την αλληλούχιση και άλλων μεγάλων γονιδιωμάτων βακτηριοφάγων, δείχνοντας ταυτόχρονα ότι η παρουσία μεγάλου αριθμού tRNA είναι ένα χαρακτηριστικό πολύ λυτικών βακτηριοφάγων (Wilson, 1973). Στην παρούσα διδακτορική διατριβή παρουσιάζεται ο βακτηριοφάγος φGrn1, ο οποίος και εκείνος πρόκειται για βακτηριοφάγο με εξαιρετικά μεγάλο γονιδίωμα, ο οποίος περιέχει 28 tRNA (χωρίς τα ψευδο-tRNA), έναν από τους μεγαλύτερους αριθμούς tRNA που έχουν βρεθεί ποτέ σε φαγικά γονιδιώματα μέχρι σήμερα. Η απαλειφή αυτών σε μεταλλαγμένες σειρές στα tRNA του T4, έχει δείξει η απουσία τους οδηγεί στη μείωση του μεγέθους έκρηξης του ιού και στην πρωτεϊνοσύνθεση, επισημαίνοντας τον σημαντικό ρόλο τους, αλλά και την εξελικτική πίεση που έχει λάβει χώρα ώστε να συντηρηθούν αυτά στα γονιδιώματα λόγω φυσικής επιλογής (Freeman, 1998). Αν και οι βακτηριοφάγοι φέρουν τα δικά τους tRNA, είναι ταυτόχρονα πολύ εξαρτημένοι από τα tRNA του ξενιστή τους για την αποδοτική μετάφραση των πρωτεϊνών τους (Kunisawa, 2002). Στην δικιά μας περίπτωση το V. alginolyticus στέλεχος V1 φέρει τουλάχιστον 67 tRNA. Τα tRNA των φGrn1 και φSt2 καταφέρνουν να ενσωματώσουν τουλάχιστον το 41.8% και 39.6%, αντίστοιχα, των αμινοξέων στα δικά τους κωδικόνια χρησιμοποιώντας τα δικά τους tRNA, μειώνοντας την εξάρτηση που έχουν από αυτά του ξενιστή. Η χρησιμοποίηση των φαγικών tRNA από τα φαγικά κωδικόνια έχει συσχετιστεί με μειωμένη και αργοπορημένη έκφραση φαγικών γονιδίων για τα οποία η ύπαρξη των tRNA του ξενιστή δεν υπάρχει ή είναι σπάνια (Kunisawa, 1992).

3.2.5.4 Γονίδια λυσοζυμών και ενδολυσών

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, οι βιοτεχνολογικές εφαρμογές των βακτηριοφάγων συμπεριλαμβάνουν και τον χειρισμό και ετερόλογη έκφραση των ενζύμων που χρησιμοποιούν οι βακτηριοφάγοι για να διεισδύσουν πέρα από την βακτηριακή μεμβράνη κατά τη διαδικασία της μόλυνσης (λυσοζύμες), αλλά και που χρησιμοποιούν για να λύσουν το βακτήριο από μέσα προς τα έξω κατά την απελευθέρωση των ιοσωματιδίων (ενδολυσίνες). Η γονιδιωματική ανάλυση αποκάλυψε και δύο αναγνωστικά πλαίσια (1 για κάθε βακτηριοφάγο) που ανήκουν στην μεγάλη υπεροικογένεια των λυσοζυμών. Το πρώτο αναγνωστικό πλαίσιο του φGrn1 βρίσκεται στην θέση 57157 (ALP46994) και το αντίστοιχο για τον φSt2 στη θέση 116942 (ALP47375). Ταυτόχρονα εντοπίστηκαν και δύο ένζυμα που έχουνε δράση τρανσγλυκοσυλάσης (transglycosylase). Αυτά τα δύο αναγνωστικά πλαίσια βρίσκονται στις θέσεις 8121 για τον φGrn1 (ALP47078) και 69098 για τον φSt2 (ALP47458). Αναφορικά με τις λυσοζύμες κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες που ανήκουν στην υπεροικογένεια των λυσοζυμών (lysozyme superfamily). Και οι δύο φέρουν τις N-terminal και OB συντηρημένες περιοχές, οι οποίες πρωτίστως περιγράφηκαν με λεπτομέρεια στο γονιδίωμα του T4 βακτηριοφάγου (gp5) το 1985 (Nakagawa et al., 1985, Kanamaru et al., 1999, Arisaka et al., 2003). Ακόμη αναφορικά με τις ενδολυσίνες και οι δύο φέρουν την SLT συντηρημένη περιοχή, χαρακτηριστικό των υδρολασών μουρεΐνης (murein hydrolases) (Van Asselt et al., 1999). Η εφαρμογή των ανασυνδυασμένων ενδολυσών έχει σημειώσει αρκετές βιοτεχνολογικές εφαρμογές στα Gram θετικά βακτήρια, αλλά για τα Gram αρνητικά έχουν σημειωθεί και αρκετά προβλήματα, κυρίως λόγω της δυσκολίας στην πρόσβαση του εσωτερικού στρώματος πεπτιδογλυκάνης (Hermoso et al., 2007; Lai et al., 2011). Παρόλα αυτά σε περιβάλλον με ελαφρά όξινο pH, έχει φανεί ότι μπορεί να παρακαμφθεί το συγκεκριμένο εμπόδιο για κάποια είδη (Oliveira et al., 2014) και αναφορές με επιτυχείς εφαρμογές ανασυνδυασμένων ενδολυσών έναντι Gram αρνητικών βακτηρίων εμφανίζονται τα τελευταία χρόνια (Lim et al., 2014; Oliveira et al., 2016).

3.2.5.5 Η παρουσία και ο χαρακτηρισμός νέων αυτοκατευθυνόμενων ενδονουκλεασών (ΑΕ) αποκαλύπτει στοιχεία για την εξελικτική πορεία των βακτηριοφάγων

Και οι δύο βακτηριοφάγοι που παρουσιάζονται σε αυτήν την υποενότητα φέρουν στα γονιδιώματά τους μεταθετές αυτοκατευθυνόμενες ενδονουκλεάσες (ΑΕ) (τρανζποσόνια ή αυτοκατευθυνόμενες ενδονουκλεάσες, homing endonucleases). Πιο συγκεκριμένα ο βακτηριοφάγος φGrn1 φέρει μία μεταθετή ενδονουκλεάση, ενώ ο βακτηριοφάγος φέρει 3. Εντοπίστηκαν συντηρημένα μοτίβα αμινοξικών περιοχών και αναγνωρίστηκαν οι οικογένειες όπου ανήκουν όλες, ενώ ταυτόχρονα έγινε και μελέτη συντένιας για να εντοπιστούν πιθανές περιοχές που εμφανίζονται οι συγκεκριμένες ενδονουκλεάσες και σε άλλα φαγικά ή βακτηριακά γονιδιώματα, πληροφορίες που μπορούν να βοηθήσουν να κατανοηθεί η προέλευση (βακτηριακή ή φαγική) των γειτονικών γονιδίων ή των ευρύτερων γονιδιακών περιοχών, αλλά και να χαρακτηρίσουμε καλύτερα την φυλογένεια των βακτηριοφάγων μεταξύ τους (Εικόνα 3.17). Η ενδονουκλεάση του βακτηριοφάγου φGrn1 βρίσκεται στη θέση 90.429 και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 238 αμινοξέων. Ανήκει στην οικογένεια seg-like καθώς εμπεριέχει το συντηρημένο μοτίβο GIY YIG της ομώνυμης υπεροικογένειας. Ο αλγόριθμος DELTA-BLAST έδειξε 43% ομοιότητα με την ενδονουκλεάση του βακτηριοφάγου S16 που λύνει βακτήρια του είδους Salmonella sp. (YP 007501215) με 51% ευθυγράμμιση μεταξύ των αλληλουχιών (E-value = 9 × e^{-23}). Αναφορικά με τους φάγους για Vibrio, μία ενδονουκλεάση του ValKK3 παρουσιάζει μεγαλύτερη ομοιότητα με μία seg-like ενδονουκλεάση (AJT61075) με ποσοστό ευθυγράμμισης 52% (Εvalue=2 x e-22). Ο αλγόριθμος BlastX δεν μπόρεσε να την ταυτοποιήσει με καμία γνωστή πρωτεΐνη. Βρίσκεται σε μια γονιδιωματική περιοχή μετά το γονίδιο που κωδικοποιεί για την κύρια καψιδιακή πρωτεΐνη (Major Capsid protein, MCP), νέα για Vibrio βακτηριοφάγους, αλλά κοινή με τον βακτηριοφάγο T4 αν και με αντίστροφο προσανατολισμό (Εικόνα 3.17 Α).

Σχετικά με τον βακτηριοφάγο φSt2 φέρει τρεις ΑΕ. Η πρώτη είναι μια mob-like ενδονουκλεάση, αφού εμπεριέχει το συντηρημένο μοτίβο HNHc (ALP47430) και βρίσκεται στην περιοχή 240309. Έχει 98% ομοιότητα με την έως τώρα νέα ενδονουκλεάση του βακτηριοφάγου φpp2 (Lin και Lin, 2012) (AFN37352) και με ποσοστό ευθυγράμμισης 100% (E-value=6 x e^{-150}). Ακόμη βρίσκεται και στην ίδια ακριβώς γονιδιακή περιοχή (Εικόνα 3.17 Β) αποκαλύπτοντας πιθανή εξελικτική σχέση μεταξύ των δύο βακτηριοφάγων. Οι άλλες δύο ενδονουκλεάσες χαρακτηρίζονται ως seg-like, καθώς και οι δύο εμπεριέχουν το συντηρημένο μοτίβο GIY YIG. Πιο συγκεκριμένα η δεύτερη (ALP47453) στις 216143 βάσεις, φαίνεται να έχει μόνο 46% ομοιότητα με μια ενδονουκλεάση του ValKK3 (AJT61075) με ποσοστό ευθυγράμμισης 97% (E-vallue=3 x e^{-43}) και επομένως θα πρέπει να καταγραφεί ως μια καινοφανής πρωτεΐνη επίσης. Ο βακτηριοφάγος φpp2, έχει και εκείνος μια αντίστοιχα εδρασμένη μεταθετή ενδονουκλεάση ακριβώς μετά το γονίδιο regA, αν και για τον φSt2 εδράζεται λίγο νωρίτερα (Εικόνα 3.17 C). Τέλος η τρίτη μεταθετή ενδονουκλεάση (ALP47432) στις 6477 βάσεις εμπεριέχει τρεις κύριες συντηρημένες αμινοξικές περιοχές. Εκτός από την GIY_YIG, εμπεριέχει δύο επαναλαμβανόμενες συντηρημένες αμινοξικές περιοχές (tandem repeats) της περιοχής NUMOD3 (Sitbon και Pietrokovski, 2003) και έχει ομοιότητα (90% ομοιότητα, 100% ποσοστό ευθυγράμμισης και E-value=4 x e⁻⁸⁰) με μία segD του βακτηριοφάγου KVP40 (NP_899393), αν και προηγουμένως είχε αναφερθεί και περιγραφεί σαν νέα ενδονουκλεάση. Εδράζεται στην ίδια περιοχή όπως του KVP40, μετά τα γονίδια που κωδικοποιούν για regIIA και regIIB (early lysis protectors) και υποδηλώνει πιθανή εξελικτική σχέση μεταξύ των βακτηριοφάγων (Εικόνα 3.17 D). Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώθηκαν και μετά από την κατασκευή φυλογενετικού δέντρου που αφορά αποκλειστικά τις ΑΕ, όπου συμπεριλήφθηκε μεγάλος αριθμός μεταθετών ενδονουκλεασών βακτηριοφαγικών γονιδιωμάτων και βακτηριακών (Εικόνα 3.18).



Εικόνα 3.17: Μελέτη συντένιας των χαρακτηρισμένων αυτοκατευθυνόμενων ενδονουκλεασών και των γειτονικών γονιδίων. Το ανοιχτό κίτρινο αντιπροσωπεύει τις ενδονουκλεάσες. Τα ιδίου χρώματος βέλη αντιπροσωπεύουν ομόλογα γονίδια. Οι γονιδιωματικές περιοχές ευθυγραμμίστηκαν με βάση τα κόκκινα βέλη. (A) για την καινοφανή ενδονουκλεάση *segD* του βακτηριοφάγου φGrn1 και τα γειτονικά γονίδια. 1 για prohead assembly protein, 2 για Major Capsid protein και 3 για inhibitor of prohead lysis. (B) Γονιδιωματική περιοχή της ενδονουκλεάσης mob-like του βακτηριοφάγου φSt2. 2 για GTP cyclohydrolase I. 4 για hypothetical protein. (C) Για την καινοφανή *seg-like* ενδονουκλεάση του φSt2 και τα γειτονικά γονίδια. 2 και 3 DNA polymerase clamp loader subunit. 4 για regA. (D) Για την *segD* ενδονουκλεάση του φSt2. 1 για rIIA protector, 2 για rIIB protector και 3 για hypothetical protein.

Χαρακτηριστικό των φαγικών γονιδιωμάτων είναι το «μωσαϊκό» διαφόρων γονιδίων (genomic shuffling) που φαίνεται ότι φέρουν με έναν από τους λόγους που εμφανίζεται αυτό το φαινόμενο να είναι η ύπαρξη των ΑΕ. Με υψηλής προτεραιότητας στόχο να σιγουρεύουν την παρουσία τους στα φαγικά (και όχι μόνο) γονιδιώματα, αυτά τα «εγωιστικά» DNA στοιχεία, έχουν τη δυνατότητα να εμφανίζονται σε γονιδιακές αλληλουχίες τυχαία, χωρίς όμως να διακινδυνεύουν την βιωσιμότητα του ιού (Sandegren et al., 2005). Αυτή τους η δυνατότητα μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την μετάθεση και γειτνιακών γονιδιακών περιοχών (Belfort, 1991). Οι Lin και Lin (2012) περιέγραψαν την ύπαρξη μοναδικών ΑΕ στον βακτηριοφάγο φρρ2, σαν απόδειξη ότι μπορεί να έχει προέλθει από μια διαφορετική εξελικτική πίεση από ότι ο

βακτηριοφάγος ΚVP40, αν και ανήκουν στον ίδιο κλάδο βακτηριοφάγων ("schizoT4like"). Η «εγωιστική» τους δράση λοιπόν, μπορεί όντως να διαλευκάνει εξελικτικά φαινόμενα στην φαγική βιολογία. Στην δική μας περίπτωση ο βακτηριοφάγος φSt2, αν και γεωγραφικά έχει απομονωθεί πολύ μακριά από ότι οι φpp2 και KVP40 (οι οποίοι έχουν απομονωθεί από την θαλάσσια περιοχή της βορειοανατολικής Ασίας), μπορεί να πρόκειται για έναν εξελικτικό συνδετικό κρίκο μεταξύ του KVP40 και φpp2, αφού φέρει και τις δύο νέες, μέχρι πρότινος, ΑΕ, όπως φαίνεται στα αποτέλεσμα της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Ένα τέτοιο φαινόμενο μπορεί ακόμη να υποστηριχτεί και από την μολυσματική ικανότητα του βακτηριοφάγου φSt2, που μπορεί να μολύνει και είδη του V. parahaemolyticus (στέλεχος VH2, Kalatzis et al., 2016), το οποίο είναι και ο κύριος ξενιστής των φpp2 και KVP40. Πέρα από παρόμοια εξελικτικά φαινόμενα που μπορούν να αποκαλύψουν οι ΑΕ, είναι και η ποικιλομορφία που προσδίδουν στους φάγους (Lin and Lin, 2012), απαραίτητο στοιχείο στον συνεχόμενο «αγώνα» της συνεξέλιξης με τους ξενιστές τους, ενώ ταυτόχρονα μπορούν να είναι και υπεύθυνες για την γονιδιακή ρύθμιση των γειτνιακών περιοχών (αφού φέρουν δικούς τους προαγωγείς πολλές φορές) υπογραμμίζοντας τη σημαντικότητα, ώστε να εντοπίζονται και να χαρακτηρίζονται κατά τις εργασίες που αφορούν συγκριτικές γονιδιωματικές (Edgell et al., 2010; Stoddard, 2014). Τέλος όσον αφορά τον βακτηριοφάγο φGrn1, φέρει μία μόνο νέα ΑΕ, αλλά σε μια γονιδιακή περιοχή που φέρει και ο T4, γεγονός μαρτυρά την εξελικτική σχέση του με τους Τ4 βακτηριοφάγους, αλλά συνάμα συνεισφέρει στην ποικιλομορφία των "schizoT4like" ιών. Μελλοντικές έρευνες σε νεοαλληλουχημένους βακτηριοφάγους θα μπορέσουν να βοηθήσουν στην περαιτέρω κατανόηση της εξελικτικής πορείας αυτών των παρασιτικών μορφών ζωής.



Εικόνα 3.18: Φυλογενετικό δέντρο μέγιστης πιθανής ομοιότητας (Maximum likelihood tree) μεταξύ διαφόρων φαγικών και βακτηριακών μεταθετών ενδονουκλεασών. Οι αριθμοί στις διακλαδώσεις αντιπροσωπεύουν τις τιμές αυτοδυναμίας για 100 επαναλήψεις (bootstrap 100). Μόνο οι σημαντικές τιμές αυτοδυναμίας παρουσιάζονται. Οι ΑΕ των βακτηριοφάγων που περιγράφονται σε αυτήν την ενότητα είναι υπογραμμισμένες.

3.2.6 Ο βακτηριοφάγος Aphrodite1

Ο τρίτος βακτηριοφάγος που παρουσιάζεται στην παρούσα διδακτορική διατριβή απομονώθηκε από το λιμάνι της περιοχής Πευκί στην βόρεια Εύβοια. Έγινε χαρακτηρισμός των βιολογικών του χαρακτηριστηκών, αλλά και του γονιδιώματός τους. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία έδειξε ότι πρόκειται και αυτός για έναν βακτηριοφάγο της οικογένειας *Myoviridae*, αφού φαίνεται η συσπασώμενη ουρά του ιού (Εικόνα 3.19 Β) αλλά με εμφανή διαφορές σε σχέση με τους 2 προηγούμενους. Το μήκος της κεφαλής του είναι ~65 nm, ενώ το πλάτος 74 nm. Το μήκος της ουράς του αντιστοιχεί σε 125 nm, ενώ έχει ένα μεσαίου μεγέθους εύρος ξενιστών, έχοντας τη δυνατότητα να λύσει εκτός από *Vibrio alginolyticus* και *Vibrio harveyi* (Πίνακας 3.6). Η μελέτη των βιολογικών του χαρακτηριστικών, έδειξε ότι έχει τη δυνατότητα να ολοκληρώσει έναν κύκλο λύσης σε 80 min.



Εικόνα 3.19: Ηλεκτρονική μικροσκοπία του βακτηριοφάγου Aphrodite1. Διακρίνεται η μεγάλη σε μέγεθος κεφαλής (Α) και η συσπασμένη ουρά (Β).

Έχει χρόνο απορρόφησης για το 95% των ιοσωματιδίων τα 12 λεπτά, ενώ διαθέτει μέγεθος έκρηξης για κάθε κύτταρο τους 65 φάγους. Ο μεγάλος χρόνος λύσης του, που είναι τουάχιστον 70 min (Διάγραμμα 3.2), προδιαθέτει ένα πολύπλοκο γονιδίωμα με αρκετά βιοχημικά μονοπάτια, ενώ έχει τη δυνατότητα να αναστέλλει την βακτηριακή ανάπτυξη τουλάχιστον για 10 ώρες μετά την έναρξη της συγκαλλιέργειας με αναλογία ιού: βακτηρίων MOI:100 (Διάγραμμα 3.3).



Διάγραμμα 3.2: Μονοφασική καμπύλη ανάπτυξης ιοσωματιδίων βακτηριοφάγου Aphrodite1. Ο χρόνος απορρόφησης των ιοσωματιδίων αντιστοιχεί τουλαχιστον στο 95 % αυτών. Λογαριθμική σχέση τίτλου βακτηριοφάγων ανάλογα με τον χρόνο (±SE).







Εικόνα 3.20: Ανάλυση πηκτής αγαρόζης 300 ng DNA με περιοριστικών ενδονουκλεασών του γονιδιώματος του Aphrodite1. Θέσεις: 1 →λ/HindIII, 2 →γονιδίωμα χωρίς πέψη, 3 → BamH1, 4 →Sca1.

Πρωτού γίνει η αλληλούχιση του γονιδιώματος πραγματοποιήθηκε και η πέψη του με περιοριστικά ένζυμα (Εικόνα 3.20). Σε αντίθεση με τους φGrn1 και φSt2 το ένζυμο BamHI, έχει τη δυνατότητα να δράσει έναντι του γονιδιώματος του Aphrodite1, ενώ και το ένζυμο Scal μπορεί και δρα με ακόμα μεγαλύτερη ικανότητα.

Πίνακας 3.6. Εύρος ξενιστών του βακτηριοφάγου Aphrodite1. Η λυτική ικανότητα εκφράζεται (+) σε σχέση με την λυτικότητα που εμφανίζει ο ιός απέναντι στο βακτήριο *V. alginolyticus* στέλεχος V1 που είναι και ο κύριος ξενιστής του.

Βακτήρια		
Είδη	Στελέχη/ Αριθμός συλλογής	Aphrodite1
Vibrio alginolyticus (Host)	V1	++++
Vibrio alginolyticus	V2	++
Vibrio alginolyticus	HCMR collection	+
Vibrio alginolyticus	DSM2173	+
Vibrio harveyi	DSM 19623	-
Vibrio harveyi	VIB391	+
Vibrio anguillarum	VIB391	-
Vibrio anguillarum	90-11-286	-
Vibrio anguillarum	9014/8	-
Vibrio anguillarum	VIB64	-

3.2.6.1 Γονιδιωματική ανάλυση του βακτηριοφάγου Aphrodite1

Φέρει ένα αρκετά μεγάλο γονιδίωμα σε μέγεθος με αρκετά μεγάλο αριθμό ανοιχτών αναγνωστικών πλαισίων, παρόλα αυτά από την πρώτη στιγμή φάνηκε ότι φυλογενετικά απέχει από τους φGrn1 και φSt2. Πιο συγκεκριμένα ανήκει σε έναν αρκετά μελετημένο κλάδο βακτηριοφάγων (όχι όσο όμως οι "schizoT4like") τον "phiKZlikevirus" και επομένως λογικό ήταν να μελετηθεί αυτόνομα. Το γονιδίωμα του βακτηριοφάγου προσδιορίστηκε στις 237,722 bp και με ποσοστό GC 43.4%. Με στόχο να εντοπιστούν τα σημεία έναρξης και λήξης της μεταγραφής του γονιδιώματος κατασκευάστηκε σωρευτικό διάγραμμα GC (Εικόνα 3.21). Φαίνεται ότι το σημείο έναρξης είναι στις 13984 βάσεις και λήξης στις 81292, όπου υπάρχει και το υψηλότερο ποσοστό GC.



Εικόνα 3.21: Σωρευτικό διάγραμμα GC που δείχνει τα πιθανά σημεία έναρξης και λήξης της μεταγραφής για κάθε γονιδίωμα, που εξαρτώνται από το ποσοστό GC.

Συνολικά προβλέφθηκαν *in silico* 198 γονίδια από τα οποία τα 152 κωδικοποιούν για υποθετικές πρωτεΐνες (hypothetical protein), ενώ δε φαίνεται να φέρει κάποια αλληλουχία που κωδικοποιεί για μεταφορικό RNA (tRNA) (Εικόνα 3.22, Πίνακας 3.7) σε αντίθεση με τον *φ*KZ βακτηριοφάγο, που ήταν και ο πρώτος του συγκεκριμένου κλάδου που μελετήθηκε και που φέρει 7.

1	1,000	2,000	3,000	4,000	5,000	6,000	7,000	8,000	9,000	10,000	11,000	12,000	13,000	
14,000	15,000	16,000	17,000	18,000	19,000	20,000	21,000	22,000	23,000	24,000	25,000	26,000	27,000	
28,000	29,000	30,000	31,000	32,000	33,000	34,000	35,000	36,000	37,000	38,000	39,000	40,000	41,000	
42,000	43,000	44,000	45,000	46,000	47,000	48,000	49,000	50,000	51,000	52,000	53,000	54,000	55,000	
56,000	57,000	58,000	59,000	60,000	61,000	62,000	63,000	64,000	65,000	66,000	67,000	68,000	69,000	
70,000	71,000	72,000	73,000	74,000	75,000	76,000	77,000	78,000	79,000	80,000	81,000	82,000	83,000	
84,000	85,000	86,000	87,000	88,000	89,000	90,000	91,000	92,000	93,000	94,000	95,000	96,000	97,000	_
98,000	99,000	100,000	101,000	102,000	103,000	104,000	105,000	106,000	107,000	108,000	109,000	110,000	111,000	_
112,000	113,000	114,000	115,000	116,000	117,000	118,000	119,000	120,000	121,000	122,000	123,000	124,000	125,000	
126,000	127,000	128,000	129,000	130,000	131,000	132,000	133,000	134,000	135,000	136,000	137,000	138,000	139,000	
140,000	141,000	142,000	143,000	144,000	145,000	148,000	147,000	148,000	149,000	150,000	151,000	152,000	153,000	-
154,000	155,000	156,000	157,000	158,000	159,000	160,000	161,000	162,000	163,000	164,000	165,000	166,000	167,000	
168,000	169,000	170,000	171,000	172,000	173,000	174,000	175,000	176,000	177,000	178,000	179,000	180,000	181,000	_
182,000	183,000	184,000	185,000	186,000	187,000	188,000	189,000	190,000	191,000	192,000	193,000	194,000	195,000	
196,000	197,000	198,000	199,000	200,000	201,000	202,000	203,000	204,000	205,000	206,000	207,000	208,000	209,000	<u>)</u>
210,000	211,000	212,000	213,000	214,000	215,000	216,000	217,000	218,000	219,000	220,000	221,000	222,000	223,000	
224,000	225,000	226,000	227,000	228,000	229,000	230,000	231,000	232,000	233,000	234,000	235,000	236,000	237,000 237	722

Εικόνα 3.22: Γονιδιακός χάρτης του βακτηριοφάγου Aphrodite1. Τα βέλη αναπαριστούν τις κωδικές περιοχές με τον αντίστοιχο προσανατολισμό. Χρώματα: Σκούρο πράσινο → γονίδια σχετικά με την μεταγραφή, αντιγραφή και πακετάρισμα του DNA. Μωβ χρώμα → το γονίδιο που κωδικοποιεί την τσαπερόνη GroEL. Μπλε→ γονίδια σχετικά με την δομή του ιωσωματιδίου. Γκρι→ υποθετικές πρωτεΐνες.

Πίνακας 3.7. Τα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια του βακτηριοφάγου Aphrodite1.	
---	--

Ονομα	Μήκος (nt)	Αρχή	Τέλος	Κατεύθυνση	Protein_id
putative virion structural protein CDS	3	635	633	forward	AUR81025.1
hypothetical protein CDS	637	1149	513	forward	AUR81040.1
hypothetical protein CDS	1151	1885	735	forward	AUR81010.1
hypothetical protein CDS	1946	2449	504	reverse	AUR81043.1
hypothetical protein CDS	2513	3115	603	forward	AUR81029.1
hypothetical protein CDS	3096	3497	402	forward	AUR81070.1
hypothetical protein CDS	3593	4723	1131	forward	AUR80974.1
hypothetical protein CDS	4776	6950	2175	reverse	AUR80924.1
endolysin CDS	7000	14055	7056	reverse	AUR80910.1
hypothetical protein CDS	14078	15685	1608	forward	AUR80938.1
putative RNA polymerase beta subunit CDS	15688	20037	4350	forward	AUR80913.1
hypothetical protein CDS	20040	20894	855	forward	AUR80998.1
hypothetical protein CDS	20894	21055	162	forward	AUR81099.1
hypothetical protein CDS	21058	22548	1491	forward	AUR80945.1
hypothetical protein CDS	22565	23299	735	forward	AUR81009.1
putative virion structural protein CDS	23292	24185	894	forward	AUR80994.1
hypothetical protein CDS	24297	24962	666	forward	AUR81019.1
hypothetical protein CDS	25076	25522	447	forward	AUR81057.1
hypothetical protein CDS	25671	26114	444	forward	AUR81060.1
hypothetical protein CDS	26185	26298	114	forward	AUR81105.1
hypothetical protein CDS	26295	26777	483	forward	AUR81050.1
hypothetical protein CDS	26780	27439	660	forward	AUR81020.1
hypothetical protein CDS	27436	27918	483	forward	AUR81049.1
hypothetical protein CDS	27915	28433	519	forward	AUR81038.1
hypothetical protein CDS	28472	28951	480	forward	AUR81051.1
putative metal-dependent phosphohydrolase CDS	29082	29870	789	forward	AUR81003.1
thymidylate synthase CDS	29872	30780	909	forward	AUR80992.1

Αποτελέσματα και Συζήτηση			159			
hypothetical protein CDS	31362	31508	147	forward	AUR81102.1	
hypothetical protein CDS	32153	32869	717	forward	AUR81015.1	
hypothetical protein CDS	32873	33442	570	forward	AUR81032.1	
hypothetical protein CDS	33445	33834	390	forward	AUR81075.1	
hypothetical protein CDS	33831	34988	1158	forward	AUR80972.1	
hypothetical protein CDS	35218	35589	372	forward	AUR81076.1	
hypothetical protein CDS	35589	35888	300	forward	AUR81093.1	
hypothetical protein CDS	35976	36239	264	forward	AUR81097.1	
putative tail tube protein CDS	36397	37296	900	reverse	AUR80993.1	
hypothetical protein CDS	37301	39436	2136	reverse	AUR80926.1	
putative virion structural protein CDS	39582	40460	879	forward	AUR80997.1	
hypothetical protein CDS	40485	43067	2583	forward	AUR80918.1	
putative virion structural protein CDS	43060	47826	4767	forward	AUR80911.1	
hypothetical protein CDS	47837	58426	10590	forward	AUR80908.1	
lg-like domain protein CDS	58574	66220	7647	forward	AUR80909.1	
hypothetical protein CDS	66309	69524	3216	forward	AUR80915.1	
thymidylate kinase CDS	69708	70331	624	reverse	AUR81027.1	
putative virion structural protein CDS	70390	71760	1371	reverse	AUR80954.1	
putative virion structural protein CDS	71760	72605	846	reverse	AUR809999.1	
hypothetical protein CDS	72895	73488	594	forward	AUR81031.1	
hypothetical protein CDS	75147	75539	393	forward	AUR81073.1	
hypothetical protein CDS	76031	77035	1005	forward	AUR80986.1	
hypothetical protein CDS	77066	78085	1020	forward	AUR80984.1	
hypothetical protein CDS	79507	80265	759	forward	AUR81006.1	
hypothetical protein CDS	80593	81372	780	forward	AUR81005.1	
hypothetical protein CDS	81444	82622	1179	forward	AUR80971.1	
lactose operon transcriptional activator CDS	82610	83335	726	forward	AUR81012.1	
Msm operon regulatory protein CDS	83328	84029	702	forward	AUR81017.1	
chain A monomeric subunit of Tubz CDS	84528	85493	966	forward	AUR80988.1	
hypothetical protein CDS	85889	86344	456	forward	AUR81055.1	

hypothetical protein CDS	86860	87189	330	forward	AUR81086.1
hypothetical protein CDS	87179	87505	327	forward	AUR81088.1
hypothetical protein CDS	87483	87812	330	forward	AUR81085.1
hypothetical protein CDS	87842	88249	408	forward	AUR81068.1
hypothetical protein CDS	88315	88752	438	forward	AUR81062.1
hypothetical protein CDS	88811	90883	2073	forward	AUR80930.1
hypothetical protein CDS	90919	92025	1107	reverse	AUR80977.1
hypothetical protein CDS	92248	94314	2067	forward	AUR80931.1
putative DNA helicase CDS	94409	95896	1488	forward	AUR80946.1
hypothetical protein CDS	96221	96409	189	forward	AUR81098.1
hypothetical protein CDS	96409	97065	657	forward	AUR81021.1
hypothetical protein CDS	97091	97567	477	forward	AUR81052.1
hypothetical protein CDS	97641	97769	129	forward	AUR81104.1
putative virion structural protein CDS	97832	98254	423	forward	AUR81064.1
hypothetical protein CDS	98235	99122	888	forward	AUR80995.1
hypothetical protein CDS	99144	100268	1125	forward	AUR80975.1
hypothetical protein CDS	100265	101062	798	forward	AUR81002.1
hypothetical protein CDS	101136	101858	723	forward	AUR81014.1
hypothetical protein CDS	101972	103546	1575	forward	AUR80940.1
hypothetical protein CDS	103597	105078	1482	forward	AUR80947.1
hypothetical protein CDS	105165	106580	1416	forward	AUR80952.1
hypothetical protein CDS	106647	107273	627	forward	AUR81026.1
hypothetical protein CDS	107326	107646	321	reverse	AUR81090.1
hypothetical protein CDS	107742	109844	2103	forward	AUR80928.1
DNA-directer RNA polymerase beta subunit CDS	109822	111807	1986	forward	AUR80932.1
putative helicase CDS	111930	113348	1419	forward	AUR80951.1
hypothetical protein CDS	113415	113765	351	forward	AUR81082.1
hypothetical protein CDS	113770	114186	417	forward	AUR81065.1
hypothetical protein CDS	114159	114566	408	forward	AUR81067.1
hypothetical protein CDS	114579	115019	441	forward	AUR81061.1

Διδακτορική διατριβή Δημήτριου Γ. Σκληρού

Αποτελέσματα και Συζήτηση			161			
hypothetical protein CDS	115192	116490	1299	reverse	AUR80959.1	
putative virion structural protein CDS	116465	117391	927	reverse	AUR80990.1	
hypothetical protein CDS	117421	118146	726	forward	AUR81011.1	
hypothetical protein CDS	118139	119761	1623	forward	AUR80937.1	
hypothetical protein CDS	119818	120216	399	forward	AUR81072.1	
hypothetical protein CDS	120293	120850	558	forward	AUR81035.1	
hypothetical protein CDS	121002	121361	360	forward	AUR81079.1	
putative DNA polymerase CDS	121424	123190	1767	reverse	AUR80935.1	
putative virion structural protein CDS	123274	124602	1329	forward	AUR80958.1	
hypothetical protein CDS	124604	125014	411	forward	AUR81066.1	
tail length tape-measure protein CDS	125025	126488	1464	forward	AUR80948.1	
hypothetical protein CDS	126485	127207	723	forward	AUR81013.1	
hypothetical protein CDS	127254	130193	2940	reverse	AUR80916.1	
putative virion structural protein CDS	130175	131218	1044	reverse	AUR80982.1	
capsid and scaffold protein CDS	131254	132375	1122	forward	AUR80976.1	
putative virion structural protein CDS	132375	133256	882	forward	AUR80996.1	
hypothetical protein CDS	133268	133777	510	forward	AUR81041.1	
hypothetical protein CDS	133770	135035	1266	forward	AUR80963.1	
hypothetical protein CDS	135038	135991	954	forward	AUR80989.1	
hypothetical protein CDS	136049	137332	1284	forward	AUR80961.1	
hypothetical protein CDS	137406	138596	1191	forward	AUR80969.1	
hypothetical protein CDS	138614	139813	1200	forward	AUR80968.1	
hypothetical protein CDS	139918	141168	1251	forward	AUR80964.1	
hypothetical protein CDS	141215	142489	1275	forward	AUR80962.1	
hypothetical protein CDS	142614	143852	1239	forward	AUR80966.1	
hypothetical protein CDS	143943	145031	1089	forward	AUR80979.1	
hypothetical protein CDS	145041	146453	1413	forward	AUR80953.1	
putative virion structural protein CDS	146523	148127	1605	forward	AUR80939.1	
putative virion structural protein CDS	148131	149420	1290	forward	AUR80960.1	
hypothetical protein CDS	149422	150123	702	forward	AUR81016.1	

putative virion structural protein CDS	150125	151456	1332	forward	AUR80956.1
hypothetical protein CDS	151576	153015	1440	forward	AUR80949.1
hypothetical protein CDS	153072	153470	399	forward	AUR81071.1
hypothetical protein CDS	153686	153997	312	forward	AUR81091.1
hypothetical protein CDS	154235	155074	840	forward	AUR81000.1
hypothetical protein CDS	155071	155568	498	forward	AUR81045.1
hypothetical protein CDS	155565	156071	507	forward	AUR81042.1
hypothetical protein CDS	156086	156490	405	forward	AUR81069.1
hypothetical protein CDS	156487	156945	459	forward	AUR81054.1
hypothetical protein CDS	157360	159183	1824	forward	AUR80934.1
hypothetical protein CDS	159188	159538	351	forward	AUR81081.1
hypothetical protein CDS	159600	159926	327	forward	AUR81087.1
DNA helicase CDS	159998	161536	1539	reverse	AUR80942.1
hypothetical protein CDS	161582	162148	567	forward	AUR81033.1
capsid and scaffold protein CDS	162248	164443	2196	forward	AUR80923.1
hypothetical protein CDS	164625	165695	1071	forward	AUR80980.1
hypothetical protein CDS	165739	167412	1674	forward	AUR80936.1
hypothetical protein CDS	167409	169892	2484	forward	AUR80920.1
hypothetical protein CDS	169952	170515	564	forward	AUR81034.1
hypothetical protein CDS	170519	171523	1005	forward	AUR80985.1
hypothetical protein CDS	171520	172269	750	forward	AUR81008.1
hypothetical protein CDS	172420	172863	444	forward	AUR81059.1
hypothetical protein CDS	172948	173313	366	forward	AUR81078.1
hypothetical protein CDS	173363	176269	2907	reverse	AUR80917.1
hypothetical protein CDS	176290	178401	2112	forward	AUR80927.1
putative virion structural protein CDS	178461	179375	915	forward	AUR80991.1
hypothetical protein CDS	179441	179977	537	forward	AUR81036.1
hypothetical protein CDS	179958	180311	354	forward	AUR81080.1
hypothetical protein CDS	180359	180505	147	reverse	AUR81101.1
hypothetical protein CDS	180801	181190	390	reverse	AUR81074.1

Αποτελέσματα και Συζήτηση			163			
hypothetical protein CDS	181194	182429	1236	reverse	AUR80967.1	
tail fiber protein CDS	182508	184649	2142	forward	AUR80925.1	
minor tail protein CDS	184770	188039	3270	forward	AUR80914.1	
minor tail protein CDS	188078	190288	2211	forward	AUR80922.1	
hypothetical protein CDS	190290	192800	2511	forward	AUR80919.1	
phage baseplate protein CDS	192849	193901	1053	reverse	AUR80981.1	
DNA double-strand break repair Rad50 ATPase CDS	193952	196429	2478	forward	AUR80921.1	
hypothetical protein CDS	196520	196792	273	forward	AUR81096.1	
hypothetical protein CDS	196853	197296	444	forward	AUR81058.1	
hypothetical protein CDS	197306	197941	636	forward	AUR81024.1	
DNA ligase CDS	197928	199889	1962	forward	AUR80933.1	
hypothetical protein CDS	199920	200222	303	forward	AUR81092.1	
hypothetical protein CDS	200250	201494	1245	forward	AUR80965.1	
hypothetical protein CDS	201552	202034	483	forward	AUR81048.1	
hypothetical protein CDS	202207	203175	969	forward	AUR80987.1	
ribonuclease HI CDS	203200	203724	525	forward	AUR81037.1	
hypothetical protein CDS	203721	204041	321	forward	AUR81089.1	
hypothetical protein CDS	204104	204595	492	forward	AUR81047.1	
hypothetical protein CDS	204605	205249	645	forward	AUR81022.1	
hypothetical protein CDS	205252	206397	1146	forward	AUR80973.1	
heat shock protein 60 family chaperone CDS	206470	208029	1560	forward	AUR80941.1	
hypothetical protein CDS	208130	208279	150	forward	AUR81100.1	
hypothetical protein CDS	208937	209065	129	forward	AUR81103.1	
thymidine kinase CDS	209195	209791	597	forward	AUR81030.1	
hypothetical protein CDS	209850	211034	1185	forward	AUR80970.1	
hypothetical protein CDS	211108	215631	4524	forward	AUR80912.1	
hypothetical protein CDS	215759	216511	753	forward	AUR81007.1	
hypothetical protein CDS	216559	217578	1020	forward	AUR80983.1	
hypothetical protein CDS	217582	217914	333	forward	AUR81083.1	
hypothetical protein CDS	218005	218457	453	forward	AUR81056.1	

hypothetical protein CDS	218505	219002	498	forward	AUR81044.1
hypothetical protein CDS	219004	219474	471	forward	AUR81053.1
hypothetical protein CDS	219494	219985	492	forward	AUR81046.1
DNA helicase CDS	220048	222129	2082	reverse	AUR80929.1
hypothetical protein CDS	222177	223532	1356	forward	AUR80955.1
hypothetical protein CDS	223585	223875	291	forward	AUR81095.1
hypothetical protein CDS	224771	226294	1524	forward	AUR80944.1
hypothetical protein CDS	226342	227433	1092	forward	AUR80978.1
hypothetical protein CDS	227423	227719	297	forward	AUR81094.1
hypothetical protein CDS	227776	228288	513	forward	AUR81039.1
hypothetical protein CDS	228295	229074	780	forward	AUR81004.1
hypothetical protein CDS	229074	229748	675	forward	AUR81018.1
hypothetical protein CDS	229760	230377	618	forward	AUR81028.1
hypothetical protein CDS	230367	230696	330	forward	AUR81084.1
hypothetical protein CDS	230758	231393	636	reverse	AUR81023.1
putative virion structural protein CDS	231386	232714	1329	reverse	AUR80957.1
hypothetical protein CDS	232755	233186	432	forward	AUR81063.1
hypothetical protein CDS	233279	234811	1533	forward	AUR80943.1
hypothetical protein CDS	234850	235659	810	reverse	AUR81001.1
hypothetical protein CDS	235716	237152	1437	forward	AUR80950.1
hypothetical protein CDS	237212	237577	366	forward	AUR81077.1

Όπως προαναφέραμε δεν έχουν βρεθεί πολλοί βακτηριοφάγοι που ανήκουν στον κλάδο "phiKZlikevirus". Πιο συγκεκριμένα σύμφωνα με την GenBank, υπάρχουν άλλοι τέσσερις πιθανοί τέτοιοι βακτηριοφάγοι του γένους Vibrio. Ο pTD1 (AP017972), ο VP4B (KC131130) ο pVA-21 (KY499642) και ο φJM-2012 (JQ340088), ο οποίος φυλογενετικά βρίσκεται και αρκετά μακριά από τους υπολοίπους (Jang et al., 2017). Πιο συγκεκριμένα μετά από ευθυγράμμιση με τον αλγόριθμο LastZ ολόκληρων των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, φάνηκε 76.8 % ομοιότητα του Aphrodite1 με τον pTD1 και 62 % με τον VP4B. Η μελέτη συντένιας με το λογισμικό MAUVE έδειξε ότι αυτοί οι τρεις βακτηριοφάγοι φυλογενετικά είναι αρκετά κοντά, αφού υπάρχει συντένια στο 100% των γονιδιωμάτων με μόλις 3 ξεχωριστές συντενιακές περιοχές. Δύο μικρές με μέγεθος 2660 bp και 4251 bp και μία μεγαλύτερη που αντιπροσωπεύει το ~97% του γονιδιώματος 230624 bp (Εικόνα 3.23). Σαν κλάδος ο "phiKZlikevirus" έχει μελετηθεί καθώς υπάρχουν αρκετοί βακτηριοφάγοι που έχουν τη δυνατότητα να λύνουν το γένος Pseudomonas. Τελευταία όμως χαρακτηρίζονται όλο και περισσότεροι βακτηριοφάγοι που ανήκουν σε αυτόν τον κλάδο, έχοντας όμως διαφορετικούς ξενιστές, όπως περίπτωση Aphrodite1. και στην του



Εικόνα 3.23: Πολλαπλή ευθυγράμμιση πλήρων γονιδιωμάτων με το λογισμικό MAUVE και τους ήδη κατατεθειμένους βακτηριοφάγους του γένους Vibrio στην Gen-Bank pTD1 και VP4B. Οι περιοχές ιδίου χρώματος δείχνουν την συντένια των γονιδιακών περιοχών και τα διαγράμματα μέσα σε αυτές τις περιοχές το ποσοστό συντένιας. Οι λευκές περιοχές αντιπροσωπεύουν νέες γονιδιακές περιοχές.

3.2.6.2 Γονιδιακά χαρακτηριστικά του Vibrio βακτηριοφάγου Aphrodite1

Είναι αρκετά σημαντικό μία συγκριτική γονιδιωματική μελέτη να συμπεριλαμβάνει οργανισμούς (βακτηριοφάγους στην παρούσα περίπτωση) με αρκετά μεγάλη ποικιλομορφία. Μέσα σε αυτό το πλαίσιο έγινε απομόνωση και πλήρης χαρακτηρισμός του Aphrodite1, ενός βακτηριοφάγου με αρκετά ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά. Είναι ταυτόχρονα αρκετά σημαντικό το ότι έχει χαρακτηριστεί αρκετά ένας βακτηριοφάγος μοντέλο (ο *φ*KZ) ο οποίος έχει σημαντικά χαρακτηριστικά και έχει μελετηθεί αρκετά.

Η κατάταξη στον συγκεκριμένο κλάδο δεν έχει να κάνει τόσο με την φυλογένεια του συγκεκριμένου βακτηριοφάγου με τον *φ*KZ (αφού έχουν και διαφορετικούς ξενιστές, με τον *φ*KZ ιό να μολύνει το γένος *Pseudomonas*), αλλά περισσότερο με τους μηχανισμούς δράσης εντός του κυττάρου.

Αν και φέρει μικρή ομολογία με τον βακτηριοφάγο μοντέλο *φ*ΚΖ, παρόλα αυτά φέρει ταυτόχρονα 3 γονιδιακά χαρακτηριστικά που μας επιτρέπουν να τον κατατάξουμε στον κλάδο "phiKZlikevirus" (Lavysh, et al., 2016).

Πιο συγκεκριμένα:

- Φέρει ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για μια υπομονάδα προκαρυωτικής τουμπουλίνης (*TubZ*).
- Φέρει ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη με δράση τσαπερόνης
 GroEL (Heat shock protein 60 family chaperone GroEL).
- Φέρει γονίδια που κωδικοποιούν για 2 διαφορετικές RNA πολυμεράσες (DNAdirected RNA polymerases). Η μία είναι βακτηριακής προέλευσης και η δεύτερη απαντάται και σε άλλους βακτηριοφάγους. Πιθανά ρυθμίζουν την μεταγραφή των φαγικών γονιδίων χωριστά στην αρχή (η μία) και στην μέση και τέλος της μόλυνσης (η δεύτερη). Οι συγκεκριμένες γονιδιακές περιοχές φέρουν υψηλή συντένια με τις αντίστοιχες του βακτηριοφάγου φKZ, αλλά και άλλων βακτηριοφάγων του κλάδου "phiKZlikevirus".

Οι παραπάνω μοριακοί μηχανισμοί, σε συνδυασμό με την υψηλή του ομολογία με τον χαρακτηρισμένο ως "phiKZlikevirus" φJM-2012 (JQ340088) (Jang et al., 2017), είναι στοιχεία που επιτρέπουν να καταταγεί στον κλάδο "phiKZlikevirus".

3.2.6.3 Ο βακτηριοφάγος Aphrodite1 χρησιμοποιεί τον δίκο του κυτταροσκελετό

Το πρώτο ενδιαφέρον στοιχείο του βακτηριοφάγου Aphrodite1, είναι το ότι φέρει ένα γονίδιο TubZ που κωδικοποιεί για μία πρωκαρυωτική τουμπουλίνη (tubulins). Γενικά οι τουμπουλίνες και γενικότερα ο κυτταροσκελετός, θεωρούνταν ότι είναι χαρακτηριστικό των ευκαρυωτικών οργανισμών, παρόλα αυτά έρευνες τα τελευταία χρόνια αποδεικνύουν ότι και οι προκαρυωτικοί οργανισμοί είναι δυνατόν να φέρουν κυτταροσκελετικά στοιχεία (Wickstead και Gull, 2011). Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς τρεις είναι οι κυρίως κλάδοι της υπεροικογένειας των τουμπουλινών. Η FtsZ, ηTubZ και η BtubA/B. Η πρωτεΐνη TubZ πρωτομελετήθηκε όταν φάνηκε ότι κωδικοποιείται από ένα χαμηλών αντιγράφων (low-copy) πλασμίδιο του γένους Bacillus, όπου λειτουργούσε σαν ένα σύστημα «ασφάλειας» κατά την διαμοίραση των νέων αντιγράφων DNA στη διάρκεια της διαδικασίας της μίτωσης του κυττάρου (Gerdes et al., 2010). Στην περίπτωση των βακτηριοφάγων εμφανίζονται κυρίως οι τουμπουλίνες τύπου TubZ, όπως και στην παρούσα περίπτωση. Αν και έχουν γίνει αρκετές αναφορές για αυτές στο παρελθόν μία μόνο έχει μελετηθεί πολύ του βακτηριοφάγου Pseudomonas chlororaphis που ονομάστηκε PhuZ (του κλάδου FtsZ) και είναι παρόμοια με τις βακτηριοφαγικές TubZ, ενώ και οι δύο είναι GTP-εξαρτώμενες (GTPdependent) (Haeusser και Margolin, 2012). Όταν υπέρ εκφράστηκε και σημάνθηκε με την φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP, φάνηκε πώς ενώνεται με την βακτηριακή μεμβράνη και λαμβάνει μέρος κατά τον στον εγκλωβισμό του νεοσυντιθέμενου βακτηριοφαγικού γονιδιώματος στα νέο καψίδια των ιοσωματιδίων που σχηματίζονται (Εικόνα 3.24).



Εικόνα 3.24: (Α) Σχηματική αναπαράσταση της δράσης του γονιδίου *PhuZ* κατά τη διάρκεια της μόλυνσης. Φαίνεται πως οι τουμπουλίνες (κρυσταλική απεικόνιση) σχηματίζουν ένα είδος πλέγματος που ξεκινάει από την κυτταρική μεμβράνη και έχουν τη δυνατότητα να συγκρατούν το φαγικό DNA (με μπλε χρώμα) μαζί με άλλα ένζυμα που συμμετέχουν στην αντιγραφή του DNA, καθώς εκείνο ετοιμάζεται για το πακετάρισμα στα νεοσυντιθέμενα ιοσωματίδια (Kraemer et al., 2012). (Β) η αντίστοιχη οργάνωση της τοποθέτησης των βακτηριοφάγων που φέρουν το γονίδιο *TubZ*, όπως ο Aphrodite1 της παρούσας διδακτορικής διατριβής (Ni et al., 2010).

Αντίστοιχα μια παρόμοια βιοχημική διαδικασία λαμβάνει χώρα και για τους "phiKZlikevirus" ιούς με το γονίδιο *TubZ* να κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη τουμπουλίνης που συγχωνεύεται στην κυτταρική μεμβράνη. Στη συνέχεια τα βακτηριοφαγικά γονιδιώματα αντιγράφονται με τον συνεχόμενο κυκλικό τρόπο αντιγραφής (replication rolling cycle) όντας ενσωματωμένα στις τουμπουλίνες, πριν τη ανασύσταση των νέων ιοσωματιδίων (Ni et al., 2010). Ταυτόχρονα αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη TubR του βακτηρίου ξενιστή. Με αυτόν τον τρόπο φαίνεται ότι τελικά ο ρόλος τους είναι να ευθύνονται για την τοποθέτηση του φαγικού DNA και τη συγκράτησή του σε σημεία του κυτταροπλάσματος που βοηθά την πιο αποδοτική και γρήγορη συναρμολόγηση των ιοσωματιδίων (Kraemer et al., 2012).

3.2.6.4 Οι μεγάλοι σε μέγεθος και γονιδίωμα βακτηριοφάγοι, όπως ο Aphrodite1, μπορούν και καθορίζουν μόνοι τους την τεταρτοταγή δομή των πρωτεϊνών τους

Από την πρώτη στιγμή που αλληλουχήθηκε το γονιδίωμα του βακτηριοφάγου Τ4, φάνηκε η ύπαρξη ενός γονιδίου με δράση τσαπερόνης (gp31) και που πιθανά βοηθάει στην ξεδίπλωση και ανασύσταση των μεγάλων πρωτεϊνών, όπως αυτή της μεκαψιδιακής πρωτεΐνης (major capsid protein, MCP). Συνήθως οι γάλης βακτηριοφάγοι κάνουν χρήση τσαπερόνων του ξενιστή αφού δεν κωδικοποιούν δική τους, για μία σημαντική διεργασία, όπως αυτή της σωστής τεταρτοταγούς δομής, ειδικά δομικών πρωτεϊνών. Φαίνεται όμως πως πολλοί λυτικοί βακτηριοφάγοι (φυλογενετικά κοντινοί στον Τ4, αλλά όχι όλοι) κωδικοποιούν μια τσαπερόνη τύπου GroEL, που ενώνεται με αυτήν του ξενιστή και βοηθάει στην σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών (Laemmli, 1970). Γενικά στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια η τσαπερόνη GroEL μαζί με την συντσαπερόνη GroES, έχουν αποδειχτεί ότι μπορούν να βοηθήσουν στην σωστή αναδίπλωση τουλάχιστον του 10-15% των πρωτεϊνών. Ταυτόχρονα φαίνεται ότι οι βακτηριοφαγικές τσαπερόνες GroEL μπορούν να αντικαταστήσουν τις βακτηριακές GroEL στον ρόλο της συντσαπερόνης, αν οι τελευταίες δεν είναι παρούσες στο γονιδίωμα βακτηρίου (Keppel et al., 2002) δείχνοντας το ευρύ φάσμα υποστρωμάτων που μπορούν να έχουν. Γενικά πρόκειται για έναν πολύ καλά μελετημένο μηχανισμό, που ήταν από τους πρώτους που μελετήθηκαν, αφού εντοπίστηκε το συγκεκριμένο γονίδιο στους βακτηριοφάγους, και αποδεικνύει την πληθώρα γονιδιακών «όπλων» που έχουν αποκτήσει οι φάγοι προς την κατεύθυνση να είναι όσο το δυνατόν πιο ανεξάρτητοι γίνεται από τους μηχανισμούς του ξενιστή τους. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή ο βακτηριοφάγος Aphrodite1, όπως και όλοι του κλάδου "phiKZlikevirus" φέρει μία τσαπερόνη τύπου GroEL, που αντίστοιχα είναι πολύ πιθανόν να συμμετέχει σε έναν πιο επιτυχή και αποδοτικό πολλαπλασιασμό.

3.2.6.5 Ο βακτηριοφάγος Aphrodite1 πιθανά δρα ανεξάρτητα από τους μηχανισμούς μεταγραφής του ξενιστή

Ίσως όμως το πιο περίπλοκο και συνάμα αινιγματικό στοιχείο του Aphrodite1 είναι η ύπαρξη δύο αρκετά διαφορετικών υπομονάδων RNA πολυμερασών στο γονιδίωμα του ιού. Το συγκεκριμένο στοιχείο είναι αρκετά χαρακτηριστικό για τους "phiKZlikevirus" ιούς και έχει αναφερθεί σε αρκετούς ανεξάρτητα από το είδος του ξενιστή που διαθέτουν. Γενικά το φαινόμενο της μεταγραφής λαμβάνει χώρα καθολικά από τις DNA-εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες, ένζυμα δηλαδή που έχουν τη δυνατότητα να μεταγράψουν το RNA από μία μήτρα DNA (Cramer, 2002). Ένας τρόπος να καταταχθούν οι RNA πολυμεράσες για χάρην ευκολίας της παρούσας διδακτορικής διατριβής, είναι να διακριθούν ανάμεσα στις μικρές RNA πολυμεράσες που έχουν οι ιοί, οι χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια και τις μεγαλύτερες που βρίσκονται σε αρχαία, βακτήρια και ευκαρυωτικά κύτταρα. Οι περισσότεροι βακτηριοφάγοι δεν κωδικοποιούν δικές τους πολυμεράσες, αλλά χρησιμοποιούν αυτές του ξενιστή είτε αυτούσιες, είτε και μετά από κάποια τροποποίηση (Nechaev και Severinov 2003, 2008). Άλλοι βακτηριοφάγοι, όπως ο T7, αρχικά χρησιμοποιούν την πολυμεράση του ξενιστή για να ξεκινήσει η μεταγραφή κάποιων γονιδίων του, που ανάμεσά του υπάρχει και η RNA πολυμεράση του φάγου. Στη συνέχεια η RNA πολυμεράση του ξενιστή απενεργοποιείται, μεταμεταφραστικά ή με κάποιο μόριο που δένεται σε αυτήν και την απενεργοποιεί, και δεν συνεχίζει να συμμετέχει στην μεταγραφή, που κάνει πλέον αποκλειστικά αυτή του φάγου (Falco et al., 1977, Savalia et a al., 2010). Τέλος οι βακτηριοφάγοι N4-like κάνουν το αντιστρόφο. Φέρουν εντός του καψιδίου τους μία ήδη μεταφρασμένη RNA πολυμεράση, η οποία χρησιμοποιείται για τη μεταγραφή των αρχικών φαγικών γονιδίων ανάμεσα τους και μια φαγική RNA πολυμεράση που ευθύνεται για τη μεταγραφή των γονιδίων της μεσαίας φάσης της μόλυνσης, ενώ στη συνέχεια και για την ολοκλήρωση της μεταγραφής στα τελευταία στάδια, κάνουν χρήση αυτής του ξενιστή (Falco et al., 1977, Gleghorn et al., 2008, Ceyssens et al., 2010). Στην εισαγωγή της παρούσας διδακτορικής διατριβής, μιλήσαμε για το συντηρημένο πρότυπο των φαγικών

ιοσωματιδίων, και πώς αυτή τους η στερεοδιαμόρφωση πιθανά θα μπορούσε να ωφελήσει στην ύπαρξη ενζύμων που βρίσκονται στο καψίδιο ή στην ουρά, έτοιμων να δράσουν κατά την μόλυνση. Οι RNA πολυμεράσες θα μπορούσαν να είναι κάποια τέτοια ένζυμα που φέρουν κάποιοι βακτηριοφάγοι (όχι μόνο οι "phiKZlikevirus") στο καψίδιο και δρουν άμεσα μετά την μόλυνση. Αν και δεν υπάρχει ακόμα καμία ερευνητική εργασία που να έχει απομονώσει πλήρως την ιική RNA πολυμεράση από κάποιον βακτηριοφάγο του κλάδου "phiKZlikevirus", παρόλα αυτά είναι αρκετά πιθανό να πρόκειται για μία πολυμεράση με 5 υπομονάδες οι οποίες βρίσκονται διάσπαρτες στα γονιδιωμάτα αυτών των ιών και μετά την μεταγραφή και τη μετάφραση δημιουργούν ένα λειτουργικό ένζυμο (Lavysh et al., 2017). Όπως και όλοι οι γνωστοί βακτηριοφάγοι αυτού του κλάδου έτσι και ο Aphrodite1 εμπεριέχει αυτές τις 5 υπομονάδες στο γονιδίωμά του. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί ο Vibrio φάγος φJM-2012 ο οποίος όμως αν και καλά κατεταγμένος στον ίδιο κλάδο, φαίνεται ότι έχει αρκετές διαφορές και φυλογενετικά απέχει αρκετά από τους υπόλοιπους γνωστούς phiKZlikevirus ιούς (Jang et al., 2013). Το πιο ενδιαφέρον όμως στοιχείο αυτών των βακτηριοφαγικών RNA πολυμερασών βρίσκεται στην ανεκτικότητα τους στο αντιβιοτικό ριφαμπίνη (rifampin). Το συγκεκριμένο αντιβιοτικό έχει τη δυνατότητα να αναγνωρίζει τα σύμπλοκα των βακτηριακών RNA πολυμερασών και να τις απενεργοποιεί και έχει δράση κατά Gram αρνητικών και θετικών βακτηρίων. Πειράματα με τον φKZ βακτηριοφάγο σε βακτήρια του γένους Pseudomonas απέδειξαν ότι κατά τη διάρκεια της μόλυνσης και παρουσίας του αντιβιοτικού τα ιοσωματίδια συνεχίζουν να συντίθενται και να συναρμολογούνται αποδεικνύοντας ότι πολλοί βακτηροφάγοι του κλάδου "phiKZlikevirus" είναι ανεξάρτητοι από την παρουσία της βακτηριακής RNA πολυμεράσης και μπορούν να μεταγράφουν τα γονίδιά τους μόνοι τους χωρίς να εξαρτώνται από τον ξενιστή (Ceyssens et al., 2014). Φαίνεται ότι και ο βακτηριοφάγος Aphrodite1 που ανήκει στον ίδιο κλάδο και έχει τα ίδια μοριακά εργαλεία με πολλούς phiKZlikevirus βακτηριοφάγους, δυνητικά έχει τον ίδιο βιοχημικό τρόπο πολλαπλασιασμού. Η μόνη περίπτωση που έχει αναφερθεί στο παρελθόν με κάποιον βακτηριοφάγο να είναι τελείως ανεξάρτητος από το

μεταγραφικό σύστημα του ξενιστή είναι ο φάγος PBS2 που μολύνει βάκιλους (*Bacillus*) (Price and Frabota, 1972, Clarck et al., 1974, Clarck, 1978). Γενικά δεν θα πρέπει να θεωρείται δεδομένο ότι κάθε φάγος που ανήκει σε αυτόν τον κλάδο, έχει αυτήν την ιδιότητα, αφού υπάρχουν αρκετές εξαιρέσεις. Μελλοντικές ερευνητικές εργασίες απαιτούνται για να διαλευκάνουν εάν και ο Aphrodite1 κατέχει αυτήν την «μεταγραφική ανεξαρτησία» την ώρα της μόλυνσης. Να σημειώσουμε ότι οι 2 πολύ όμοιοι βακτηριοφάγοι pTD1 (AP017972) και VP4B (KC131130) που εμφανίζονται στα αποτελέσματα φαίνεται ότι ανήκουν και εκείνοι στον ίδιο κλάδο και φέρουν μεγάλη ομοιότητα με τον Aphrodite1, ενώ μολύνουν βακτήρια του είδους *V. parahaemolyticus* και *V. harveyi* αντίστοιχα (Zhuhua et al., 2014). Τέλος και ο βακτηριοφάγος pVa-21 (KY499642) αποτελεί και εκείνος τον δεύτερο βακτηριοφάγο του ίδιου κλάδου με δυνατότητα να μολύνει *V. alginolyticus* και αποτελεί πρόσφατη προσθήκη στην παγκόσμια τράπεζα γονιδιωμάτων, σε έναν κλάδο υπομελετημένο (Lavysh et al., 2016) και με συνεχόμενα αυξανόμενο αριθμό βακτηριοφάγων με ποικίλους ξενιστές.

3.2.7 Ο βακτηριοφάγος Ares1

Ο βακτηριοφάγος Ares1 είναι ο μοναδικός της παρούσας διδακτορικής διατριβής που ανήκει στην οικογένεια *Siphoviridae* και απομονώθηκε από την παράκτια ζώνη του νομού Αττικής και πιο συγκεκριμένα από την περιοχή της Μαρίνας Φλοίσβου. Αρχικά η οικογένεια του ιού χαρακτηρίστηκε από την ηλεκτρονική μικροσκοπία, όπου φάνηκε ότι έχει μια πολύ μακριά μη συσταλτή ουρά, χαρακτηριστικό της οικογένειας *Siphoviridae* (Εικόνα 3.25).



Εικόνα 3.25: Ηλεκτρονική μικροσκοπία του βακτηριοφάγου Ares1. Διακρίνεται η μεγάλη σε μήκος ουρά του βακτηριοφάγου, χαρακτηριστικό της οικογένειας *Siphoviridae*.

Το μήκος της κεφαλής του είναι ~41 nm, ενώ το πλάτος ~47 nm. Το μήκος της ουράς του είναι 135 nm. Η πολυφασική καμπύλη ανάπτυξης έδειξε ότι πρόκειται για έναν βακτηριοφάγο, όπου έχει τη δυνατότητα να ολοκληρώσει τον βιολογικό του κύκλο σε 30 min. Έχει χρόνο προσρόφησης για το 95% των ιοσωματιδίων μόλις 6 min και έχει μέγεθος έκρηξης ~17 φάγους/κύτταρο (Διάγραμμα 3.4). Πρόκειται για ένα μικρό μέγεθος έκρηξης για αυτήν την οικογένεια βακτηριοφάγων σε σχέση με αυτό που παρουσιάζεται για τον βακτηριοφάγο λ, που έχει περίπου ~153 ιοσωματίδια/κύτταρο (Wang et al., 2009). Το μεσαίο μέγεθος κεφαλής και ο μικρός αριθμός φάγων μετά το πέρας του βιολογικού του κύκλου προδιαθέτει για ένα σχετικά μεσαίου μεγέθους γονιδίωμα, ενώ έχει τη δυνατότητα να αναστείλει την ανάπτυξη του κύριου ξενιστή του για τουλάχιστον 10 ώρες μετά την έναρξη της συγκαλλιέργειας, με αναλογία MOI: 100 (Διάγραμμα 3.5).



Διάγραμμα 3.4: Μονοφασική καμπύλη ανάπτυξης ιοσωματιδίων βακτηριοφάγου Ares1. Ο χρόνος απορρόφησης των ιοσωματιδίων αντιστοιχεί τουλαχιστον στο 95 % αυτών. Λογαριθμική σχέση τίτλου βακτηριοφάγων ανάλογα με τον χρόνο (±SE).



Διάγραμμα 3.5: Λυτική ικανότητα *in vitro* του βακτηριοφάγου Aphrodite1 με MOI:100.

Πρωτού γίνει η αλληλούχιση του γονιδιώματος πραγματοποιήθηκε και πέψη του με περιοριστικά ένζυμα (Εικόνα 3.26). Σε αντίθεση με τους φGrn1 και φSt2 το ένζυμο Scal να μπορεί να δράσει αρκετά και να πέψει το γονιδίωμά του.

Η μελέτη του εύρους ξενιστών έδειξε ότι ο βακτηριοφάγος Ares1 έχει ένα στενό εύρος, έχοντας τη δυνατότητα να μολύνει με μικρή λυτικότητα και άλλα στελέχη του είδους *V. alginolyticus*, αλλά και *V. harveyi* (Πίνακας 3.8).



Εικόνα 3.26: Ανάλυση πηκτής αγαρόζης περιοριστικών ενδονουκλεασών του γονιδιώματος του Ares1. Θέσεις: 1 →λ/HindIII, 2 →γονιδίωμα χωρίς πέψη, 3 → BamH1, 4 →Sca1.

Πίνακας 3.8: Εύρος ξενιστών του βακτηριοφάγου Ares1. Η λυτική ικανότητα εκφράζεται (+) σε σχέση με την λυτικότητα που εμφανίζει ο ιός απέναντι στο βακτήριο *V. alginolyticus* στέλεχος V1 που είναι και ο κύριος ξενιστής του.

Βακτήρια		
Είδη	Στελέχη/ Αριθμός συλλογής	Ares1
Vibrio alginolyticus (Host)	V1	++++
Vibrio alginolyticus	V2	-
Vibrio alginolyticus	HCMR collection	+
Vibrio alginolyticus	DSM2173	-
Vibrio harveyi	DSM 19623	-
Vibrio harveyi	VIB391	+
Vibrio anguillarum	VIB391	-
Vibrio anguillarum	90-11-286	-
Vibrio anguillarum	9014/8	-
Vibrio anguillarum	VIB64	-

3.2.7.1 Γονιδιωματική ανάλυση του βακτηριοφάγου Ares1

Σε αντίθεση με όλους τους υπόλοιπους βακτηριοφάγους που παρουσιάζονται στην παρούσα διδακτορική διατριβή, ο Ares1 αποτελεί έναν βακτηριοφάγο της οικογένειας *Siphoviridae*. Μετά την ανασύσταση του γονιδιώματός του φάνηκε ότι έχει μέγεθος 80500 bp και ποσοστό GC 45.1%, ενώ το λογισμικό Glimmer3 προέβλεψε τουλάχιστον 119 πιθανά αναγνωστικά πλαίσια, τα οποία αντιστοιχήθηκαν σε 119 γονίδια από τα οποία τα 109 γονίδια είναι υποθετικές πρωτεΐνες (hypothetical proteins) άγνωστης λειτουργίας (Εικόνα 3.28, Πίνακας 3,9). Το σημείο έναρξης της μεταγραφής προβλέπεται στην περιοχή των 961 βάσεων και τέλος τις 51041 βάσεις (Εικόνα 3.33, Εικόνα 3.27). Τέλος δεν εντοπίστηκαν καθόλου μεταφορικά RNA (tRNA).



Εικόνα 3.27: Σωρευτικό διάγραμμα GC που δείχνει τα πιθανά σημεία έναρξης (θέση 961) και λήξης (θέση 51041) της μεταγραφής το γονιδίωμα του Ares1, που εξαρτώνται από το ποσοστό GC.

1	250	500	750	1,000	1,250	1,500	1,750	2,000	2,250	2,5	00 2	,750	3,000	3,250	3,500	3,75	50 4	,000	4,250	4,500
4,750	5,000	5,250	5,500	5,750	6,000	6,250	6,500	6,750	7,00	0 7,3	250 7	,500	7,750	8,000	8,250	8,5	ioo 8	8,750	9,000	9,250
9,500	9,750	10,000	10,250	10,500	10,750	11,000	11,250	11,50) 11,7	50 12	.000	12,250	12,500	12,750	13,00	0 13	,250	13,500	13,750	14,000
14,250	14,500	14,750	15,000	15,250	15,500	15,750	16,000	16,25	0 16,	500 1	6,750	17,000	17,250	17,500	17,7	50 18	3,000	18,250	18,500	18,750
19,000	19,250	19,500	19,750	20,000	20,250	20,500	20,750	21,0	00 21	250 2	21,500	21,750	22,000	22,250	22,5	00 2	2,750	23,000	23,250	23,500
23,750	24,000	24,250	24,500	24,750	25,000	25,250	25,500	25,	750 26	000	26,250	26,500	26,750	27,000) 27,	250 2	27,500	27,750	28,000	28,250
28,500	28,750	29,000	29,250	29,500	29,750	30,000	30,250) 30,	500 3	0,750	31,000	31,250	31,500	31,75	0 32	,000	32,250	32,500	32,750	33,000
33,250	33,500	33,750	34,000	34,250	34,500	34,750	35,00	0 35	,250 ;	35,500	35,750	36,000	36,25	0 36,5	00 30	3,750	37,000	37,250	37,500	37,750
38,000	38,250	38,500	38,750	39,000) 39,25	0 39,500	39,7	50 4	0,000	40,250	40,500	40,750	41,00	10 41,2	250 4	1,500	41,750	42,000	42,250	42,500
42,750	43,000	43,250	43,50) 43,75	o 44,o)0 44,25	0 44,5	00 4	4,750	45,000	45,250	45,500	45,7	50 46,	000	48,250	46,500	46,750	47,000	47,250
47,500	47,750	0 48,000	0 48,25	i0 48,5	00 48,7	50 49,0)0 49,	250	49,500	49,750	50,000	50,25	0 50,	500 50	,750	51,000	51,250	51,500	51,750	52,000
52,25	0 52,50	0 52,75	io 53,0	00 53,2	50 53,	500 53,7	50 54	.000	54,250	54,500	54,750	55,0	00 55	.250 5	5,500	55,750	56,000	56,25	0 56,50	0 56,750
57,00	0 57,2	50 57,5	00 57,3	750 58,	000 58	250 58,	500 58	8,750	59,000	59,250	59,500	59,7	750 60	.000 6	10,250	60,500	60,750	0 61,00	0 61,2	50 61,500
61,7	50 62,0	00 62,2	250 62,	500 62	,750 63	,000 63	,250 6	3,500	63,750	64,000	64,25	0 64,	500 6	4,750	65,000	65,250	65,50	0 65,7	50 66,0	00 66,250
66,5	500 66,	750 67,	000 67	,250 6	7,500 6	7,750 6	3,000	68,250	68,500	68,750	69,00	0 69	,250	39,500	69,750	70,000	70,25	50 70,9	500 70.	750 71,000
71	250 71	,500 71	,750 7	2,000 7	2,250	72,500 7	2,750	73,000	73,250	73,50	73,7	50 74	ŧ,000	74,250	74,500	74,750	75,0	100 75,	250 75	,500 75,750
76	3,000 70	8,250 70	6,500	76,750	77,000	77,250	77,500	77,750	78,000	78,25	i0 78,5	500 7	8,750	79,000	79,250	79,50	0 79,	750 80	0,000 8	0,250 80,500

Εικόνα 3.28: Ο γονιδιωματικής χάρτης του βακτηριοφάγου Ares1 με επισημασμένα τα γονίδια που αντιστοιχούν στα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια που προβλέφθηκαν.
Очоµа	Μήκος (nt)	Αρχή	Τέλος	Κατεύθυνση	Protein_id
hypothetical protein CDS	115	459	345	forward	AUR81185.1
hypothetical protein CDS	469	732	264	forward	AUR81208.1
hypothetical protein CDS	870	1160	291	forward	AUR81199.1
hypothetical protein CDS	1170	1472	303	forward	AUR81196.1
hypothetical protein CDS	1484	2008	525	forward	AUR81149.1
hypothetical protein CDS	1996	2280	285	forward	AUR81201.1
hypothetical protein CDS	2350	3138	789	forward	AUR81135.1
hypothetical protein CDS	3221	5170	1950	forward	AUR81110.1
hypothetical protein CDS	5246	5587	342	forward	AUR81186.1
hypothetical protein CDS	5719	6330	612	forward	AUR81141.1
hypothetical protein CDS	6333	7520	1188	forward	AUR81120.1
major capsid protein CDS	7606	8556	951	forward	AUR81128.1
hypothetical protein CDS	8632	8925	294	forward	AUR81198.1
hypothetical protein CDS	8937	9575	639	forward	AUR81140.1
hypothetical protein CDS	9572	10036	465	forward	AUR81158.1
hypothetical protein CDS	10033	10524	492	forward	AUR81155.1
hypothetical protein CDS	10578	11372	795	forward	AUR81134.1
hypothetical protein CDS	11462	11884	423	forward	AUR81169.1
hypothetical protein CDS	11962	12084	123	forward	AUR81224.1
tail length tape measure protein CDS	12092	16231	4140	forward	AUR81106.1
hypothetical protein CDS	16228	16614	387	forward	AUR81174.1
hypothetical protein CDS	16625	17614	990	forward	AUR81125.1
hypothetical protein CDS	17626	18504	879	forward	AUR81130.1
hypothetical protein CDS	18522	19820	1299	forward	AUR81118.1
hypothetical protein CDS	19823	20347	525	forward	AUR81150.1
hypothetical protein CDS	20348	20650	303	forward	AUR81197.1

Πινάκας 3.9. Τα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια του βακτηριοφάγου Ares1.

hypothetical protein CDS	20647	20874	228	forward	AUR81214.1
hypothetical protein CDS	20864	21298	435	forward	AUR81167.1
hypothetical protein CDS	21301	21840	540	forward	AUR81148.1
AAA family ATPase CDS	21964	23184	1221	forward	AUR81119.1
hypothetical protein CDS	23576	25165	1590	forward	AUR81113.1
hypothetical protein CDS	25165	25758	594	forward	AUR81142.1
replicative DNA helicase CDS	25743	27191	1449	forward	AUR81114.1
hypothetical protein CDS	27263	27847	585	forward	AUR81143.1
hypothetical protein CDS	27840	28826	987	forward	AUR81126.1
hypothetical protein CDS	28837	29763	927	forward	AUR81129.1
putative DNA helicase CDS	29811	31238	1428	forward	AUR81116.1
hypothetical protein CDS	31334	31789	456	forward	AUR81160.1
hypothetical protein CDS	31794	32183	390	forward	AUR81173.1
RecA protein CDS	32196	33272	1077	forward	AUR81122.1
hypothetical protein CDS	33253	33666	414	forward	AUR81172.1
hypothetical protein CDS	33656	34651	996	forward	AUR81124.1
hypothetical protein CDS	34652	35212	561	forward	AUR81145.1
hypothetical protein CDS	35314	36288	975	forward	AUR81127.1
hypothetical protein CDS	36351	36641	291	forward	AUR81200.1
hypothetical protein CDS	36667	37410	744	forward	AUR81136.1
hypothetical protein CDS	37489	38220	732	forward	AUR81137.1
hypothetical protein CDS	38231	39040	810	forward	AUR81133.1
hypothetical protein CDS	39027	41003	1977	forward	AUR81109.1
hypothetical protein CDS	41015	41257	243	forward	AUR81210.1
hypothetical protein CDS	41358	41630	273	forward	AUR81204.1
hypothetical protein CDS	41669	41935	267	forward	AUR81207.1
hypothetical protein CDS	41925	42374	450	forward	AUR81164.1
pyruvate phosphate dikinase CDS	42409	44484	2076	forward	AUR81108.1
hypothetical protein CDS	44489	44971	483	forward	AUR81156.1
putative protein-tyrosine phosphatase CDS	44971	45519	549	forward	AUR81147.1

hypothetical protein CDS	45541	46554	1014	forward	AUR81123.1
hypothetical protein CDS	46565	47422	858	forward	AUR81131.1
DNA polymerase I CDS	47422	49779	2358	forward	AUR81107.1
portal protein CDS	49781	51646	1866	forward	AUR81111.1
hypothetical protein CDS	51643	52725	1083	forward	AUR81121.1
adenine DNA methyltransferase CDS	52731	53381	651	forward	AUR81139.1
hypothetical protein CDS	53470	53973	504	forward	AUR81154.1
hypothetical protein CDS	53982	54437	456	forward	AUR81161.1
putative DNA polymerase I CDS	54562	54930	369	forward	AUR81179.1
hypothetical protein CDS	54932	55126	195	forward	AUR81218.1
hypothetical protein CDS	55101	55556	456	forward	AUR81162.1
hypothetical protein CDS	55639	55782	144	forward	AUR81221.1
hypothetical protein CDS	55784	56233	450	forward	AUR81165.1
hypothetical protein CDS	56236	56520	285	forward	AUR81202.1
hypothetical protein CDS	56526	56831	306	forward	AUR81194.1
hypothetical protein CDS	56916	57224	309	forward	AUR81193.1
hypothetical protein CDS	57275	58627	1353	forward	AUR81117.1
hypothetical protein CDS	58593	58877	285	forward	AUR81203.1
hypothetical protein CDS	58886	59338	453	forward	AUR81163.1
hypothetical protein CDS	59331	59843	513	forward	AUR81151.1
hypothetical protein CDS	59853	60086	234	forward	AUR81213.1
hypothetical protein CDS	60153	60284	132	forward	AUR81223.1
hypothetical protein CDS	60755	61198	444	forward	AUR81166.1
hypothetical protein CDS	61195	61383	189	forward	AUR81220.1
hypothetical protein CDS	61370	61792	423	forward	AUR81170.1
hypothetical protein CDS	61789	62514	726	forward	AUR81138.1
hypothetical protein CDS	62501	63319	819	forward	AUR81132.1
hypothetical protein CDS	63322	63645	324	forward	AUR81191.1
hypothetical protein CDS	63780	64286	507	forward	AUR81153.1
hypothetical protein CDS	64349	64918	570	forward	AUR81144.1

hypothetical protein CDS	64955	65197	243	forward	AUR81211.1
hypothetical protein CDS	65317	65511	195	forward	AUR81219.1
hypothetical protein CDS	65526	65909	384	forward	AUR81176.1
hypothetical protein CDS	65960	66292	333	forward	AUR81190.1
hypothetical protein CDS	66305	66673	369	forward	AUR81180.1
hypothetical protein CDS	66673	67182	510	forward	AUR81152.1
hypothetical protein CDS	67179	67595	417	forward	AUR81171.1
hypothetical protein CDS	67651	68016	366	forward	AUR81182.1
hypothetical protein CDS	68037	68420	384	forward	AUR81177.1
hypothetical protein CDS	68420	68791	372	forward	AUR81178.1
hypothetical protein CDS	68846	69214	369	forward	AUR81181.1
hypothetical protein CDS	69269	69604	336	forward	AUR81189.1
hypothetical protein CDS	69660	70121	462	forward	AUR81159.1
hypothetical protein CDS	70108	70464	357	forward	AUR81184.1
hypothetical protein CDS	70600	70800	201	forward	AUR81215.1
hypothetical protein CDS	70864	71202	339	forward	AUR81187.1
hypothetical protein CDS	71205	71510	306	forward	AUR81195.1
hypothetical protein CDS	71514	71750	237	forward	AUR81212.1
hypothetical protein CDS	71879	72076	198	forward	AUR81217.1
hypothetical protein CDS	72079	72222	144	forward	AUR81222.1
hypothetical protein CDS	72340	72540	201	forward	AUR81216.1
hypothetical protein CDS	72590	72859	270	forward	AUR81205.1
hypothetical protein CDS	72859	73128	270	forward	AUR81206.1
hypothetical protein CDS	73125	74561	1437	forward	AUR81115.1
hypothetical protein CDS	74654	75214	561	forward	AUR81146.1
hypothetical protein CDS	75350	77209	1860	forward	AUR81112.1
hypothetical protein CDS	77374	77688	315	forward	AUR81192.1
hypothetical protein CDS	77776	78138	363	forward	AUR81183.1
hypothetical protein CDS	78188	78436	249	forward	AUR81209.1
hypothetical protein CDS	78438	78824	387	forward	AUR81175.1

hypothetical protein CDS	78821	79252	432	forward	AUR81168.1
hypothetical protein CDS	79323	79661	339	forward	AUR81188.1
hypothetical protein CDS	79674	80150	477	forward	AUR81157.1

Αν και η συγκεκριμένη οικογένεια βακτηριοφάγων είναι αρκετά πολυπληθείς, συνήθως αναφέρεται σε βακτηριοφάγους που είναι ήπιοι και όχι λυτικοί. Για αυτόν τον σκοπό μετά την αλληλούχιση του γονιδιώματος του βακτηριοφάγου η πρώτη συγκριτική γονιδιωματική ανάλυση, ήταν με τον *Vibrio* βακτηριοφάγο της οικογένειας *Siphoviridae*, pVa-2 (KX581094), ο οποίος έχει καταταχθεί στον κλάδο "H-20like" (Kalatzis et al., 2017). Η μεγαλύτερη διαφορά που υπάρχει ανάμεσα σε λυτικούς και ήπιους βακτηριοφάγου είναι η ύπαρξη ενός γονιδίου που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη ιντεγκράσης (Integrase) και είναι ο κύριος λόγος που θα πρέπει συστηματικά να γίνονται συγκριτικές γονιδιωματικές αναλύσεις με στόχο να διαπιστωθεί αν ένας βακτηριοφάγος, ειδικά αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για βιολογικό έλεγχο παθογόνων βακτηρίων, είναι λυτικός ή όχι. Η ανάλυση έδειξε ότι δεν υπάρχει κανένα αναγνωστικό πλαίσιο στο γονιδίωμα του Ares1 που να κωδικοποιεί για μία παρόμοια φαγική ιντεγκράση (Εικόνα 3.29).

 1
 10
 20
 30
 40
 60
 70
 80

 MAKLRNGLTVKEAANAKPKDKPYRLSDGGGLYLLVRVSGEKAWECRYIKESNGKPTFAGLGSYPDISLSEARDKALDIKRMVSEGIDP
 Phage integrase CDS
 90
 100
 100
 170
 80

 90
 100
 110
 120
 130
 140
 150
 100
 170
 170

 91
 100
 100
 120
 130
 140
 150
 100
 170

 92
 100
 120
 120
 130
 140
 150
 100
 170

 92
 100
 120
 120
 130
 140
 150
 100
 170

 92
 100
 200
 210
 220
 230
 240
 250
 260

 180
 190
 200
 200
 210
 230
 230
 330
 340
 350

 92
 270
 280
 290
 300
 310
 320
 330
 340
 350

 92
 270
 280
 290
 300
 310
 320
 330
 340
 350

 92

Εικόνα 3.29: Η αμινοξική αλληλουχία της ιντεγκράσης του ήπιου βακτηριοφάγου pVA-2, αναγνωστικό πλαίσιο που απουσιάζει από τον λυτικό βακτηριοφάγου Ares1 της ίδιας οικογένειας (*Siphoviridae*).

Στην παγκόσμια τράπεζα γονιδιωμάτων, υπάρχουν άλλοι εννέα (Φεβρουάριος, 2018) βακτηριοφάγοι αλληλουχημένοι της οικογένειας *Siphoviridae* που μολύνουν το γένος *Vibrio*, με τον VHS1 (JF713456) και τον SHOU24 (KF623293) να είναι οι μόνοι πλήρως χαρακτηρισμένοι, με κύριους ξενιστές τα *Vibrio harveyi* και *Vibrio parahaemolyticus* αντίστοιχα. Οι βακτηριοφάγοι αυτής της οικογένειας μπορούν να έχουν μέγεθος γονιδιώματος από ~40.000 bp έως ~80.000 bp. Η μεγαλύτερη ομοιότητα του Ares1 φαίνεται να υπάρχει με τον βακτηριοφάγο VHS1. Η ανάλυση της γονιδιακής οργάνωσης των δύο βακτηριοφάγων έδειξε ότι το γονιδίωμα χωρίζεται σε δύο επί μέρους περιοχές 20.465 βάσεων και 60462 βάσεων (Εικόνα 3.30), ενώ η ομοιότητα των δύο βακτηριοφάγων φτάνει μόλις το 82.6 % μετά την ευθυγράμμιση ολόκληρων των δύο γονιδιωμάτων με τον αλγόριθμο του LastZ. Ο VHS1 έχει βιολογικό κύκλο που έχει χαρακτηριστεί εν μέρει λυσιγονικός. Φαίνεται όμως ότι δεν ενσωματώνει το γονιδίωμά του σε αυτό του ξενιστή αλλά παραμένει πιθανά σε μορφή πλασμιδίου στο κυτταρόπλασμα (Pasharawipas et al., 2008).

Κωδικοποιώντας για μια δική τους DNA πολυμεράση, οι συγκεκριμένοι βακτηριοφάγοι φαίνεται ότι δε χρειάζονται να εξαρτώνται για την αντιγραφή από τους μοριαμηχανισμούς βακτηρίου, τυπικό χαρακτηριστικό των κούς του λυτικών βακτηριοφάγων ανεξάρτητα από την οικογενείας στην οποία ανήκουν, σε αντίθεση με τους λυσιγονικού τύπου βακτηριοφάγους. Ακόμη κωδικοποιεί και για μία DNA μεθυλμεταφοράση (Adenine DNA methyltransferase, phage-associated) η οποία έχει τη δυνατότητα να μεθυλιώνει το dsDNA του βακτηριοφάγου, ώστε να δυσκολεύει τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες του βακτηρίου να δράσουν κατά του. Κατά τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής, ο βακτηριοφάγος Ares1 παρουσίαζε με συνέπεια λυτική δράση. Λόγω της ομοιότητάς του με τον βακτηριοφάγο VHS1 περαιτέρω πειραματικές αποδείξεις θα ενίσχυαν την πεποίθηση ότι πρόκειται για πραγματικά λυτικό βακτηριοφάγο. Τέλος όπως και ο βακτηριοφάγος λ της ίδιας οικογένειας, διαθέτει και αυτός ένα ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο που πιθανά κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που έχει τη δυνατότητα να αποφωσφορυλιώνει πρωτεΐνες του βακτηρίου και πιθανά να τις απενεργοποιεί, διακόπτοντας τις φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου την ώρα της μόλυνσης, αλλά και τη μετάδοση σημάτων (Voegtli et al., 2000).



Εικόνα 3.30: Ανάλυση γονιδιακής οργάνωσης με το λογισμικό MAUVE που δείχνει τις δύο επί μέρους περιοχές υψηλής γονιδιακής συντένιας. Οι περιοχές ιδίου χρώματος δείχνουν την συντένια των γονιδιακών περιοχών και τα διαγράμματα μέσα σε αυτές τις περιοχές το ποσοστό συντένιας. Οι λευκές περιοχές αντιπροσωπεύουν τις νέες γονιδιακές περιοχές.

3.2.7.2 Οι βακτηριοφάγοι της οικογένειας *Siphoviridae*, όπως ο Ares1, μπορούν να μεταβάλουν την μολυσματικότητα των *Vibrio*.

Οι βακτηριοφάγοι της οικογένειας Siphoviridae είναι υψηλά συσχετισμένοι με λυσιγονικούς τρόπους δράσης την ώρα της μόλυνσης και συνήθως βρίσκονται στα βακτηριοφαγικά γονιδιώματα σαν προφαγικά γονιδιακά στοιχεία μετά από αλληλουχίσεις, ενώ πολύ ενδιαφέρουσα είναι και η διασπορά τους στα οικοσυστήματα (Kalatzis, et al., 2017). Η περίπτωση όμως του Ares1 δε φαίνεται να είναι μία από αυτές. Καθ'όλη την παρούσα διδακτορική διατριβή είχε ένα σταθερό λυτικό προφίλ σε συγκαλλιέργειες με το βακτήριο-ξενιστή, ενώ όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο υποκεφάλαιο, μετά την αλληλούχιση του γονιδιώματός του δεν βρέθηκε κάποιο χαρακτηριστικό (ίσως το γονίδιο της ιντεγκράσης) που να του προσδίδει λυσιγονικό χαρακτήρα. Φυλογενετικά, όπως αναφέρθηκε, είναι πολύ κοντά με τον βακτηριοφάγο VHS1 (JF713456), έναν άλλο εκπρόσωπο της οικογένειας Siphoviridae, ο οποίος στο παρελθόν έχει υπάρξει και αντικείμενο μελέτης αρκετών ερευνητικών εργασιών. Έχει δειχθεί στο παρελθόν ότι ο συγκεκριμένος βακτηριοφάγος παρουσιάζει φαινόμενα ψευδολυσιγονίας, και αποκτά λυτικό χαρακτήρα, όταν εκείνος θεωρεί καταλληλότερο το περιβάλλον, χωρίς όμως να ενσωματώνει το γονιδίωμά του σε αυτό του ξενιστή, αλλά να το κρατά σε μορφή πλασμιδίου στο κυτταρόπλασμα (Khemayan et al., 2006, Pasharawipas, et al., 2008). Πιθανά κάτι παρόμοιο να συμβαίνει και με τον βακτηριοφάγο Ares1 με μελλοντικές ερευνητικές εργασίες να διαλευκάνουν τη λυτική του δραστηριότητα απέναντι στο V. alginolyticus. Ίσως το πιο ενδιαφέρον στοιχείο, όμως που παρουσιάζει ο βακτηριοφάγος VHS1, είναι ότι μετά την αλληλεπίδραση με το βακτήριο ξενιστή, μπορεί και επηρεάζει (στα πιθανά ανθεκτικά στον βακτηριοφάγο βακτήρια που δημιουργούνται) την μολυσματική ικανότητα του ξενιστή σε κάποια θαλάσσια είδη, όπως η μαύρη γαρίδα-τίγρης (Penaeus monodon), όπου παρουσιάστηκε αύξηση της μολυσματικότητας έως και 100 φορές με την παραγωγή τον τοξινών που ευθύνονται για την μόλυνση να αυξάνονται δραματικά (Khemayan et al., 2012). Παρόμοιο αποτέλεσμα δε φάνηκε για την γαρίδα

Penaeus [Litopenaeus] vannamei, όπου η μολυσματικότητα παρέμεινε στα φυσιολογικά επίπεδα. Η φαινοτυπική διακύμανση σε ανθεκτικά σε φάγους βακτήρια είναι ένα καλά εδραιωμένο γεγονός. Έχουν μελετηθεί φαινοτυπικά χαρακτηριστικά όπως η κινητικότητα (motility) και μορφολογία των αποικιών, όπου έχει φανεί μεταβολή φαινοτύπου (Laanto et al., 2012). Όπως θα δούμε και στο κεφάλαιο με τα ανθεκτικά στους βακτηριοφάγους βακτήρια, είναι σημαντικό να γίνεται αρκετά εμπεριστατωμένη φαινοτυπική μελέτη βακτηρίων ανθεκτικών σε βακτηριοφάγους.

3.2.8 Ο βακτηριοφάγος Athena1

Ο τελευταίος βακτηριοφάγος που παρουσιάζεται στην παρούσα διδακτορική διατριβή, αναφέρεται σε έναν ιό της οικογένειας *Myoviridae*, που όμως διαφέρει σε αρκετά χαρακτηριστικά σε σχέση με αυτούς που ήδη παρουσιάστηκαν. Πιο συγκεκριμένα, αποτελεί μέλος μιας αρκετάς πολυπληθούς ομάδας βακτηριοφάγων (Comeau, et al., 2012).



Εικόνα 3.31: Ηλεκτρονική μικροσκοπία του βακτηριοφάγου Athena1. Διακρίνεται το μικρό μέγεθος του βακτηριοφάγου, η ισοεδρική κεφαλή του και η συσταλτή ουρά του, χαρακτηριστικό της οικογένειας *Myoviridae*.

Ο συγκεκριμένος βακτηριοφάγος έχει απομονωθεί από τις ακτές του Δήμου Πειραιά και πιο συγκεκριμένα από την περιοχή του Μικρολίμανου. Λόγω ύπαρξης κυρίως της συσταλτής του ουράς ανήκει στην οικογένεια *Myoviridae* (Εικόνα 3.31). Έχει μόλις ~30 nm μήκος καψιδίου και πλάτος ~34 nm. Το μήκος της ουράς του αντιστοιχεί σε ~52 nm, ενώ η πολυφασική καμπύλη ανάπτυξής του μας έδειξε ότι πρόκειται για έναν βακτηριοφάγο με δυνατότητα ολοκλήρωσης του βιολογικού του κύκλου σε 30 min (Διάγραμμα 3.6). Έχει χρόνο απορρόφησης για το 95% των ιοσωματιδίων τα 15 min και μέγεθος έκρηξης τους ~70 φάγους/βακτήριο. Το εύρος ξενιστών του είναι μικρότερο σε σχέση με τους *φ*Grn1 και *φ*St2, αφού μπορεί να αναστείλει μόνο την ανάπτυξη ενός ακόμα στελέχους *Vibrio alginolyticus* και ένα στέλεχος *Vibrio harveyi* (Πίνακας 3.6). Το μικρό μέγεθος της κεφαλής του πιθανά σημαίνει και ένα μικρό σε μέγεθος γονιδίωμα, ενώ έχει τη δυνατότητα να αναστείλει την ανάπτυξη του βακτηριακού ξενιστή του μέχρι και για 10 ώρες μετά την έναρξη της συγκαλλιέργειας, έχοντας MOI: 100 (Διάγρμμα 3.7).



Διάγραμμα 3.6: Μονοφασική καμπύλη ανάπτυξης ιοσωματιδίων βακτηριοφάγου Ares1. Ο χρόνος απορρόφησης των ιοσωματιδίων αντιστοιχεί τουλαχιστον στο 95 % αυτών. Λογαριθμική σχέση τίτλου βακτηριοφάγων ανάλογα με τον χρόνο (±SE).



Διάγραμμα 3.7: Λυτική ικανότητα in vitro του βακτηριοφάγου Athena1 με MOI:100.

Και στον συγκεκριμένο βακτηριοφάγο, πρωτού γίνει η αλληλούχιση του γονιδιώματός του πραγματοποιήθηκε πέψη του γονιδιώματος με περιοριστικά ένζυμα (Εικόνα 3.32). Μόνο το Scal από τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν φαίνεται ότι μπορεί να δράσει στο γονιδίωμα του Athena1 και αυτό περιορισμένα (Εικόνα 3.32).

22kbp	Athena1	Athena1	Athena1

Εικόνα 3.32: Ανάλυση πηκτής αγαρόζης περιοριστικών ενδονουκλεασών του γονιδιώματος του Athena1. Θέσεις: 1 →λ/HindIII, 2 →γονιδίωμα χωρίς πέψη, 3 → BamH1, 4 →Sca1. Πίνακας 3.10: Εύρος ξενιστών του βακτηριοφάγου Athena1. Η λυτική ικανότητα εκφράζεται (+) σε σχέση με την λυτικότητα που εμφανίζει ο ιός απέναντι στο βακτήριο *V. alginolyticus* στέλεχος V1 που είναι και ο κύριος ξενιστής του.

Βακτήρια		
Είδη	Στελέχη/ Αριθμός συλλογής	Athena1
Vibrio alginolyticus (Host)	V1	++++
Vibrio alginolyticus	V2	-
Vibrio alginolyticus	HCMR collection	-
Vibrio alginolyticus	DSM2173	+
Vibrio harveyi	DSM 19623	+
Vibrio harveyi	VIB391	-
Vibrio anguillarum	VIB391	-
Vibrio anguillarum	90-11-286	-
Vibrio anguillarum	9014/8	-
Vibrio anguillarum	VIB64	-

3.2.8.1 Γονιδιωματική ανάλυση βακτηριοφάγου Athena1

Ο τελευταίος βακτηριοφάγος που παρουσιάζεται στην παρούσα διδακτορική διατριβή ανήκει και αυτός ξεκάθαρα, όπως φαίνεται από την μορφολογία του στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, στην οικογένεια *Myoviridae*, αλλά σε αντίθεση με τους υπόλοιπους 3 αυτής της οικογένειας, έχει πολύ μικρό μέγεθος, γεγονός που συνεπάγεται και μικρότερο μέγεθος γονιδιώματος. Έχει μέγεθος γονιδιώματος 39.826 bp, ενώ επισημάνθηκαν τουλάχιστον 60 αναγνωστικά πλαίσια που κωδικοποιούν για πιθανές πρωτεΐνες (Πίνακας 3.11), με την πλειοψηφία τους (~83%) να είναι υποθετικές πρωτεΐνες (hypothetical proteins) άγνωστης λειτουργίας (Εικόνα 3.34). Έχει περιεχόμενο GC 42.6%, ενώ η αρχή της μεταγραφής φαίνεται να λαμβάνει χώρα στις 4837 βάσεις και τέλος στις 39820 βάσεις (Εικόνα 3.33).





Αν και υπάρχουν περίπου 10 Vibrio βακτηριοφάγοι αντίστοιχα που δεν μπορούν να καταταχθούν σε κάποιον γνωστό κλάδο της οικογένειας Myoviridae, ο συγκεκριμένος βακτηριοφάγος παρουσιάζει τα υψηλότερα επίπεδα ομοιότητας με τον VBM1 (NC_020850), έναν λυτικό βακτηριοφάγο που έχει τη δυνατότητα να λύνει είδη των ειδών Vibrio parahaemolyticus και Vibrio alginolyticus και έχει απομονωθεί από την πόλη Στόνινγκτον της πολιτείας Μέιν στις Η.Π.Α. από ένα εκτροφείο αστακών. Ο συγκεκριμένος βακτηριοφάγος έχει γονιδίωμα 38.374 bp και ποσοστό GC 42.3%. Η ομοιότητα των δύο βακτηριοφάγων αγγίζει το 83,2%, μετά από ευθυγράμμιση ολόκληρων των γονιδιωμάτων με τον αλγόριθμο του LastZ, ενώ η ανάλυση της γονιδιαματικές περιοχές, μία 9528 βάσεων και μία 27433 βάσεων, με εμφανή αρκετές μοναδικές περιοχές (Εικόνα 3.35).

1	200	400	600	800	1,000	1,200	1,400	1,600	1,800	2,000	2,200
2,400	2,600	2,800	3,000	3,200	3,400	3,600	3,800	4,000	4,200	4,400	4,600
4,800	5,0	200 5,	,200 5,4	DO 5,60	0 5,800	6,00	0 6,200	6,400	0 6,600	6,800	7,000
	7,200	7,400	7,600	7,800	8,000	8,200 1	8,400	8,600	8,800	9,000 9	,200
9,400	9,600	9,800	10,000	10,200	10,400	10,600	10,800	11,000	11,200	11,400	11,600
11,800	12,000	12,20	0 12,400	12,600	12,800	13,000	13,200	13,400	13, <mark>6</mark> 00	13,800	14,000
14,	,200	14,400	14,600	14,800 15	5,000 15	,200 1	5,400 15	,600 15	5,800 16,	,000 16,20	00 16,400
	16,600	16,800	17,000	17,200	17,400	17,600	17,800	18,000	18,200	18,400	18,600
18,800	19,000	19,200	19,400	19,600	19,800	20,000	20,200	20,400	20,600	20,800	21,000
21,200	. 21,	400 21	1,600 21,8	00 22,00	00 22,20	0 22,40	22,60	0 22,80	0 23,000	23,200	23,400
	23,600	23,800	24,000	24,200	24,400	24,600	24,800	25,000	25,200	25,400 29	5,600
25,800	26,000	26,200	26,400	26,600	26,800	27,000	27,200	27,400	27,600	27,800	28,000
28,200	28,400	28,60	0 28,800	29,000	29,200	29,400	29,600	29,800	30,000	30,200	30,400
30,	600	30, <mark>800</mark>	31,000 3	31,200 31	1,400 31	.600 3 [.]	1,800 32	,000 32	,200 32,	400 32,60	32,800
	33,000	33,200	33,400	33,600	33,800	34,000	34,200	34,400	34,600	34,800	35,000
35,200	35,400	35,600	35,800	36,000	36,200	36,400	36,600	36,800	37,000	37,200	37,400
37,600) 37,	800 38	,000 38,2	38,40	38,60	D 38,8(39,00	0 39,20	0 39,400	39,600	39,826

Εικόνα 3.34: Ο γονιδιωματικός χάρτης του βακτηριοφάγου Athena1 με επισημασμένα τα γονίδια που αντιστοιχούν στα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια που προβλέφθηκαν.

hypothetical protein CDS

tail tubular protein CDS

hypothetical protein CDS

hypothetical protein CDS

hypothetical protein CDS

hypothetical protein CDS

Όνομα	Μήκος (nt)	Αρχή	Τέλος	Κατεύθυνση	Protein_id
hypothetical protein CDS	262	630	369	reverse	AUG84899.1
hypothetical protein CDS	627	785	159	reverse	AUG84913.1
hypothetical protein CDS	775	1071	297	reverse	AUG84906.1
hypothetical protein CDS	1049	1255	207	reverse	AUG84909.1
pesticin domain protein CDS	1252	1797	546	reverse	AUG84888.1
hypothetical protein CDS	2200	2400	201	reverse	AUG84910.1
DNA recombination protein CDS	2400	3356	957	reverse	AUG84873.1
hypothetical protein CDS	3366	3878	513	reverse	AUG84890.1
exodeoxyribonuclease type VIII CDS	3938	6304	2367	reverse	AUG84864.1
hypothetical protein CDS	6452	6649	198	forward	AUG84911.1
hypothetical protein CDS	6653	7399	747	forward	AUG84879.1
hypothetical protein CDS	7496	7648	153	forward	AUG84914.1
hypothetical protein CDS	7638	8168	531	forward	AUG84889.1
hypothetical protein CDS	8345	8974	630	forward	AUG84883.1
origin specific replication initiation factor CDS	9179	10033	855	forward	AUG84874.1
hypothetical protein CDS	10014	10568	555	forward	AUG84887.1
hypothetical protein CDS	10565	10912	348	forward	AUG84904.1
hypothetical protein CDS	10909	11022	114	forward	AUG84920.1
hypothetical protein CDS	11103	11546	444	forward	AUG84895.1
hypothetical protein CDS	11557	11838	282	forward	AUG84907.1
hypothetical protein CDS	11854	12132	279	forward	AUG84908.1

12122

12404

14824

15218

15932

16656

12265

14752

15216

15862

16489

16775

144

2349

393

645

558

120

forward

reverse

forward

forward

forward

forward

Πινάκας 3

AUG84915.1

AUG84865.1

AUG84898.1

AUG84882.1 AUG84886.1

AUG84917.1

hypothetical protein CDS	16778	17524	747	forward	AUG84880.1
hypothetical protein CDS	17527	17691	165	forward	AUG84912.1
hypothetical protein CDS	17693	17809	117	forward	AUG84918.1
hypothetical protein CDS	17895	18011	117	forward	AUG84919.1
hypothetical protein CDS	18270	18869	600	forward	AUG84884.1
DUF2280 domain-containing protein CDS	18880	19350	471	forward	AUG84893.1
terminase CDS	19383	21020	1638	forward	AUG84866.1
hypothetical protein CDS	21052	22290	1239	forward	AUG84870.1
capsid morphogenesis related protein CDS	22283	23092	810	forward	AUG84876.1
hypothetical protein CDS	23096	23677	582	forward	AUG84885.1
hypothetical protein CDS	23725	25182	1458	forward	AUG84868.1
hypothetical protein CDS	25182	25661	480	forward	AUG84892.1
hypothetical protein CDS	25675	26649	975	forward	AUG84872.1
hypothetical protein CDS	26704	27072	369	forward	AUG84900.1
DUF40-54 domain containing protein CDS	27074	27430	357	forward	AUG84901.1
hypothetical protein CDS	27427	27885	459	forward	AUG84894.1
hypothetical protein CDS	27897	28229	333	forward	AUG84905.1
hypothetical protein CDS	28226	28711	486	forward	AUG84891.1
hypothetical protein CDS	28751	30244	1494	forward	AUG84867.1
hypothetical protein CDS	30256	30687	432	forward	AUG84896.1
hypothetical protein CDS	30695	31102	408	forward	AUG84897.1
hypothetical protein CDS	31123	31263	141	forward	AUG84916.1
tail tape measure protein CDS	31322	32761	1440	forward	AUG84869.1
hypothetical protein CDS	32758	33510	753	forward	AUG84878.1
hypothetical protein CDS	33511	33867	357	forward	AUG84902.1
hypothetical protein CDS	33857	34687	831	forward	AUG84875.1
hypothetical protein CDS	34684	35457	774	forward	AUG84877.1
hypothetical protein CDS	35457	35810	354	forward	AUG84903.1
hypothetical protein CDS	35807	37021	1215	forward	AUG84871.1
hypothetical protein CDS	37021	37749	729	forward	AUG84881.1



VBM1

Εικόνα 3.35: Ανάλυση γονιδιακής οργάνωσης με το λογισμικό MAUVE που δείχνει τις δύο επί μέρους περιοχές υψηλής γονιδιακής συντένιας. Οι περιοχές ιδίου χρώματος δείχνουν την συντένια των γονιδιακών περιοχών και τα διαγράμματα μέσα σε αυτές τις περιοχές το ποσοστό συντένιας. Οι λευκές περιοχές αντιπροσωπεύουν τις καινοφανής γονιδιακές περιοχές.

3.2.8.2 Οι μικροί σε μέγεθος και γονιδίωμα Myoviridae βακτηριοφάγοι

Ο βακτηριοφάγος Athena1 έρχεται να προστεθεί σε μια μεγάλη συλλογή βακτηριοφάγων της οικογένειας Myoviridae με μέγεθος γονιδιώματος ~30-50 kbp και μικρό μέγεθος. Αν και αποτελούν μιαμεγάλη ομάδα βακτηριοφάγων είναι πιθανά και οι λιγότερο μελετημένοι (Lavigne et al., 2009). Έχουν στενό εύρος ξενιστών, ενώ ταυτόχρονα έχουν πολύ μικρό αριθμό καλά αναγνωρισμένων ανοιχτών αναγνωστικών πλαισίων (ORF), δυσκολεύοντας τη συγκριτική γονιδιωματική ανάλυση. Παρόλα αυτά όντας πολυπληθείς βακτηριοφάγοι, απαντώνται συχνά σε μεταγονιδιοματικές αναλύσεις και φαίνεται πιθανά συνεισφέρουν πολύ στη γενικότερη διατήρηση της ισορροπίας των βακτηριακών πληθυσμών και των θρεπτικών που έχουν οι ωκεανοί από την λύση των βακτηρίων (Silveira et al., 2017). Ο βακτηριοφάγος Athena1 παρουσιάζει εξαιρετικά μεγάλη ομοιότητα με τον βακτηριοφάγο VBM1 (NC 020850), έναν μη καταταγμένο και εκείνο Myoviridae βακτηριοφάγο με διπλής έλικας DNA με κύριο ξενιστή το V. parahaemolyticus έχοντας τη δυνατότητα να μολύνει και στελέχη του είδους V. alginolyticus και έχοντας απομονωθεί από ιχθυοτροφείο στις Η.Π.Α., δείχνοντας και το μεγάλο γεωγραφικό εύρος που μπορούν να έχουν αυτοί οι βακτηριοφάγοι. Παρόλη την ομοιότητά τους ο VBM1 έχει και μια γονιδιακή περιοχή νέα, που δε φαίνεται να υπάρχει στον Athena1 (Εικόνα 3.35).

Τα γονιδιώματα των μικρών σε μέγεθος *Myoviridae* dsDNA βακτηριοφάγων που μολύνουν Gram αρνητικά βακτήρια, φαίνεται να ομαδοποιούνται με βάση δύο κυρίως λειτουργίες. Αυτήν της μορφολογίας και αυτήν των μοριακών διεργασιών την ώρα της μόλυνσης συμπεριλαμβανομένου και της αντιγραφής, μεταγραφής και μετάφρασης του DNA και τις διεργασίες λύσης ή λυσιγονίας (Comeau et al., 2012). Ο μόνος παρόμοιος βακτηριοφάγος με καλή *in silico* πρόβλεψη γονιδίων είναι ο Phipelp που μολύνει είδη του γένους *lodobacterium* (Comeau et al., 2012). Η ευθυγράμμιση των γονιδιωμάτων του Athena1 και των καλά μελετημένων Phipelp και Ap22 (που μολύνει βακτήρια του γένους *Acinetobacter*) αποκδεικνύει και την ομαδοποίσηση των γονιδίων με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους και των μοριακών διεργασιών την ώρα της μόλυνσης (Εικόνα 3.36, Εικόνα 3.37).



Εικόνα 3.36: Ευθύγραμμη σχηματική απεικόνιση των γονιδιωμάτων των βακτηριοφάγων AP22, Athena1 και Phiplpe. Διακρίνονται οι δύο ομάδες γονιδίων (clusters) που ευθύνονται για τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των βακτηριοφάγων και των μοριακών διεργασιών την ώρα της μόλυνσης ανεξάρτητα με το αν είναι ήπιοι ή λυτικοί. Διακρίνεται ότι ο βακτηριοφάγος Athena1 μπορεί να συγκαταλεγεί σε αυτήν την μεγάλη ομάδα ιών.



- Structure/Morphogenesis genes
- Replication/Recombination/DNA Modification
- Lysis/Lysogeny genes
- Others
- Hypothetical proteins

Εικόνα 3.37: Κυκλική σχηματική απεικόνιση των γονιδιωμάτων των βακτηριοφάγων Phiplpe (με ξενιστή *lodobacterium sp.*), Athena1 και AP22 (με ξενιστή το *Acinetobacter sp.*). Διακρίνονται οι δύο ομάδες γονιδίων (clusters) που ευθύνονται για τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των βακτηριοφάγων και των μοριακών δειργασιών την ώρα της μόλυνσης ανεξάρτητα με το αν είναι ήπιοι ή λυτικοί. Διακρίνεται ότι ο βακτηριοφάγος Athena1 μπορεί να συγκαταλεγεί σε αυτήν την μεγάλη ομάδα ιών. Φαίνεται ότι αυτοί οι βακτηριοφάγοι είναι πολύ στενά συνδεδεμένοι με τις μοριακές λειτουργίες του ξενιστή και είναι και πιθανά ο λόγος που έχουν και μικρό εύρος ξενιστών, αφού έχουν συνεξελιχθεί στενά με συγκεκριμένα είδη. Ταυτόχρονα οι συγκριτικές γονιδιωματικές αναλύσεις δείχνουν ότι αυτοί οι βακτηριοφάγοι μορφολογικά είναι εξαιρετικά συντηρημένοι με τα καψίδιά τους να συντηρούνται μέχρι και σε ιούς αρχαίων (Tschitschko, et al., 2015). Η αλληλούχιση των γονιδιωμάτων τους αποδεικνύει υψηλή αμινοξική συντήρηση στις πρωτεΐνες που ευθύνονται για την μορφολογία τους, σε σχέση με αυτές που έχουν ενζυματική δράση και ευθύνονται για βοηθητικές μεταβολικές λειτουργίες (Comeau, et al., 2012). Αυτό το γεγονός μπορεί να οφείλεται και στους μηχανισμούς μολύνσης που ευθύνονται από μορφολογικά τους χαρακτηριστικά με κοινό στοιχείο ότι όλοι αυτοί οι βακτηριοφάγοι μολύνουν αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Γενικά κατά τη διαδικασία μόλυνσης στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια πρέπει να τηρούνται συγκεκριμένες προϋποθέσεις για να μπορέσει το γονιδίωμα να εισέλθει στο κυτταρόπλασμα (Grayson, P., και Molineux I.J., 2007) που σημαίνει ότι πιθανά αυτοί οι βακτηριοφάγοι έχουν έναν συντηρημένο ελάχιστο αριθμό γονιδίων που ευθύνονται για τον μηχανισμό μόλυνσης στους ξενιστές. Εν κατακλείδι φαίνεται ότι αυτή η πολυπληθής ομάδα βακτηριοφάγων, έχει ένα συντηρημένο «πυρήνα» γονιδίων που ευθύνεται για βασικά κυρίως μορφολογικά χαρακτηριστικά και συναρμολόγηση του ιοσωματιδίου εντός του κυττάρου, αλλά παρόλα αυτά υπάρχει και μια ευελιξία στα γονιδιώματα, ώστε να μπορούν να αποκτούν νέα μοριακά «εργαλεία», πιθανά με οριζόντια μεταφορά γονιδίων, ώστε να έχουν τη δυνατότητα και να προσαρμόζονται κατάλληλα, ώστε να μολύνουν νέους ξενιστές. Σημαντικό παράδειγμα είναι οι βακτηριοφάγοι των κυανοβακτηρίων, που μορφολογικά μοιάζουν με όλους τους Myoviridae φάγους, όμως φέρουν φωτοσυνθετικά γονίδια για δικό τους όφελος κατά τον πολλαπλασιασμό τους στους ξενιστές τους (Sullivan et al., 2005, Mann et al., 2005).

3.2.9 Συγκεντρωτικά αποτελεσμάτα των βακτηριοφάγων που χαρακτηρίστηκαν πλήρως

Στην παρούσα πτυχιακή διατριβή έγινε προσπάθεια να απομονωθούν, αλληλουχηθούν και να συγκριθούν βακτηριοφάγοι με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ετερογένεια. Κάτι τέτοιο είναι σημαντικό για να διαλευκανθούν ξεχωριστά βιοχημικά φαινόμενα και μοριακοί μηχανισμοί που χρησιμοποιούν οι φυλογενετικά διαφορετικοί βακτηριοφάγοι. Μέσα σε αυτό το πλαίσιο χαρακτηρίστηκαν γονιδιακά δύο βακτηριοφάγοι του κλάδου "schizoT4like", ένας του κλάδου "phiKZlikevirus", ένας βακτηριοφάγος της οικογένειας *Myoviridae*, που όμως δεν ανήκει σε κάποιον κλάδο και ένας βακτηριοφάγος της οικογένειας *Siphoviridae*. Στον πίνακα 3.12 εμφανίζονται συγκεντρωτικά οι βακτηριοφάγοι που χαρακτηρίζονται, αναλύονται και παρουσιάζονται στην παρούσα διδακτορική διατριβή μαζί με επί μέρους βιολογικά χαρακτηριστικά. Τέλος στον Πίνακα 3.13 εμφανίζονται τα στοιχεία που αφορούν τον κλάδο που ανήκουν, το μέγεθος του γονιδιώματος, τον αριθμό των γονιδίων που προβλέφθηκαν, καθώς και

Πίνακας 3.12: Συγκεντρωτικά οι βακτηριοφάγοι που παρουσιάζονται στην παρούσα διδακτορική διατριβή μαζί με τα βιολογικά τους χαρακτηριστικά.

#	Βακτηριοφάγος	Κλάση	Οικογένεια	Χρόνος απορ- ρόφησης (95%, min)	Περίοδος Έκλειψης (min)	Μέγεθος Έκρηξης (φάγοι/ βακτήριο)
1	øGrn1	Caudovirales	Myoviridae	25	30	~44
2	φSt2	Caudovirales	Myoviridae	15	30	~97
3	Aphrodite1	Caudovirales	Myoviridae	12	80	~70
4	Ares1	Caudovirales	Siphoviridae	6	30	~17
5	Athena1	Caudovirales	Myoviridae	12	30	~65



Εικόνα 3.38: Λύση του *Vibrio alginolyticus* V1 από τους βακτηριοφάγους Aphrodite1, Ares1, Athena1 σε τριβλύο την τεχνική της αγαρόζης κορυφής.

Πίνακας 3.13: Συγκεντρωτική ανασκόπηση των αποτελεσμάτων που αφορούν την αλληλούχιση των γονιδιωμάτων και την *in silico* πρόβλεψη των γονιδίων τους.

#	Βακτηριοφάγος	Κλάδος	Μέγεθος Γονιδιώ- ματος	# Γονίδια	Αριθμός Κατα- χώρησης (Accession Num- ber)
1	øGrn1	schizoT4like	248,605 bp	410	KT919972
2	φSt2	schizoT4like	250.485 bp	412	KT919973
3	Aphrodite1	phiKZlikevirus	237.722 bp	198	MG720308
4	Ares1	siphophage	80.500 bp	119	MG720309
5	Athena1	myophage	39.826 bp	57	MG640035

3.3 Μεταβολικός χειρισμός των κυττάρων ξενιστή

3.3.1 Η μόλυνση με τους βακτηριοφάγους φGrn1 και φSt2 επιφέρει πολύπλοκες μεταβολικές αλληλεπιδράσεις με το βακτήριο ξενιστή

Όπως προαναφέραμε στο υποκεφάλαιο 3.2.5.2, οι "schizoT4like" βακτηριοφάγοι φέρουν στα γονιδιώματά τους γονίδια που ενισχύουν την βιοσύνθεση ΝΑΟ⁺ την ώρα της μόλυνσης. Για να εξακριβωθεί de facto ο «γονιδιακός προγραμματισμός» αυτών των συγκεκριμένων ενδιαφερόντων γονιδίων, αλλά και ο τρόπος με τον οποίο συνδέονται με τα απαραίτητα βιοχημικά μονοπάτια που λαμβάνουν χώρα κατά την διάρκεια της μόλυνσης, πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου (RT-PCR) στα γονίδια του βακτηριοφάγου και του βακτηρίου την ώρα της μόλυνσης σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές. Όπως αναμενόταν τα μεταγραφήματα των ιικών γονιδίων υπερίσχυσαν αυτών των βακτηριακών (Chevallereau et al., 2016). Πιο συγκεκριμένα συλλέχθηκαν κύτταρα και έγινε απομόνωση RNA στις χρονικές στιγμές 1 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, όσο διαρκεί δηλαδή η λανθάνουσα περίοδος των βακτηριοφάγων φGrn1 και φSt2, ενώ για την μελέτη χρησιμοποιήθηκε μόνο ένας βακτηριοφάγος (ο φSt2), αφού και οι δύο φέρουν ακριβή αντίγραφα αυτών των γονιδίων. Αρχικά για να εξακριβωθεί ότι ο πειραματικός σχεδιασμός ήταν σωστός, μελετήθηκε η έκφραση βακτηριοφαγικών γονιδίων με γνωστό πρότυπο έκφρασης κατά τη διάρκεια της μόλυνσης και πιο συγκεκριμένα τα γονίδια MCP και grx (Εικόνα 3.26, Luke et al., 2004) που κωδικοποιούν για την κύρια καψιδιακή πρωτεΐνη και μία γλουταρεδοξίνη του βακτηριοφάγου αντίστοιχα (Εικόνα 3.26). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα σχετικά επίπεδα έκφρασης της κύριας καψιδιακής πρωτεΐνης του βακτηριοφάγου φτάνουν μέγιστο στο τέλος της λανθάνουσας περιόδου, γεγονός αναμενόμενο αφού τότε γίνεται και πακεταρίσμα των νέων γονιδιωμάτων στα καψίδια. Αντίστοιχα, όπως και στον T4 (Luke et al., 2004) το γονίδιο της γλουταρεδοξίνης έχει μέγιστη έκφραση στην αρχή της μόλυνσης, μόλις 10 min αφού ξεκινήσει. Όπως προαναφέραμε, εκτός από το γονίδιο που κωδικοποιεί για την μονονουκλεοτιδική αδενυλμεταφοράση του νικοταμιδίου (nicotinamide mononucleotide adenyltransferase, NMNAT, ALP47012 για φ Grn1 και ALP47393 για φ St2), ένα ένζυμο που κατέχει και ο ξενιστής, οι βακτηριοφάγοι κατέχουν ακόμα και το γονίδιο που κωδικοποιεί φωσφορυβολμεταφοράση νικοταμιδίου (nicotinamide για του phosphoribosyltransferase, NAMPT, ALP46980 yta φ Grn1 kat ALP47363 yta φ St2), to οποίο δεν υπάρχει ή δεν έχει επισημανθεί στον ξενιστή V. alginolyticus και μπορεί να χρησιμοποιεί νικοτιναμίδη σαν υπόστρωμα και να την μετατρέπει σε νικοτιναμίδη dριβονουκλεοτίδιο, κάνοντας μια συντόμευση της βιοχημικής «διαδρομής» προς την βιοσύνθεση του NAD⁺, ενώ έχουνε μέγιστη σχετική έκφραση μεταξύ 10 και 20 min. Στα αντίστοιχα βακτηριακά γονίδια, πυραζιναμιδάση (pnac) και μονονουκλεοτιδική αδενυλμεταφοράση του νικοταμιδίου (NMNAT) δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην έκφρασή τους, δείχνοντας ότι οι βακτηριοφάγοι τείνουν να προσπαθούν να υπερπαράξουν NAD⁺ για δικό τους όφελος. Ταυτόχρονα έγινε μελέτη της έκφρασης ενός αινιγματικού γονιδίου που φέρουν οι βακτηριοφάγοι αυτού του κλάδου, και πιο συγκεκριμένα μιας σιρτουίνης (sirtuin, Sirt2, Sir2/cobB πρωτεΐνη, ALP47040 για τον φ Grn1 και ALO47418 για τον φ St2) με δράση αποακετυλάσης, η οποία είναι NAD⁺εξαρτώμενη (NAD⁺-dependent). Η σχετική έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου είναι υψηλή στα 20 min μετά την μόλυνση και μετά την πιθανή βιοσύνθεση του NAD⁺. Η λειτουργία, η δομή και ο αινιγματικός ρόλος του συγκεκριμένου ενζύμου θα αναλυθεί στη συνέχεια. Με τελικό σκοπό την αντιγραφή ~97 ιοσωματιδίων ~250 kbp σε μόλις 30 λεπτά, είναι φυσικό να γίνει μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την βιοσύνθεση των νουκλεοτιδίων και την ενσωμάτωσή τους στον κύκλο αντιγραφής (replication rolling cycle) του βακτηριοφάγου.



Εικόνα 3.39: Μελέτη των επιπέδων σχετικής έκφρασης (±SE) των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις βακτηριοφαγικέν πρωτεΐνες της κύριας καψιδιακής πρωτεΐνης (*MCP*, major capsid protein) και μίας γλουταρεδοξίνης (*grx*, glutaredoxin) κατά τη διάρκεια της μόλυνσης.

Πιο συγκεκριμένα οι δύο βακτηριοφάγοι φέρουν τις δύο υπομονάδες που απαρτίζουν μία ριβονουκλεοσιδική διφωσφορική αναγωγάση (*nrdAB*; ALP46965, ALP46998 για φGrn1 και ALP47345, ALP47379 για φSt2) και την μία υπομονάδα που απαρτίζει μια ριβονουκλεοσιδική τριφωσφορική αναγωγάση (*nrdD*; ALP46970 για φGrn1 και ALP47350 για φSt2), όπου και οι δύο συμμετέχουν στα τελευταία στάδια της βιοσύνθεσης του dATP και dGTP και έχουν μέγιστα σχετικά επίπεδα έκφρασης 30 min μετά την μόλυνση (Εικόνα 3.40). Επί προσθέτως υπάρχουν και άλλα ένζυμα που κωδικοποιούνται από φαγικά γονίδια και εμπλέκονται στο μεταβολισμό των πυριμιδών. Πιο συγκεκριμένα, μία dCMP δεαμινάση (ALP47131 για φGrn1 και ALP47515 για φSt2), μία κινάση θυμιδίνης (ALP47080 για φGrn1 και ALP47460 για φSt2) και μία συνθάση θυμιδιλάσης (*thyA*, ALP47026 για φGrn1 και ALP47405 για φSt2) με στόχο την επαγωγή της βιοσύνθεσης dTTP από dCTP και dUTP.





Εικόνα 3.40: Μελέτη των επιπέδων σχετικής έκφρασης (±SE) βακτηριοφαγικών γονιδίων κατά τη διάρκεια της μόλυνσης στις χρονικές στιγμές 1 min, 5 min, 10 min, 20 min και 30 min μετά την μόλυνση. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται αναλυτικά και στα Παραρτήματα, Πίνακας 4 Β.

Ενδιαφέρον ακόμα παρουσιάζει και η ύπαρξη ενός γονιδίου υδρόλυσης της δινουκλεοτιδικής ουρακίλης που φέρουν οι βακτηριοφάγοι. Πιο συγκεκριμένα φέρουν μια dUTP πυροφωσφατάση (*DUT*; AL47106 για *φ*Grn1 και AP47489 για *φ*St2) η οποία φέρεται να υπάρχει σε όλους τους "schizoT4like" *Vibrio* φάγους της οποίας μαζί με την συνθάση της θυμιδιλάσης (*thyA*), φτάνουν μέγιστα ποσοστά έκφρασης 20 min μετά την μόλυνση με τον βακτηριοφάγο, τριπλασιάζοντας και διπλασιάζοντας τα ποσοστά έκφρασης αντίστοιχα (Εικόνα 3.40).



0.10

0.05

0.00







Εικόνα 3.41: Σχετικά επίπεδα έκφρασης γονιδίων (±SE) του ξενιστή κατά τη διάρκεια της μόλυνσης στις χρονικές στιγμές 1 min, 5 min, 10 min, 20 min και 30 min μετά την μόλυνση. Στην πρώτη στήλη εμφανίζεται η σχετική έκφραση των γονιδίων του βακτηρίου, χωρίς την παρουσία βακτηριοφάγου. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά στις σχετικές εκφράσεις σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται αναλυτικά και στα Παραρτήματα, Πίνακας 4 Α.

Τα αντίστοιχα γονίδια του ξενιστή, δηλαδή μία διφωσφορική νουκλεοσιδική κινάση (*NDK*) και μία dTMP κινάση (*TMK*) και οι δύο συνθάσες της θυμιδιλάσης (*thyA* 1, *thyA* 2) δείχνουν επαγωγή στην σχετική τους έκφραση που στην περίπτωση της *NDK* φτάνουν και σε στατιστικά σημαντικά επίπεδα στα 10 min και 20 min μετά τη μόλυνση με τον ιό (Εικόνα 3.41).

Με στόχο να αναδειχθούν όλα αυτά τα γονίδια και η επιρροή που έχουν κατά τη διάρκεια της μόλυνσης δημιουργήθηκε ένα μοντέλο βιοχημικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα εντός του κυττάρου (Εικόνα 3.42). Η ύπαρξη και η έκφραση αυτών των γονιδίων, δείχνει ότι οι βακτηριοφάγοι προσπαθούν να ενισχύσουν την παραγωγή NAD⁺, με αυτόνομο τρόπο και για δικό τους όφελος. Πολύ πιθανό ένα τέτοιο φαινόμενο να λαμβάνει χώρα για να τροφοδοτήσουν οι βακτηριοφάγοι NAD⁺εξαρτώμενα ένζυμα του ξενιστή (Lee et al., 2017) με στόχο να τα χρησιμοποιήσουν εκείνοι ή να τροφοδοτήσουν δικά τους ένζυμα αντίστοιχα. Αν και πολλά βακτηριοφαγικά ένζυμα NAD⁺-εξαρτώμενα (NAD⁺-dependent) έχουν αναφερθεί να συμμετέχουν στην αντιγραφή του φαγικού DNA (για παράδειγμα η DNA λιγάση) στους T4 βακτηριοφάγους (Hertveldt et al., 2005), τα ένζυμα που συμμετέχουν στην βιοχημεία του συστήματος εδώ είναι όλα ATP-εξαρτώμενα (ATP-dependent) ή NADPHεξαρτώμενα (NADPH-depentent). Όλα, εκτός από ένα αινιγματικό γονίδιο που κωδικοποιεί για μία προκαρυωτική σιρτουίνη (Sir2/cobB πρωτεΐνη/Sir2) και η οποία αναγνωρίστηκε και μελετήθηκε πιο διεξοδικά. Οι ομόλογες ευκαρυωτικές Sirt2 και Sirt3 πρωτεΐνες, έχουν συνδεθεί με αυξημένη κυτταρική αύξηση και χρόνο ζωής στα κύτταρα στο παρελθόν (Frye, 2000; Chang και Min, 2002). Και οι ευκαρυωτικές και οι προκαρυωτικές σιρτουίνες είναι γνωστό ότι συμμετέχουν σε μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις σε ένζυμα «κλειδιά», καταναλώνοντας NAD⁺. Πιο συγκεκριμένα η μεταμεταφραστική τροποποίηση των σιρτουινών έχει να κάνει με την αποακετυλίωση της ακετυλιωμένης λυσίνης σε ένζυμα και επομένως την ενεργοποίησή τους, με αποτέλεσμα να παράγουν και νικοτιναμίδη σαν παραπροϊόν της αντίδρασης, το οποίο εντός ενός μολυσμένου κυττάρου από τους συγκεκριμένους βακτηριοφάγους θα μπορούσε δυνητικά να ανακυκλωθεί και να επαναχρησιμοποιηθεί για παραγωγή NAD⁺ (Burgos et al., 2013). Η αποακετυλίωση της ακετυλ-λυσίνης έχει συνδεθεί στενά με την ενεργοποίηση του ενζύμου της συνθετάσης του ακετυλ-συνένζυμου Α (ACS) στους προκαρυώτες, το όποιο μάλιστα χαρακτηρίζεται και σαν Sir2εξαρτώμενο (Sir2-dependent) ένζυμο (Starai, 2002), ενώ μόλις πρόσφατα αποδείχτηκε ότι μπορεί να ενεργοποιεί και άλλα ακετυλιωμένα ένζυμα (Nakayasu et al., 2017). Η ακετυλίωση της λυσίνης είναι μια πολύ γνωστή και σημαντική μεταμεταφραστική τροποποίηση και στους προκαρυωτικούς, αλλά και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και είναι ένα συχνό ρυθμιστικό φαινόμενο που λαμβάνει χώρα εντός των κυττάρων (Ouidir et al., 2015). Το V. alginolyticus στέλεχος V1, διαθέτει από μόνο του μία Sir2/cobB αποακετυλάση. Η παρουσία μίας επιπρόσθετης και αρκετά διαφορετικής Sir2/cobB πρωτεΐνης στα βακτηριοφαγικά γονιδιώματα, πιθανά ανοίγει τον δρόμο για συζήτηση για ενεργοποίηση βακτηριακών ενζύμων (όπως αυτό της ACS), μέσω μεταμεταφραστικής τροποποίησης, από τους βακτηριοφάγους για δικό τους όφελος. Ακόμη η ισχυρή σύνδεση του γονιδίου ΝΑΜΡΤ, που κωδικοποιεί για φωσφορυβολμεταφοράση του νικοταμιδίου, και των σιρτουινών, έχει περιγραφεί πολύ καλά για όλους τους οργανισμούς, μαζί με την ανακύκλωση του νικοταμιδίου και την σημαντικότητα της *de novo* σύνθεσης του NAD⁺ (Imai et al., 2000; Lin et al., 2010; Burgos et al., 2013). Τα ποσοστά των σχετικών επιπέδων έκφρασης του γονιδίου Sir2 (20 min μετά την έναρξη της μόλυνσης), υποδηλώνουν και πιθανή προτεραιότητα στην ρύθμιση της παραγωγής NAD⁺, από τα γονίδια NAMPT και NMNAT πριν την μεταγραφή του Sir2. Στη συνέχεια πιθανά η σιρτουίνη θα μπορούσε να αποακετυλιώσει την ακετυλιωμένη λυσίνη της ACS καταναλώνοντας ένα μόριο ATP και στη συνέχεια να γίνει αυξημένη σύνθεση του ακετυλ-συνενζύμου A (AcoA, Gulick et al., 2003). Ενδιαφέρον είναι και η στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης των βακτηριακών γονιδίων Sir2 και ACS που «ευθυγραμμίζονται» με τις ανάγκες των βακτηριοφάγων για παραγωγή περισσότερου ΑcoA και που μπορεί να είναι μέρος του ευρύτερου μοριακού και μεταβολικού χειρισμού (molecular hijacking), αλλά και της βιοτικής καταπόνησης της οποίας το κύτταρο βιώνει. Στη συνέχεια το AcoA μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο κύκλο του κιτρικού και να αποτελέσει μία από τις πηγές για παραγωγή ATP καταναλώνοντας NAD⁺. Η παρουσία πολλών βακτηριοφαγικών ATP-εξαρτώμενων ενζύμων μπορεί να σημαίνει και υψηλή ζήτηση σε ATP κατά την διάρκεια του λυτικού κύκλου του ιού. Απευθείας συσχέτιση μεταξύ υψηλής συσσώρευσης ΑΤΡ κατά τη διάρκεια της ιικής μόλυνσης έχει πρόσφατα δειχθεί (Chevallereau et al., 2016). Επιπροσθέτως στην περίπτωση μας, τουλάχιστον 97 γονιδιώματα των 250.485 bp πρέπει να συνθέτουν κατά τη διάρκεια της μόλυνσης (30 min), γεγονός το οποίο θα μπορούσε να τεκμηριώσει ακόμη μεγαλύτερη απαίτηση για βιοσύνθεση νουκλεοτιδίων και επομένως ενέργεια σε μορφή ΑΤΡ. Ταυτόχρονα ο καταβολισμός των RNA του ξενιστή, αλλά και του ίδιου του φάγου (όταν αυτά πλέον δεν είναι χρήσιμα) δυνητικά μπορούν να είναι μια πηγή ελεύθερων διφωσφορικών νουκλεοτιδίων κατά τη διάρκεια της μόλυνσης (Carpousis et al., 1989, 1994; Ueno and Yonesaki, 2004; Uzan, 2009) και σε συσχετισμό με την παρουσία των νουκλεοτιδικών αναγωγασών του ιού (nrdAB και nrdD, ATP-εξαρτώμενες ριβονουκλεοτιδάσες)

ο φάγος μπορεί να έχει τη δυνατότητα να ενισχύσει τη βιοσύνθεση των δεοξυριβονουκλεοτιδίων για επιτυχή αντιγραφή του DNA (Chevallereau et al., 2016). Αυτά τα ένζυμα φτάνουν το μεταγραφικό τους πλατό στα 20 min p.i. (για τους φάγους φ Grn1 και φSt2 με χρόνο έκλειψης τα 30 min), ενώ για τον T4 (έχοντας μόλις 20 min χρόνο έκλειψης) τα 10 min p.i. (Luke et al., 2002). Στατιστικά σημαντική διαφορά στα σχετικά επίπεδα έκφρασης σημειώνεται και στις δύο υποχρεωτικά αναερόβιες αναγωγάσες του βακτηρίου nrdD, ένα φαινόμενο που επίσης παρατηρείται κατά την ιική μόλυνση σε ένα στέλεχος του είδους Pseudomonas aeruginosa (Chevallereau et al., 2016). Οι βακτηριακές ριβονουκλεοτιδικές ρεδουκτάσες είναι γνωστές για την αλοστερική και μεταγραφική ρύθμιση την οποία έχουν, οι οποίες εξαρτώνται από την εξισορρόπηση των τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (NTPs) εντός του κυττάρου (Torrents, 2014). Αυξημένες μεταλλαγές στο DNA μπορούν να προκύψουν εάν υπάρχει ανισορροπία αυτών στο κυτταρόπλασμα (Wheeler et al., 2005). Αυτή η αυξημένη μεταγραφή των βακτηριακών γονιδίων nrdD πιθανά δείχνει μια τέτοια ανισορροπία (ειδκά των επιπέδων του ΑΤΡ) μέσα στο κύτταρο, η οποία ανισορροπία δικαιολογείται όπως ήδη προαναφέραμε σε αυτό το υποκεφάλαιο.

Ένα άλλο ενδιαφέρον στοιχείο που έχει μεγάλη σημασία, είναι η ύπαρξη ενός ενζύμου πυροφοσφατάσης του dUTP (*DUT*). Αν και ο ξενιστής δεν έχει ένα αντίστοιχο γονίδιο ή μια χιμαιρική πρωτεΐνη που να μπορεί να αποικοδομήσει τις δεοξυτριφωσφορικές ουρακίλες σε μονοφωσφορικές σε ένα βήμα (Moroz et al., 2005), παρόλα αυτά το *V. alginolyticus* κατέχει μια διφωσφορική κινάση (*NDK*) και μία dTMP κινάση (*TMK*), γονίδια τα οποία μπορούν να παίξουν τον ίδιο ρόλο σε δύο όμως βήματα (Kielley, 1970; Chakrabarty, 1998) (Εικόνα 3.42). Κάτι τέτοιο υποδηλώνει ότι ο βακτηριοφάγος μπορεί από μόνος του να ενορχηστρώσει την εναλλαγή ανάμεσα στο μεταγραφικό και αντιγραφικό στάδιο κατά τη διάρκεια του λυτικού του κύκλου. Η ενδελεχής μελέτη αυτού του γονιδίου στη ζύμη, έχει αποδείξει τον ρόλο της κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA, ώστε να αποικοδομεί την τριφωσφορική ουρακίλη και να μην ενσωματώνεται λανθασμένα από την DNA πολυμεράση κατά τη διαδικασία της αντιγραφής, μειώνοντας τα ποσοστά των μεταλλαγών στα νεοσυντιθέμενα γονιδιώματα (Gadsden et al., 1993). Με αυτόν τον τρόπο πιθανά και οι βακτηριοφάγοι, έχουν τη δυνατότητα με σωστή γονιδιακή ρύθμιση να κατευθύνουν τον μεταβολισμό εντός του κυττάρου από μεταγραφή των γονιδίων προς την αντιγραφή του γονιδιώματος αποικοδομώντας γρήγορα την ουρακίλη, ενώ ξεκινάει και η βιοσύνθεση της θυμίνης από αυτήν. Έτσι μπορούν να ικανοποιήσουν αυτήν τους την ανάγκη αυτόνομα και χωρίς να διακινδυνέψουν να ενσωματώσουν μεγάλο αριθμό μεταλλαγών στα νεοσυντιθέμενα γονιδιώματα. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται και από παρουσία ενζύμων dUTPασών στα γονιδιώματα πολλών ρετροϊών, όπου η «δηλητηριώδης» ύπαρξη υψηλών επιπέδων ουρακίλης κατά τη διαδικασία της αντιγραφής, έχει καλά τεκμηριωθεί (Hizi and Herzig, 2015). Είναι αρκετά σημαντικό να αναφερθεί ακόμη, ότι αυτό το ένζυμο βρίσκεται στα περισσότερα αλληλουχημένα βακτηριακά γονιδιώματα και εργασίες με μεταλλάγματα που δεν έχουν αυτό το γονίδιο στο βακτήριο E. coli, έχουν αποδείξει ότι το αποτέλεσμα είναι να δημιουργούνται μικρά τμήματα Okazaki στα νέα γονιδιώματα και επομένως αρκετά λάθη κατά την αντιγραφή των γονιδιωμάτων (Tye και Lehman, 1977; Shlomai και Kornberg, 1978). Ταυτοχρόνως είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι ο βακτηριοφάγος Τ4, φέρει μια ομόλογη πρωτεΐνη χίμαιρα με διπλό ρόλο dCTPάσης-dUTPάσης (gp56), η οποία μπορεί ταυτόχρονα να δημιουργεί 5-υδροξυ-μεθυλ-κιτοσίνη (Gary et al., 1998). Η αντιγραφή του DNA έχει μέγιστα επίπεδα 20 min p.i. (το τελευταίο 1/3 της περιόδου έκλειψης), στο ίδιο σημείο που μπορέσαμε να εντοπίσουμε και το μέγιστο της σχετικής έκφρασης του γονιδίου DUT. Αυτό πιθανά αποδεικνύει την ανάγκη της μετατόπισης του μεταβολισμού προς την εξισορρόπηση των δεοξυριβονουκλεοτιδίων προκειμένου να ξεκινήσει η αντιγραφή των νέων γονιδιωμάτων (replication) και να υπολειτουργήσει η μεταγραφή των γονιδίων (transcription), έτσι ώστε να αποφευχθεί η λανθασμένη χρησιμοποίηση ουρακίλης αντί θυμίνης στα νέα γονιδιώματα. Ακόμη παρατηρήσαμε διαφορές στα σχετικά ποσοστά έκφρασης των βακτηριακών γονιδίων NDK και TMK (στατιστικά σημαντικά) που πιθανά αντιπροσωπεύουν και την παρουσία υψηλών επιπέδων ουρακίλης. Η σημαντικότητα της αποικοδόμησης της τριφωσφορικής ουρακίλης προς την βιοσύνθεση δεοξυριβοτρφωσφορικής θυμίνης ακόμη φαίνεται και από την παρουσία του γονιδίου *thyA* και τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του ταυτόχρονα με το γονίδιο DUT.



Εικόνα 3.42: Σχηματική αναπαράσταση των βιοχημικών διεργασιών κατά τη διάρκεια της μόλυνσης του *V.* alginolyticus από τον βακτηριοφάγο φSt2. Οι θερμικοί χάρτες αντιπροσωπεύουν τις εναλλαγές στα σχετικά επίπεδα έκφρασης των βακτηριακών γονιδίων (μαύρα έντονα πλαγιαστά γράμματα) για τον μάρτυρα (C), 1' μετά την μόλυνση (post infection, p.i.), 5' p.i., 10' p.i, 20' p.i, 30' p.i. Οι άσπροι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά σχετικής έκφρασης στα γονίδια σε σχέση με τον μάρτυρα (p<0.05). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τα επίπεδα της σχετικής γονιδιακής έκφρασης βακτηριοφαγικών γονιδίων (μωβ έντονα πλαγιαστά γράμματα, ±SE) 1' μετά την μόλυνση (post infection, p.i.), 5' p.i., 10' p.i, 20' p.i, 30' p.i. Τα βέλη υποδηλώνουν βακτηριακά βιοχημικά μονοπάτια και τα διακεκομμένα βέλη πιθανά φαγικά. Το έντονο κόκκινο βέλος δείχνει την εξωκυτταρική εισαγωγή του νικοταμιδίου, ενώ ο πράσινο κύκλος αντιπροσωπεύει την ανακύκλωσή του μετά την αποακετυλίωση της λυσίνης (Skliros et al., 2016).

Αυτά τα στοιχεία αποδεικνύουν τον χειρισμό που λαμβάνει χώρα από τον βακτηριοφάγο στο βακτήριο ξενιστή, σε μοριακό, βιοχημικό και μεταμεταφραστικό επίπεδο και ξεκαθαρίζουν ενδιαφέρουσες βιοχημικές αλληλεπιδράσεις άγνωστες έως τώρα.
3.3.1.1 Η *in silico* λειτουργική μελέτη της ιικής πρωτεΐνης Sir2/cobB ενισχύει την πιθανή μεταμεταφραστική δράση της

Κατά τη διάρκεια της συγκριτικής γονιδιωματικής ανάλυσης αναδείχθηκαν πολλά και ενδιαφέροντα γονιδιωματικά στοιχεία των βακτηριοφάγων, ένα από αυτά, που αποτέλεσε και αντικείμενο πιο στοχευμένης βιοπληροφορικής μελέτης, αποτέλεσε και το φαγικό γονίδιο σιρτουίνης ή αυτό που κωδικοποιεί για την αποακετυλάση της λυσίνης (*Sir2*, Εικόνα 3.43). Αν και όπως προαναφέρθηκε έγινε μελέτη της έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου, όπου φαίνεται ότι μεταγράφεται κανονικά, θέλαμε να εξακριβώσουμε την λειτουργικότητά του σε επίπεδο τριτοταγούς δομής, αλλά και τον ρόλο που θα μπορούσε να κατέχει κατά τη διάρκεια της μόλυνσης.



Εικόνα 3.43: Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης Sir2/cobB των βακτηριοφάγων φGrn1 και φSt2. Βπτυχωτές επιφάνειες (κίτρινο), έλικες (κόκκινο), στροφές (πράσινο). Το μεγάλο Rossman πεδίο (κάτω) διαχωρίζεται από το ενεργό κέντρο και το μικρό δαχτυλωτό πεδίο (πάνω) από την κόκκινη γραμμή.

Γενικά οι βακτηριοφάγοι φέρουν μεγάλο αριθμό μη λειτουργικών ανοιχτών αναγνωστικών πλαισίων, έτσι κάθε μελέτη για επιβεβαίωση της λειτουργικότητας τέτοιων γονιδιακών περιοχών είναι αρκετά πολύτιμη. Η ίδια ακριβώς αμινοξική αλληλουχία υπάρχει και στους δύο βακτηριοφάγους για να κωδικοποιήσουν τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Η τεταρτοταγής δομή της δημιουργήθηκε με βάση την ομόλογη και πλήρως χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη του βακτηρίου *Escerichia coli* (PDB ID: 1SP5P, Zhao et

al., 2004). Το μοντέλο που κατασκευάστηκε προβλέπει 10 β-πτυχωτές επιφάνειες και 9 α-έλικες μαζί με μία Rossman περιοχή, μια περιοχή που μοιάζει με περιοχή «δαχτύλου» δέσμευσης ψευδαργύρου (Zinc binding domain) και οι περιστροφικές περιοχές που ενώνουν τις 2 αυτές περιοχές (Εικόνα 3.44). Με τα λογισμικά Verify 3D και PROSA II η ποιότητα του μοντέλου αξιολογήθηκε με βάση το πακετάρισμα, την στερεοχημική της δομή και την γενικότερη ποιότητα του μοντέλου (Z score -5.32), όπου και φάνηκε υψηλής ποιότητας. Αν και έχει χαμηλή ομολογία σε σχέση με τις ομόλογες πρωτεΐνες του *Ε. coli* και του ξενιστή *V. alginolyticus* (23.5 % και 24,1 % αντίστοιχα) η γενικότερη προβλεπόμενη δομή είναι όμοια (Εικόνα 3.30). Σε αντίθεση, όμως με τις βακτηριακές σιρτουίνες, η τριτοταγής ευθυγράμμιση δείχνει απώλεια των κατάλληλων αμινοξέων δέσμευσης ιόντων ψευδαργύρου, ένα φαινόμενο που παρατηρείται και στην σιρτουίνη του βακτηριοφάγου μοντέλου ΚVP40.





Όμοιες (1) και ανόμοιες (2) αμινοξικές ευθυγραμμίσεις των πρωτεϊνών Sir2/cob του φSt2 (πορφυρό), του *V. alginolyticus* (τιρκουάζ) και του *E. Coli* (άσπρο). Η δαχτυλωτή περιοχή δέσμευσης υδραργύρου εκπροσωπείται ακόμα (κίτρινη σφαίρα). (B) Απεικόνιση «κορδελών» που παρουσιάζει τη δαχτυλωτή περιοχή δέσμευσης υδραργύρου της φαγικής πρωτεΐνης Sir2/cobB. Διακρίνονται οι β-πτυχωτές επιφάνειες (κίτρινο), μία αέλικα (κόκκινο) και οι σπειροειδείς διαμορφώσεις (πράσινο). Τα μόρια άνθρακα (άσπρο), αζώτου (μαύρο) και οξυγόνου (κόκκινο) των πιθανών ιοντικών δεσμών μεταξύ των αμινοξέων (τα μόρια παρουσιάζονται ραβδόμορφα). Οι αποστάσεις μεταξύ των αμινοξέων είναι σε Ångström (κίτρινο). Επί προσθέτως, η επιβεβαίωση της απουσίας της συγκεκριμένης περιοχής έγινε με το λογισμικό ZincExplorer. Το συγκεκριμένο γεγονός ανέδειξε το ερώτημα περί λειτουργικότητας της πρωτεΐνης και της φυσιολογικής αναδίπλωσής της στο κυτταρόπλασμα. Για αυτό εξετάσαμε το ενδεχόμενο να δημιουργείται μια ιοντική «γέφυρα» (ιοντικό δεσμός) μεταξύ αντιπαράλληλων αμινοξέων στη συγκεκριμένη περιοχή, όπου θα μπορούσε να κρατάει το μόριο σε σταθερή κατάσταση (Kumar και Nussino, 2002). Πράγματι, έγινε πρόβλεψη πιθανών τέτοιων περιοχών με το λογισμικό ESBRI με αποτέλεσμα να αποδειχθεί ότι υπάρχουν 2 πιθανές θέσεις δημιουργίας ιοντικού δεσμού. Πιο συγκεκριμένα εντοπίστηκε ασπαρτικό οξύ στη θέση 112 και αργινίνη στη θέση 135, όπου βρίσκονται σε απόσταση (<4 Ångström) κατάλληλη για να σχηματίσουν ιοντικό δεσμό και ταυτόχρονα να κρατήσουν την δαχτυλωτή περιοχή σταθερή (Εικόνα 3.44). Μία ακόμη ενδεχόμενη περιοχή σχηματισμού ιοντικού δεσμού υπάρχει στις θέσεις 116 και 129 ανάμεσα σε λυσίνη και γλουταμινικό οξύ, το οποίο όμως γεγονός πιθανά να θέλει περαιτέρω διερεύνηση, αφού δεν επιβεβαιώνεται με το λογισμικό ESBRI (Εικόνα 3.44). Το ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης εντοπίστηκε στην Ιστιδίνη 112, ένα συντηρημένο αμινοξύ βακτηριακών και βακτηριοφαγικών σιρτουινών (Εικόνα 3.45). Ακόμη το σημείο δέσμευσης της ακετυλ-λυσίνης είναι αρκετά συντηρημένο, όπως φαίνεται στην αμινοξική ευθυγράμμιση με τις αμινοξικές αλληλουχίες FNE και INP να σχηματίζουν ένα παρόμοιο με σημείο δέσμευσης, όπως στο E. coli κοντά στο ενεργό κέντρο (Εικόνα 3.45). Πιο συγκεκριμένα τα αυστηρά συντηρημένα αμινοξέα φαινυλανανίνη 190 και προλίνη 221 (της πρωτεΐνης Sir2/cobB του E.coli) είναι παρόντα, σε αντίθεση όμως η τυροσίνη 220 έχει αντικατασταθεί από το πολικό ουδέτερο αμινοξύ Ασπαραγίνη, μια αντικατάσταση που όμως φαίνεται συνήθης, αφού υπάρχει τουλάχιστον στην ομόλογη σιρτουίνη Sir2Af1 του αρχαίου Archaeoglobus fulgidus (Ringel et al., 2014), αλλά και στην ομόλογη ανθρώπινη σιρτουίνη SIRT2 (Feldman et al., 2015) με το πολικά ουδέτερο γλουταμινικό οξύ να αντικαθιστά την τυροσίνη και να παραμένει το ένζυμο λειτουργικό. Τέλος η βαλίνη 219 του E.coli αντικαθιστάται από την ισολευκίνη στην βακτηριοφαγική πρωτεΐνη, που όμως πρόκειται για μια αντικατάσταση δύο μη-πολικών αλιφατικών αμινοξέων που

πιθανά δε θα περιορίζει το σημείο πρόσδεσης της ακετυλιωμένης λυσίνης. Αυτές οι πληροφορίες προτείνουν ότι η βακτηριοφαγικές Sir2/cobB πρωτεΐνες, μπορούν να δράσουν ανάλογα με τις βακτηριακές και να απόακετυλιώσουν λυσίνες ενζύμων και επομένως να τις ενεργοποιήσουν.

Αν και πρόκειται για ένα γονίδιο που έχει βρεθεί και αναφερθεί μετά την αλληλούχιση του γονιδιώματος του βακτηριοφάγου KVP40 από το 2002 (Miller et al., 2002a), τότε είχε αναφερθεί απλά σαν ένα γονίδιο που συμμετέχει στην υδρόλυση NAD⁺, αφού έφερε την ήδη γνωστή τότε χαρακτηριστική συντηρημένη αμινοξική περιοχή δέσμευσης του ΝΑΟ⁺. Στην προηγούμενη ενότητα αναφέραμε λεπτομερώς τον λειτουργικό ρόλο που θα μπορούσε να έχει. Παρόλα αυτά επειδή τα βακτηριοφαγικά γονιδιώματα φέρουν αρκετά αινιγματικά αναγνωστικά πλαίσια που κωδικοποιούν μη λειτουργικές πρωτεΐνες, οι εργασίες που στοχεύουν στην λειτουργική επιβεβαίωση θεωρούνται αρκετά σημαντικές, πόσο μάλλον για μια ιδιάζουσα περίπτωση όπως η παρούσα, οπού παρατηρείται μεταμεταφραστική τροποποίηση βακτηριακών ενζύμων από τον «εισβολέα» για δικό του όφελος. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι αν και υπάρχει απουσία της σημαντικής αμινοξικής περιοχής δέσμευσης ψευδαργύρου (Webster et al., 1991), η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης θα μπορούσε να είναι σταθερή, λόγω της ύπαρξης κατάλληλων ιοντικών δεσμών μεταξύ των αμινοξέων που μπορούν και αντικαθιστούν την απούσα περιοχή, και προσφέρουν σταθερότητα στο μόριο (Baglivo et al., 2009). Όσον αφορά την λειτουργικότητα του σημείου δέσμευσης της ακετυλιωμένης λυσίνης, υπάρχουν και εκεί διαφορές που όμως δε φαίνεται να καθιστούν την πρωτεΐνη μη λειτουργική. Τέλος οι σιρτουίνες είναι συντηρημένες σε αρκετά γονιδιώματα βακτηριοφάγων, όπως του E. coli φάγου T5 (Wang et al., 2005), του φάγου του γένους Salmonella, SPC35 (Kim and Ryu, 2011), του φάγου vB CsaM GA32 για τα γένη Cronobacter (Abbasifar et al., 2014), του φάγου του είδους Pecrobacter My1 (Lee et al., 2012), αλλά και για το γένος Klebsiella βρίσκεται στον φάγο JD001 (Cui et al., 2012). Θα ήταν δύσκολο μία μη λειτουργική και μη σημαντική πρωτεΐνη να βρίσκεται σε τόσους διαφορετικούς βακτηριοφάγους, ενισχύοντας τον ρόλο της και την λειτουργικότητά της. Μελλοντικές μελέτες με ετερόλογη έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης θα μπορούσαν να δώσουν στοιχεία για την ενεργότητά της, αλλά και όλα τα είδη ενζύμων που μπορεί να ενεργοποιήσει, σε σχέση με τις αντίστοιχες βακτηριακές ή ακόμα και τις ευκαρυωτικές, ενώ πιθανά θετικά αποτελέσματα θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν και σε μελλοντικές βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

	70
EC Sir2/cobBKPRVLVLTGAGISAESGIRTFRAADGLWEEHRVEDVATPEGEDRDPELVQAFYNARR	QQQPEIQ
VA SIT2/CODB MN FPYRN I VVL TGAG I SAESGI QTFRAQDGLWENHR I EDVATPEGFARDPDL VQD FYN QRR	KLQDNAIK
WSt2 Sir2/cobBMRIFIFSGAGLDAESGISTFRDANGLWENHDIMEVCNINTFANNYEVTHRFYNERR	QLAEVH
KVP40 Sir2/cobB MR I F I F SGAGLDAESG I STFRDANGLWENHD I MQVCN I N TFLNNYEL THK FYNQRR	QAD VH
*	160
EC Sir2/cobB	W G MPL
VA Sir2/cobB VITONIDNLHERGGSQNVIHMHGELLKARCSESNQVVEHNEDIKTGELCHCCQIPSQMRPH	
\$2 Sir2/cobB NYTANVSDLLERAGCKDVKHIHGELTKIVQDYTSKDSTVIDIGYNEYELRTGRRDKPG	
KVP40 Sir2/cobB NYTANYSDLLERAGCKDVKHIHGELTKIVQDYTSKDSTVIDIGYNEYELRTGRRDKPGV	
	250
EC Sir2/cobB	FVEKLL
VA Sir2/cobB ICTSGVVYPAAGFVHDAKMHGAHTIEINLEPSAVESEEEKRYGKASVEVP	LVDEILAL
ØSt2 Sir2/cobB VESTLEINPIHWDLSATGCKFILINPTGIDTEKHSALN-EAIRMCDVEINKPATEAFDEID7	HIEEHISR
KVP40 Sir2/cobB VCSTLEIN HWDLAKTGCKFILINPTGIDTEKHTELN-EAIRMCDIFINKPATEAFDEID	CHIEEHVSI

Εικόνα 3.45: Ευθυγράμμιση των Sir2/cobB πρωτεϊνών των βακτηρίων *E. coli, V. alginolyticus* και των βακτηριοφάγων φSt2 και KVP40. Ο κόκκινος αστερίσκος τονίζει την ιστιδίνη που βρίσκεται το συντηρημένο ενεργό κέντρο. Τα κουτιά αντιπροσωπεύουν συντηρημένες περιοχές του ενεργού κέντρου (κόκκινο), τα σημεία δέσμευσης της ακετυλιωμένης λυσίνης (πορτοκαλί), των ιοντικών δεσμών αντιπαράλληλων αμινοξέων στη δαχτυλωτή περιοχή δέσμευσης του υδραργύρου (μπλε) και τα σημείο δέσμευσης ψευδαργύρου των βακτηριακών πρωτεϊνών (πορφυρό).

3.4 Η μελέτη της ανθεκτικότητας στους βακτηριοφάγους στο γένος Vibrio «ξεδιπλώνει» μία νέα στρατηγική μεταβολικής προσαρμογής

3.4.1 Ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών του Vibrio alginolyticus σε λυτικούς βακτηριοφάγους

Κατά τη διάρκεια της *in vitro* λύσης των βακτηρίων με τους λυτικούς βακτηριοφάγους, που απομονωνόντουσαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή, φαινόταν η επίκτητη ανθεκτικότητα που εμφανιζόταν στα βακτήρια μετά την συγκαλλιέργεια με τους βακτηριοφάγους. Με σκοπό της μελέτης αυτής, αρχικά δημιουργήθηκαν στο εργαστήριο ανθεκτικά στελέχη για τους βακτηριοφάγους Aphrodite1, *φ*St2, και Ares1, ώστε να εκπροσωπούνται οι κλάσεις "schizoT4like" και "phiKZlikevirus", αλλά και οι δύο οικογένειες *Myoviridae* και *Siphoviridae* (Εικόνα 3.46). Η ανθεκτικότητα των στελεχών επανελέγχθηκε και οδηγήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση αποικίες ανθεκτικές για τον κάθε βακτηριοφάγο. Η πρώτη πειραματική εργασία που πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια ήταν η μελέτη της ανθεκτικότητας μεταξύ όλων των βακτηριοφάγων της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Φάνηκε, ότι η επίκτητη ανθεκτικότητα που εμφανίζεται για τον βακτηριοφάγο *φ*St2 ισχύει και για τον *φ*Grn1 (Εικόνα 3.47).

Βακτηριοφάγος	Οικογένεια	Κλάδος	Ονομασία ανθεκτικών στελεχών
Aphrodite1	Myoviridae	phiKZikevirus	VaAphrodite1
øSt2	Myoviridae	schizoT4like	VaøSt2
Ares1	Siphoviridae	siphophage	VaAres1

Πίνακας 3.14: Πίνακας ανθεκτικών στελεχών που δημιουργήθηκαν για περαιτέρω μελέτη.



Εικόνα 3.46: Σχηματική απεικόνιση δημιουργίας βακτηριακών στελεχών ανθεκτικών σε λυτικούς βακτηριοφάγους και επιλογή ανθεκτικών αποικιών.



Εικόνα 3.47: Έλεγχος ανθεκτικότητας διαφορετικών αποικιών του Vibrio alginolyticus με την τεχνική της αγαρόζης κορυφής. Α→ Μάρτυρας V. alginolyticus. Β→ Μη ανθεκτική αποικία μετά από συγκαλλιέργεια με τον βακτηριοφάγο φSt2. Γ→Ανθεκτική αποικία για τον φGrn1. Δ→ Ανθεκτική αποικία για τον φSt2.

Στη συνέχεια έγινε έλεγχος για την ανθεκτικότητα των αποικιών στους υπόλοιπους βακτηριοφάγους (Πίνακας 3.15). Σημαντικό είναι να τονίσουμε ότι υπήρχε συνέπεια και επαναληψημότητα σε δύο επίπεδα κατά τη διάρκεια του πειράματος: α) Οι ανθεκτικές αποικίες παρέμειναν ανθεκτικές κατά τη διάρκεια όλης της πειραματικής διαδικασίας για τον αρχικό βακτηριοφάγο που συγκαλλιεργήθηκαν και β) Ο έλεγχος της ανθεκτικότητας και για άλλους βακτηριοφάγους έγινε για όλες τις αποικίες και υπήρχε συμφωνία στο ίδιο αποτέλεσμα που παρουσιάζεται στον πίνακα 3.15. Αυτά τα αποτελέσματα οδήγησαν στο να γίνει έλεγχος του γονιδιώματος του Vibrio alginolyticus (όχι μόνο του στελέχους V1, αλλά όλων των στελεχών που έχουν αλληλουχιθεί) για να βρεθούν γονίδια που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στους βακτηριοφάγους τα οποία θα μπορούσαν να προσφέρουν και ειδοεξειδίκευση για κάθε έναν από τους βακτηριοφάγους (π.χ. σύστημα CRISPR/Cas9).

Πίνακας 3.15: Έλεγχος ανθεκτικότητας διαφορετικών αποικιών του Vibrio alginolyticus με την τεχνική του spot για όλους τους απομονωμένους βακτηριοφάγους της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Ο έλεγχος έγινε με τίτλο βακτηριοφάγων τουλάχιστον 3.10⁹ και παρουσιάστηκε ισχυρή λύση των βακτηρίων (+++) ή καθόλου λύση (-).

Ανθεκτικά στελέχη :	φSt2	Aphrodite1	Ares1	Athena1
VaAphrodite1	+++	-	-	+++
VaphiSt2	-	+++	+++	+++
VaAres1	+++	+++	-	-



(±SE).

Στη συνέχεια έγινε καμπύλη ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών για να φανεί αν υπάρχει φαινοτυπική διαφορά ανάμεσα στα στελέχη των ανθεκτικών στους βακτηριοφάγους βακτηρίων και στα μη ανθεκτικά. Παρατηρηθήκε διαφορά στα ανθεκτικά στελέχη **VaφSt2**, όπου φάνηκε μείωση του ρυθμού ανάπτυξης σε σχέση με τον μάρτυρα.

Η αλληλεπίδραση των βακτηρίων και των βακτηριοφάγων έχει φανεί ότι μπορεί να κατευθύνει φαινόμενα συνεξέλιξης σε θαλάσσια ενδιαιτήματα και οικοσυστήματα (Lennon et al., 2007), ενώ ταυτόχρονα μπορεί να συνεισφέρει και στην συνύπαρξη τους και γενετική τους παραλλακτικότητα (Buckling και Rainey, 2002). Ένα μοντέλο όμως που να συμπεριλαμβάνει έναν «αγώνα δρόμου» γονίδιο με γονίδιο του ξενιστή και του «εισβολέα» δεν μπορεί να περιγράψει μια ολιστική και συνεργική συνεξέλιξη (Lenski και Levin, 1985), ούτε να εξηγήσει διάφορους βακτηριακούς φαινοτύπους που προκύπτουν μετά την αλληλεπίδραση, χαρακτηριστικά τα οποία θα μπορούσαν να είναι αποτέλεσμα, μιας πιο πολύπλοκης αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο (Abedon, 2008).

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας απέναντι σε λυτικούς βακτηριοφάγους, είναι μία κοινή και συνηθισμένη απόκριση των βακτηριακών πληθυσμών που έχει προέλθει μετά από εκατομμύρια χρόνια συνεξέλιξης (Holmfeldt et al., 2007).

3.4.2 Ενδοκυτταρικοί ή εξωκυτταρικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας;

Προκειμένου να γίνει μελέτη της επίκτητης ανθεκτικότητας έπρεπε πρώτα να κατανοηθεί αν αυτή μπορεί να έχει σχέση με ενδοκυτταρικούς ή εξωκυτταρικούς μηχανισμούς άμυνας. Για να ξεκαθαριστεί αυτό έγιναν α) συγκριτική γονιδιακή μελέτη του *Vibrio alginolyticus* με σκοπό να βρεθούν γονίδια που σχετίζονται με ενδοκυτταρική ανθεκτικότητα, β) μελέτη της απορρόφησης των βακτηριοφάγων στα ανθεκτικά στελέχη.

Όπως αναφέραμε και στη εισαγωγή, υπάρχουν συγκεκριμένοι τρόποι που μπορεί να γινεί επίκτητη η ανθεκτικότητα σε κάποιον βακτηριοφάγο **εντός του κυττάρου**. Πιο συγκεκριμένα υπάρχουν τα συστήματα CRISPR/Cas, το σύστημα BREX, ενώ και η ύ-

παρξη κάποιου προφάγου στο γονιδίωμα (ή προφαγικά γονίδια) μπορούν να προσδώσουν μια τέτοιου είδους ιδιότητα, η οποία μπορεί δυνητικά να έχει και ειδοεξειδίκευση για έναν κλάδο βακτηριοφάγων. Αναφορικά με την ύπαρξη συστήματος Crispr/Cas, η αυτόματη *in silico* πρόβλεψη γονιδίων που χρησιμοποιήθηκε στο παρελθόν για το στέλεχος V1 *V. alginolyticus* (Castillo et al., 2015) ανίχνευσε 3 πιθανά ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια που πιθανά θα μπορούσαν να κωδικοποιούν για σχετικές CRISPR υπομονάδες (KLI72196, KLI72197, KLI72198, Εικόνα 3.49).



Εικόνα 3.49: Τα πιθανά σχετικά CRISPR γονίδια που έχουν επισημανθεί για *Vibrio alginolyticus* V1 που κωδικοποιούν για τις υπομονάδες Cys2, Cys3 και Cys4 αντίστοιχα.

Παρόλα αυτά χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό CRISPRsFinder για να επιβεβαιωθεί η λειτουργικότητα αυτών. Εκεί φάνηκε ότι ολόκληρο το γονιδίωμα δεν έχει κανένα γνωστό μοτίβο για πρωτεΐνη που κωδικοποιεί κάποια υπομονάδα CRISPR, εκτός από ένα μοτίβο μικρής ομολογίας στην αλληλουχία 18 (contig 18) του γονιδιώματος, που όμως εμφανίζεται σαν λίγο πιθανό (Questionable).

Είναι λογικό ότι αν υπάρχει μια περιοχή που να κωδικοποιεί για πιθανή CRISPR πρωτεΐνη, να υπάρχει στην ίδια γονιδιακή περιοχή το γονίδιο cas που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη κασπάση (Cas). Χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο του λογισμικού HMMCAS που είναι εξειδικευμένο στο να βρίσκει παρόμοια μοτίβα δεν έγινε δυνατο να εντοπιστεί καμία πρωτεΐνη Cas ή κάποιο σχετικό οπερόνιο. Αυτό σημαίνει ότι δεν υπάρχει το σύστημα CRISPR/Cas στο γονιδίωμα του *V. alginolyticus* V1 ή αν υπάρχει κάποιο γονίδιο που κωδικοποιεί για κάποια υπομονάδα του συστήματος (artifact), αυτό θα είναι εν μέρει και όχι πλήρως και άρα ένας μη λειτουργικός μηχανισμός. Ταυτόχρονα ελέγχθηκε και η παρουσία των γονίδιων που σχετίζονται με τον μηχανισμό BREX (Goldfarb et al., 2015). Αν και αυτός ο μηχανισμός αναφέρεται για ανθεκτικότητα έναντι σε λυσιγονικού τύπου βακτηριοφάγους, επειδή είναι αρκετά άγνωστη ακόμη η λειτουργία του, θεωρήθηκε σωστό να γίνει έλεγχος για ομολογία με τυχόν αντίστοιχα γονίδια. Σε κάθε περίπτωση δεν εντοπίστηκε κανένα σχετικό ομόλογο γονίδιο που να κωδικοποιεί για κάποια πρωτεΐνη του συστήματος BREX, αν και είναι λίγα τα χαρακτηρισμένα. Τέλος στο γονιδίωμα του βακτηρίου δεν εντοπίστηκε και κανένας προφάγος ή κάποιο προφαγικό στοιχείο, που θα μπορούσε δυνητικά να προσφέρει ανθεκτικότητα έναντι σε λυτικούς βακτηριοφάγους.

Όπως είναι λογικό, το επόμενο βήμα ήταν να ελεγχθεί τυχόν απορρόφηση των βακτηριοφάγων, στα αντίστοιχα ανθεκτικά στελέχη βακτηρίου. Για τον σκοπό αυτό έγινε συγκαλλιέργεια των ανθεκτικών βακτηρίων μαζί με τους αντίστοιχους βακτηριοφάγους και φάνηκε ότι δεν υπάρχει καμία σημαντική μεταβολή στον τίτλο των βακτηριοφάγων πριν και μετά τη συγκαλλιέργεια ακόμα και μετά από 16 ώρες συγκαλλιέργειας. Αποτελέσματα για τον βακτηριοφάγο Ares1 εμφανίζονται στο διάγραμμα 3.9.



Διάγραμμα 3.9: Τίτλος (PFU/ml) βακτηριοφάγου Ares1 στα ανθεκτικά στελέχη VaAres1 σε σχέση με τον μάρτυρα που δεν έχει ανθεκτικότητα στον βακτηριοφάγο. Διακρίνεται η σταθερότητα του τίτλου των ιοσωματιδίων όταν συγκαλλιεργήθηκαν με τα ανθεκτικά στελέχη ακόμα και 960 min μετά την έναρξη της συγκαλλιέργειας.

Τα αποτελέσματα αυτών των αναλύσεων μας προσανατόλισαν προς το ότι η επίκτητη ανθεκτικότητα (acquired resistance) έχει εξωκυτταρική φύση με αποτέλεσμα στη συνέχεια να γίνει μελέτη των ανθεκτικών κυττάρων και πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων, όπως επίσης και μελέτη δευτερογενών μεταβολιτών και βιοχημικών μονοπατιών των ανθεκτικών στελεχών.

Οι ενδοκυταρικοί μοριακοί μηχανισμοί «άμυνας» απέναντί στους βακτηριοφάγους έχουν καλά χαρακτηριστεί και περιγραφεί μέσα στα χρόνια, συμπεριλαμβανομένων των περιοριστικών ενδονουκλεασών, των μηχανισμών CRISPR/Cas9 (Sorek et al., 2008), τη στρατηγική BREX (Goldfarb et al., 2015), τον πιο πρόσφατο μηχανισμό DISARM (Ofir et al., 2018) ή τον μηχανισμό της πρωτεΐνης «Αργοναύτης» (Argonautebased interference) (Swarts et al., 2013). Επιπροσθέτως ο μηχανισμός απόρριψης (Abortive infection, abi) που επάγεται από πλασμίδια, προωθεί τον κυτταρικό θάνατο κατά την μόλυνση και επομένως τη διάσωση του υπόλοιπου πληθυσμού (Sing και Klaenhamer, 1990) είναι ένας ακόμη ενδιαφέρον μηχανισμός. Τέλος οι προφάγιοι ή προφαγικά στοιχεία έχουν επίσης δειχθεί ότι μπορούν να προστατέψουν το κύτταρο και την βιωσιμότητά του απέναντι σε λυτικούς φάγους (Dedrick et al., 2017), ολοκληρώνοντας τους ενδοκυτταρικούς μηχανισμούς άμυνας.

Αν και αυτοί οι μηχανισμοί τροποποιημένοι (ή μεταλλαγμένοι) μετά την αλληλεπίδραση φάγων: βακτηρίων μπορούν να προσφέρουν ανθεκτικό φαινότυπο στον ξενιστή, δεν μπορούν να περιγράψουν κάποια φαινόμενα ανθεκτικότητας που λαμβάνουν χώρα εξωκυτταρικά ή ακόμα περισσότερο σε βακτηριακά είδη που δεν κατέχουν αυτά τα μοριακά «εργαλεία» άμυνας. Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι η επιβίωση των βακτηρίων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από μία εξελικτική «πλαστικότητα» (agile evolve) (Stern and Sorek, 2011), εξέλιξη η οποία θα μπορούσε να εκπροσωπηθεί, είτε από μεταλλαγές στο γονιδιώμα (Pal et al., 2007), ή/και από ρύθμιση ενός ήδη υπάρχοντος μηχανισμού για να αντιμετωπίσει την επικείμενη μόλυνση (Labrie et al., 2010; Samson et al., 2013).

3.4.2.1 Μελέτη του μεταγραφικού προτύπου μεμβρανικών και διαμεμβρανικών πρωτεϊνών της εξωκυτταρικής βακτηριακής μεμβράνης

Τροποποίηση των πρωτεϊνών, είτε σε επίπεδα μεταγραφής, είτε σε επίπεδο δομής, στις μεμβράνες των βακτηρίων μπορούν να αποτελέσουν στρατηγική άμυνας απέναντι σε βακτηριοφάγους (Labrie et al., 2010). Ίσως το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο βακτηριοφάγος λ που χρησιμοποιεί κατά κύριο λόγο μία πορίνη μαλτόζης στη μεμβράνη του βακτηρίου *Ε. coli* για να προσκολληθεί, εγχέει το γονιδίωμά του μέσω αυτής στον περιπλασμικό χώρο και στη συνέχεια μέσο ενός PTS μεταφορέα μαννόζης το DNA εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα (Werts et al., 1994). Έχοντας υπόψη τους μηχανισμούς μόλυνσης που έχουν οι βακτηριοφάγοι μέσω των μεμβρανικών και διαμεμβρανικών μεταφορέων των βακτηριών και με στόχο την πιθανή μεταβολή έκφρασής τους από τα ανθεκτικά βακτήρια, ώστε να μειώσουν τις πιθανότητες να γίνει εισαγωγή του γενετικού υλικού των ιοσωματιδίων στην κυτταρική μεμβράνη, έγινε απομόνωση RNA κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης των βακτηρίων και μελέτη της σχετικής έκφρασης μεμβρανικών και διαμεμβρανικών πρωτεϊνών.

Γενικά οι βακτηριοφάγοι αναγνωρίζουν αρκετούς υποδοχείς στις εξωτερικές βακτηριακές μεμβράνες που μπορεί να αποτελούν εκτός από πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες (Shin et al., 2012). Κάποιες από αυτές τις πρωτεΐνες που μελετήθηκε το μεταγραφικό τους πρότυπο στην παρούσα διδακτορική διατριβή είναι η πορίνη βιταμινών BtuB (Kim and Ryu, 2011) και η πορίνη μεταφοράς μαλτόζης *LamB* (Werts et al., 1994), η πρωτεΐνη ρύθμισης όσμωσης OmpF (Ho and Slauch, 2001), αλλά και ο ABC μεταφορέας TolC (Ricci and Piddock, 2010).

Τα αποτελέσματα έδειξαν καμία στατιστικά σημαντική διαφορά για τις πρωτεΐνες TolC και BtuB. Για την πρωτεΐνη OmpF παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα σχετικής έκφρασης για τα ανθεκτικά στους βακτηριοφάγους στελέχη **VaAphrodite1** και **VaφSt2** έως και 8 φορές (Εικόνα 3.50). Αντίστοιχα για την πρωτεΐνη με λειτουργία πορίνης LamB παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα σχετικής έκφρασης του γονιδίου που την κωδικοποιεί για τα ανθεκτικά στους βακτηριοφάγους στελέχη **VaφSt2** και **VaAres1** που στην περίπτωση των στελεχών **VaφSt2** τα μεταγραφήματα ήταν μειωμένα ως και 60 φορές σε σχέση με τον μάρτυρα, ενώ για τα ανθεκτικά στελέχη του βακτηριοφάγου Ares1, ήταν τουλάχιστον 6 φορές μειωμένα.



Εικόνα 3.50: Μελέτη των επιπέδων σχετικής έκφρασης (±SE) πιθανών υποδοχέων στη μεμβράνη των βακτηρίων στον μάρτυρα (Control) και τα ανθεκτικά στελέχη VaAphrodite1, VaφSt2 και VaAres1. Ο αστερίσκος συμβολίζει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε ανθεκτικά στελέχη και μάρτυρα (Anova, t-test, *p*<0.05). Τα αποτελέσματα εμφανίζονται αναλυτικά και στα Παραρτήματα, Πίνακας 5.

Μειωμένη παρουσία του υποδοχέα LamB σε μεταλλαγμένα στελέχη *Ε. coli* έχει δείξει ότι μπορεί να αποτελέσει εμπόδιο απορρόφησης και προσκόλλησης του βακτηριοφάγου λ στον ξενιστή *Ε. coli* (Chatterjee και Rothenberg, 2012). Ένα τέτοιο φαινόμενο μπορεί να συμβαίνει και για τον βακτηριοφάγο Ares1 που αποτελεί και εκείνος μέλος της οικογένειας *Siphoviridae*. Για τους βακτηριοφάγους των κλάδων "phiKZlikevirus" και "schizoT4like" δεν υπάρχουν στοιχεία στην διεθνή βιβλιογραφία για τον συγκεκριμένο υποδοχέα, που όμως φαίνεται να επηρρεάζονται τα σχετικά επίπεδα έκφρασης και τα ανθεκτικά στελέχη VaφSt2. Ένα αντίστιχο φαινόμενο θα μπορούσενα ισχύει και για την

3.4.2.2 Μελέτη του μεταγραφικού προτύπου των μεμβρανικών και διαμεμβρανικών πρωτεϊνών

Σε κάθε περίπτωση η προσκόλληση του ιοσωματιδίου αποτελεί το πρώτη βήμα κατά τον μηχανισμό μόλυνσης. Στη συνέχεια το DNA πρέπει να εισέλθει μέσα στο κυτταρόπλασμα μέσο ενός περατού καναλιού ή μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης η οποία επικοινωνεί μεταξύ περιπλασμικού χώρου και κυταροπλάσματος. Τέτοιες πρωτεΐνες μπορούν να είναι PTS ή ABC μεταφορείς θρεπτικών, όπως στην περίπτωση του βακτηριοφάγου λ που χρησιμοποιεί το σύστημα μεταφοράς μαννόζης για να εισέλθει το DNA του στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή. Για αυτόν τον λόγο επιλέχτηκαν συστήματα μεταφορέων στο βακτήριο *Vibrio alginolyticus* για να μελετηθούν τα μεταγραφικά τους πρότυπα σε ανθεκτικά και μη ανθεκτικά στελέχη.

Αν και οι μεταφορείς που επιλέχτηκαν δεν εκπροσωπούν όλα τα είδη μεταφορέων, παρόλα αυτά πιθανά είναι το πιο «κοινό» μέσο για έγχυση του γονιδιώματος από τον περιπλασμικό χώρο στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου. Οι μεταφορείς που μελετήθηκαν ήταν κυρίως τύπου ABC, PTS, που σημαίνει ότι αποτελούνται από αρκετές διαφορετικές υπομονάδες. Γενικά έγινε μελέτη σχετικής έκφρασης των διαμεμβρανικών υπομονάδων (περμεασών), αλλά έγινε και επιλεκτικά η μελέτη της έκφρασης άλλων υπομονάδων για να διερευνηθεί αν υπάρχει μεταβολή της έκφρασης και αυτών. Έγινε πλήρης ανίχνευση και χαρακτηρισμός των υπομονάδων και των λειτουργιών τους, αφού η *in silico* πρόβλεψη στο γονιδίωμα ήταν ελλιπής (Πίνακας 3.11).

Οι πρώτοι μεταφορείς που μελετήθηκαν αφορούσαν τη μεταφορά αλιφατικών αμινοξέων με πλευρικές αλυσίδες, όπως η λευκίνη η βαλίνη και η ισολεύκινη (Εικόνα 3.51). Τα γονίδια που μελετήθηκαν αφορούσαν περμεάσες των ABC μεταφορέων και πιο συγκεκριμένα οι LivH και LivB και Azlc. Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης των LivH και LivB 2, 5 και 3 φορές σε σχέση με τον μάρτυρα για τα ανθεκτικά στελέχη **VaAphrodite1**, **VaφSt2** και **VaAres1** αντίστοιχα και για τα 2 γονίδια ενώ για τις άλλες δύο περμεάσες μόνο τα ανθεκτικά στελέχη στον φSt2 εμφάνισαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα σχετικά επίπεδα έκφρασης 4 περίπου φορές.

Στη συνέχεια ακολούθησε μελέτη των μεταφορέων που ευθύνονται για τη μεταφορά αμινοξέων που περιέχουν θείο όπως η κυστεΐνη και η μεθειονίνη (Εικόνα 3.52). Στην περίπτωση της κυστεΐνης μελετήθηκε το γονίδιο tcyP που εδράζεται διαμεμβρανικά και είχε στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα σχετικής έκφρασης σε σχέση με τον μάρτυρα στα ανθεκτικά στελέχη **VaAphrodite1**, **VaφSt2** και **VaAres1** 5, 10 και περίπου 3 φορές αντίστοιχα. Στην περίπτωση της μεθειονίνης μελετήθηκαν όλες οι υπομονάδες που απαρτίζουν τον ABC μεταφορέα και πιο συγκεκριμένα οι Metl, MetN και MetQ. Φάνηκε παρόμοιο μεταγραφικό προφίλ με μόνο τα ανθεκτικά στελέχη

Πίνακας 3.11: Αντιστοίχιση των γονιδίων των μεταφορέων που εμφανίζονται στην Εικόνα 3.64 με τη συμμετοχή τους στη μεταφορά στον ανάλογο μεταβολίτη, το είδος του μεταφορέα και την υπομονάδα που μελετήθηκε. Με σκούρο μπλε εμφανίζονται τα γονίδια που συμμετέχουν στη μεταφορά σακχάρων, με καφέ αμινοξέων και με θαλασσί οι ρυθμιστές αζώτου και φωσφόρου για τους PTS μεταφορείς.

Όνομα γονιδίου	Συμμετέχει στην μεταφορά	Είδος Μεταφορέα	Υπομονάδα	Λειτουργία υπομονάδας
MtlA	Μαννιτόλης	PTS	IIA, IIB, IIC	Δέσμευση, μεταφορά και Ενέργεια
TreB	Τρεχαλόζης	PTS	IIB, IIC	Δέσμευση, μεταφορά
FruA	Φρουκτόζης	PTS	IIB, IIC	Δέσμευση, μεταφορά
CelB	Κυτταρίνη	PTS	IIC	Δέσμευση
RbsA	Ριβόζης	ABC	ΑΤΡ-υποδοχέας	Ενέργεια
PtsG1	Γλυκόζης	PTS	IIB, IIC	Δέσμευση, μεταφορά
PtsG2	Γλυκόζης	PTS	IIB, IIC	Δέσμευση, μεταφορά
Crr	Γλυκόζης	PTS	IIA	Ενέργεια
TyrP	Τυροσίνης			
MetQ	Μεθειονίνης	ABC	Υποδοχέας υποστρώματος	Δέσμευση
Metl	Μεθειονίνης	ABC	Διαμεμβρανική υπομονάδα	Μεταφορά
MetN	Μεθειονίνης	ABC	ΑΤΡ-υποδοχέας	Ενέργεια

ArtP	Αργινίνης	ΑΒC Υποδοχέας Δέσμευση		Δέσμευση
			υποστρώματος	
Artl	Αργινίνης	ABC	ΑΤΡ-υποδοχέας	Ενέργεια
tcyP	Κυστεΐνης			Μεταφορά
LysE	Λυσίνης	LysE-like		Εξαγωγή Λυσίνης
RhtB 1	Ομοσερίνης και Θρεονίνης	LysE-like		Εξαγωγή Ομοσερί- νης και Θρεονίνης
RhtB 2	Ομοσερίνης και Θρεονίνης	LysE-like		Εξαγωγή Ομοσερί- νης και Θρεονίνης
HisP	Λυσίνης, Ιστιδίνης, Αργινίνης, Ορνιθί- νης	ABC	ΑΤΡ-υποδοχέας	Ενέργεια
AZLC 1	Βαλίνη, Ισολευκί- νη, Λευκίνη	ABC	Διαμεμβρανική υπομονάδα	Μεταφορά
AZLC 2	Βαλίνη, Ισολευκί- νη, Λευκίνη	ABC	Διαμεμβρανική υπομονάδα	Μεταφορά
LivH	Βαλίνη,Ισολευκίνη, Λευκίνη	ABC	Διαμεμβρανική υπομονάδα	Μεταφορά
LivM	Βαλίνη,Ισολευκίνη, Λευκίνη	ABC	Διαμεμβρανική υπομονάδα	Μεταφορά



Εικόνα 3.51: Μελέτη των επιπέδων σχετικής έκφρασης γονιδίων (±SE) που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες του βακτηρίου που σχετίζονται με τη μεταφορά αλιφατικών αμινοξέων με πλευρικές ομάδες, στον μάρτυρα (Control) και τα ανθεκτικά στελέχη VaAphrodite1, VaφSt2 και VaAres1. Ο αστερίσκος συμβολίζει στατιστικά

σημαντική διαφορά ανάμεσα σε ανθεκτικά στελέχη και μάρτυρα (Anova, t-test, *p*<0.05). Τα αποτελέσματα εμφανίζονται αναλυτικά και στα Παραρτήματα, Πίνακας 5.

στον βακτηριοφάγο Aphrodite1 να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα σχετικής έκφρασης και στις 3 υπομονάδες και πιο συγκεκριμένα 3, 6 και 5 φορές αντίστοιχα , ενώ και τα ανθεκτικά **VaφSt2** παρουσίασαν μειωμένα επίπεδα όπου μόνο στην υπομονάδα *MetN* ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένα 3 φορές σε σχέση με τα μη ανθεκτικά στελέχη.Τα ανθεκτικά **VaAres1** δεν παρουσίασαν σημαντική μεταβολή στα μεταγραφήματα σε σχέση με τον μάρτυρα. Ακολούθησε η μελέτη μεταφορέων αργινίνης, όπου δε φάνηκε κάποια στατιστικά σημαντικά στελέχη (Εικόνα 3.53).



Εικόνα 3.52: Μελέτη των επιπέδων σχετικής έκφρασης γονιδίων (±SE) που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη μεταφορά αμινοξέων που περιέχουν θείο, στον μάρτυρα (Control) και τα ανθεκτικά στελέχη στους βακτηριοφάγους VaAphrodite1, VaφSt2 και VaAres1. Ο αστερίσκος συμβολίζει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε ανθεκτικά στελέχη και μάρτυρα (Anova, t-test, *p*<0.05). Τα αποτελέσματα εμφανίζονται αναλυτικά και στα Παραρτήματα, Πίνακας 5.

VaAphrodite1 και **VaAres1**, ενώ στην περίπτωση του μεταφορέα τυροσίνης tyrp δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή μεταξύ μάρτυρα και ανθεκτικών στελεχών.



Εικόνα 3.53: Μελέτη των επιπέδων σχετικής έκφρασης γονιδίων (±SE) που κωδικοποιούν για πρωτεϊνες που σχετίζονται με τη μεταφορά των αμινοξέων αργινίνης και τυροσίνης, στον μάρτυρα (Control) και τα ανθεκτικά στελέχη στους βακτηριοφάγους VaAphrodite1, VaφSt2 και VaAres1. Ο αστερίσκος συμβολίζει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε ανθεκτικά στελέχη και μάρτυρα (Anova, t-test, *p*<0.05). Τα αποτελέσματα εμφανίζονται αναλυτικά και στα Παραρτήματα, Πίνακας 5.

Για την περίπτωση της λυσίνης μελετήθηκε ο εξαγαγωγέας λυσίνης *LysE*, όπου στην περίπτωση των ανθεκτικών στελεχών **VaφSt2** παρατηρήθηκαν σχεδόν μηδενικά επίπεδα σχετικής έκφρασης, ενώ για τα υπόλοιπα στελέχη δεν υπήρχε μεταβολή σε σχέση με τον μάρτυρα (Εικόνα 3.54). Τύπου LysE-like είναι και το γονίδιο Rhtb που φέρει δύο ισομορφές στο γονιδίωμα του *V. alginolyticus* και κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη που ευθύνεται για την εξαγωγή Ομοσερίνης και Θρεονίνης από το κυτταρόπλασμα (Εικόνα 3.54).



Εικόνα 3.54: Μελέτη των επιπέδων σχετικής έκφρασης γονιδίων (±SE) που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες Lys-Ε που σχετίζονται με τη μεταφορά των αμινοξέων λυσίνης, θρεονίνης και ομοσερίνης στον μάρτυρα (Control) και τα ανθεκτικά στελέχη στους βακτηριοφάγους VaAphrodite1, VaφSt2 και VaAres1. Ο αστερίσκος συμβολίζει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε ανθεκτικά στελέχη και μάρτυρα (Anova, t-test, *p*<0.05). Τα αποτελέσματα εμφανίζονται αναλυτικά και στα Παραρτήματα, Πίνακας 5.

Σε μία από τις ισομορφές παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση στα ανθεκτικά στελέχη **VaAphrodite1** και **VaφSt2** που έφτασε τις 3 φορές μείωση και στην περίπτωση των **VaφSt2** ήταν και στατιστικά σημαντικά μειωμένα τα επίπεδα έκφρασης. Τέλος μελετήθηκε και η πρωτεΐνη Hisp που δεν είναι διαμεμβρανική αλλά ευθύνεται για την τροφοδότηση των ABC μεταφορέων με ενέργεια σε μορφή ATP (Εικόνα 3.55). Πιο συγκεκριμένα τροφοδοτεί με ATP υπομονάδες που μεταφέρουν Λυσίνη, Ιστιδίνη, Αργινίνη και Ορνιθίνη. Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά στελέχη **VaAphrodite1** και **VaφSt2** με μείωση 3 και 4 φορές αντίστοιχα.



Εικόνα 3.55: Μελέτη των επιπέδων σχετικής έκφρασης γονιδίων (±SE) που κωδικοποιούν για την πρωτεϊνη του βακτηρίου Hisp που σχετίζεται με τη μεταφορά λυσίνης, ιστιδίνης, αργινίνης και ορνιθίνης, στον μάρτυρα (Control) και τα ανθεκτικά στελέχη στους βακτηριοφάγους VaAphrodite1, VaφSt2 και VaAres1. Ο αστερίσκος συμβολίζει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε ανθεκτικά στελέχη και μάρτυρα (Anova, t-test, *p*<0.05). Τα αποτελέσματα εμφανίζονται αναλυτικά και στα Παραρτήματα, Πίνακας 5. Στη συνέχεια ακολούθησε η μελέτη του μεταγραφικού προτύπου πρωτεΐνών που σχετίζονται με τη μεταφορά σακχάρων και πολυολών στο κύτταρο. Αρχικά μελετήθη-



Εικόνα 3.56: Μελέτη των επιπέδων σχετικής έκφρασης γονιδίων (±SE) που κωδικοποιούν για τις πρωτεϊνες του βακτηρίου που σχετίζονται με τη μεταφορά του σακχάρου γλυκόζης, στον μάρτυρα (Control) και τα ανθεκτικά στελέχη στους βακτηριοφάγους VaAphrodite1, VaφSt2 και VaAres1. Ο αστερίσκος συμβολίζει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε ανθεκτικά στελέχη και μάρτυρα (Anova, t-test, *p*<0.05). Τα αποτελέσματα εμφανίζονται αναλυτικά και στα Παραρτήματα, Πίνακας 5.

κε το πρότυπο έκφρασης των υπομονάδων που σχετίζονται με την πρόσληψη γλυκόζης από τον περιπλασμικό χώρο (Εικόνα 3.56). Το συγκεκριμένο σύστημα μεταφοράς ανήκει στην οικογένεια PTS μεταφορέων και ευθύνεται και για την φωσφορυλίωση της γλυκόζηςκατά τη διάρκεια της μεταφοράς από τον περιπλασμικό χώρο. Το *V. algonolyticus* φέρει δύο ισομορφές της διαμεμβρανικής περμεάσης που κωδικοποιείται από το γονίδιο *PtsG* που κάνει και την πρόσληψη της γλυκόζης από τον περιπλασμικό χώρο, ενώ φέρει και μία υπομονάδα που κωδικοποιείται από το γονίδιο *Crr* που προσφέρει ενέργεια στο σύστημα σε μορφή ATP. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι για την υπομονάδα *PTSG* 1 εμφανίστηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης για τα ανθεκτικά στελέχη **VaAphrodite1**, που ήταν και το μοναδικό γονίδιο που σχετίζεται με την πρόσληψη θρεπτικών που εμφάνισε στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε όλη την πειραματική διαδικασία. Σε αντίθεση η δεύτερη ισομορφή PTSG 2 εμφάνισε στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης 7, 2 και 3 φορές και για τα 3 ανθεκτικά στελέχη **VaAphrodite1**, **γ**



Εικόνα 3.57: Μελέτη των επιπέδων σχετικής έκφρασης γονιδίων (±SE) που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες του βακτηρίου που σχετίζονται με τη μεταφορά των σακχάρων τρεχαλόζης, φρουκτόζης και μαννιτόλης στον μάρτυρα (Control) και τα ανθεκτικά στελέχη στους βακτηριοφάγους VaAphrodite1, VaφSt2 και VaAres1. Ο αστερίσκος συμβολίζει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε ανθεκτικά στελέχη και μάρτυρα (Anova, t-test, *p*<0.05). Τα αποτελέσματα εμφανίζονται αναλυτικά και στα Παραρτήματα, Πίνακας 5.

Αντίστοιχο μοτίβο μειωμένων επιπέδων έκφρασης εμφανίστηκε και για την υπομονάδα Crr, όπου τα σχετικά επίπεδα έκφρασης μειώθηκαν 10, 4 και 4 φορές και για τα 3 ανθεκτικά στελέχη VaAphrodite1, VaφSt2 και VaAres1 αντίστοιχα.

Στη συνέχεια αναλύθηκαν τρία γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες σχετικές με τη μεταφορά τρεχαλόζης, φρουκτόζης και μανιττόλης (Εικόνα 3.57). Αρχικά μελετήθηκε το γονίδιο *TreB* που κωδικοποιεί για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου PTS, η οποία ευθύνεται για τη δέσμευση και μεταφορά τρεχαλόζης από τον περιπλασμικό χώρο στο κυτταρόπλασμα. Το συγκεκριμένο γονίδιο εμφάνισε στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης στα ανθεκτικά στελέχη για τον βακτηριοφάγο Aphrodite που έφτασαν μέχρι και τις 5 φορές μείωση σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα υπόλοιπα ανθεκτικά στελέχη δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές. Στη συνέχεια αναλύθηκε το γονίδιο *FruA* που κωδικοποιεί για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου PTS, η οποία ευθύνεται για τη δέσμευση και μεταφορά φρουκτοζης από τον περιπλασμικό χώρο στο κυτταρόπλασμα. Το συγκεκριμένο γονίδιο δεν εμεφάινισε στατιστικά συμαντικές διαφορές στα ανθεκτικά στελέχη σε σχέση με τον μάρτυρα. Ακόμη μελετήθηκε το γονίδιο *MtlA* που κωδικοποιεί για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου PTS, η οποία ευθύνεται για τη δέσμευση, μεταφορά μαννιτόλης, αλλά και την προσφορά ενέργειας κατά τη μεταφορά από τον περιπλασμικό χώρο στο κυτταρόπλασμα. Το συγκεκριμένο γονίδιο εμφάνισε ελαφρά στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης για τα στελέχη **VaAphrodite1** και πολύ μειωμένα για τα στελέχη **VaφSt2** που έφτασαν μέχρι και σχεδόν τις 10 φορές σε σχέση με τον μάρτυρα.



Εικόνα 3.58: Μελέτη των επιπέδων σχετικής έκφρασης γονιδίων (±SE) που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες του βακτηρίου που σχετίζονται με τη μεταφορά των σακχάρων ριβόζης και κυτταρίνης, στον μάρτυρα (Control) και τα ανθεκτικά στελέχη στους βακτηριοφάγους VaAphrodite1, VaφSt2 και VaAres1. Ο αστερίσκος συμβολίζει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε ανθεκτικά στελέχη και μάρτυρα (Anova, t-test, *p*<0.05). Τα αποτελέσματα εμφανίζονται αναλυτικά και στα Παραρτήματα, Πίνακας 5.

Στη συνέχεια μελετήθηκε και το γονίδιο *RbsA* (Εικόνα 3.58) που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που προσφέρει ATP σε ένα σύμπλεγμα υπομονάδων ABC που συμμετέχουν στη μεταφορά ριβόζής. Η μελέτη του προτύπου έκφρασης έδειξε στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης και για τα 3 ανθεκτικά στελέχη **VaAphrodite1**, **VaφSt2**, **VaAres1** που φτάσανε μέχρι και τις 7, 3 και 3 φορές αντίστοιχα. Τέλος μελετήθηκε και το γονίδιο CelB που κωδικοποιεί για τη διαμεμβρανική υπομονάδα περμεάση ενός PTS μεταφορέα κυτταρίνης. Τα αποτελέσατα έδειξαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης για τα ανθεκτικά στελέχη **VaAphrodite1** και **VaφSt2** που έφτασαν έως και τις 5 και 3 φορές αντίστοιχα σε σχέση με τον μάρτυρα, ενώ τα ανθεκτικά στελέχη **VaAres1** δεν είχαν κάποια μεταβολή στα σχετικά επίπεδα έκφρασης. Ταυτόχρονα οι μοριακοί μηχανισμοί των PTS μεταφορέων των βακτηρίων συμπεριλαμβάνουν το γονίδιο PtsH που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη Hpr που ευθύνεται για τη μεταφορά ενός μορίου φωσφόρου από το φωσφοροένολοπυροσταφυλικό οξύ σε όλους τους PTS μεταφορείς σακχάρων με σκοπό την φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων. Εμφάνισε στατιστικά σημαντική μείωση έκφρασης στα ανθεκτικά στελέχη VaφSt2 2 φορές μειωμένη τουλάχιστον σε σχέση με τον μάρτυρα. Επίσης οι PTS μεταφορείς ξεπερνούν τη μεταφορά μόνο σακχάρων και φαίνεται ότι μπορούν και ρυθμίζουν τη μεταφορά και αφομοίωση αζώτου με παρόμοιο τρόπο (Pflüger και Lorenzo, 2007). Μέσα σε αυτό το πλαίσιο μελετήθηκε το γονίδιο PtsN που συμμετέχει σε ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών τύπου PTS και που ευθύνεται για τη μεταφορά αζώτου στο κυτταρόπλασμα. Κωδικοποιεί για μια διαμεμβρανική περμεάση με λειτουργία τη μεταφορά αζώτου από τον περιπλασμικό χώρο στο κυταρόπλασμα. Το γονίδιο της διαμεμβρανικής περμεάσης εμφάνισε στατιστικά σημαντικά μειωμένη έκφραση και για τα ανθεκτικά στελέχη VaAphrodite1 και για τα VaφSt2 μειωμένα κατά 10 και 5 φορές αντίστοιχα σε σχέση με τον μάρτυρα (Εικόνα 3.59). Τα ανθεκτικά στελέχη VaAres1 δεν μετέβαλλαν καθόλου τα επίπεδα έκφρασης αυτών των γονιδίων σε σχέση με τον μάρτυρα.



Εικόνα 3.59: Μελέτη των επιπέδων σχετικής έκφρασης γονιδίων (±SE) που κωδικοποιούν για τις πρωτεϊνες του βακτηρίου που σχετίζονται με τη φωσφοριλίωση των σακχάρων και τη μεταφορά αζώτου, στον μάρτυρα (Control) και τα ανθεκτικά στελέχη στους βακτηριοφάγους VaAphrodite1, VaφSt2 και VaAres1. Ο αστερίσκος συμβολίζει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε ανθεκτικά στελέχη και μάρτυρα (Anova, t-test, *p*<0.05). Τα αποτελέσματα εμφανίζονται αναλυτικά και στα Παραρτήματα, Πίνακας 5.

Είναι φυσικό να σκεφτούμε ότι η απώλεια ή η αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωση της κυτταρικής μεμβράνης ή του κυτταρικού τοιχώματος, τα οποία αλληλεπιδρούν άμεσα, κατά την φαγική πρόσδεση και εναπόθεση του γονιδιωματικού υλικού, δυνητικά θα μπορούσε να λαμβάνει μέρος στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας (Inoue et al., 1995; Bohannan και Lenski, 2000; Labrie et al., 2010; Samson et al., 2013). Κατά τη διάρκεια των ετών ένας αρκετά μεγάλος αριθμός υποδοχέων των βακτηριοφάγων για ιιπρόσδεση έχει χαρακτηριστεί και περιγραφεί, συμπεριλαμβανομένων кή διαμεμβρανικών μεταφορέων θρεπτικών (Lenski και Levin, 1985), με τον κύριο ρόλο τους να είναι η αφομοίωση θρεπτικών από το περιβάλλον και τον περιπλασμικό χώρο δρώντας ως «κανάλια» επικοινωνίας (Maloney, 1994). Το V. alginolyticus είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο το οποίο έχει απομονωθεί από διάφορα θαλάσσια ενδιαιτήματα ανά τον κόσμο και το γονιδίωμά του δεν φέρει όπως είδαμε στο προηγούμενο υποκεφάλαιο (ή δεν έχουν χαρακτηριστεί καλά) γονίδια που θα μπορούσαν να συσχετιστούν με ενδοκυτταρική άμυνα απέναντι στους βακτηριοφάγους εκτός από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες (Castillo et al., 2015). Τα αποτελέσματα φανέρωσαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα σχετικά επίπεδα έκφρασης σε αρκετά μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη μεταφορά θρεπτικών (συμπεριλαμβανομένων και των υπομονάδων τους) μετά την αλληλεπίδρασή τους με διαφορετικούς λυτικούς βακτηριοφάγους. Παρατηρήθηκε σχεδόν αποκλειστικά ελάττωση των σχετικών επιπέδων έκφρασης, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις όπως αυτή της κυστεΐνης (για όλα τα ανθεκτικά στελέχη) και της λυσίνης για τα στελέχη VaφSt2 τα σχετικά επίπεδα έκφρασης ήταν κοντά στο 0. Στη μόνη περίπτωση που παρατηρήσαμε θετική απόκριση της γονιδιακής έκφρασης είναι σε μία από τις δύο διαμεμβρανικές υπομονάδες του μεταφόρεα γλυκόζης (PtsG 1) που πιθανά οφείλεται στην αντιστάθμιση που χρειάζεται κύτταρο από την ελάττωση της έκφρασης της δεύτερης διαμεμβρανικής πρωτεΐνης (PtsG 2) στα ανθεκτικά στελέχη του βακτηριοφάγου Aphrodite1. Συνολικά τα αποτελέσματα δείχνουν προς μία ισχυρή μεταγραφική μεταβολή και ανακατεύθυνση των μεταφορέων που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη που μάλιστα διαφέρει κατά πολύ ανάλογα με τον βακτηριοφάγο που έχουν αλληλεπιδράσει τα κύτταρα με τους μεγάλους σε γονιδίωμα βακτηριοφάγους Aphrodite1 και *φ*St2 να επιφέρουν δραματικότερες αλλαγές στην έκφραση των μεταφορέων σε σχέση με τον Ares1. Αποδείξεις σχετικά με την μεταγραφική μεταβολή μεταφορέων της κυτταρικής μεμβράνης, αλλά την ώρα της μόλυνσης και όχι σε ανθεκτικά βακτήρια, έχουν φανεί στην ερευνητική εργασία της Chevallereau et al., 2016, όπου έγινε ανάλυση όλου του μεταγραφήματος ενός αρνητικού κατά Gram βακτηρίου (*Pseudomonas aeruginosa*). Τέλος κατά τη διάρκεια της μόλυνσης του βακτηριοφάγου T4,έχει αποδειχθεί ότι πρέπει να υπάρχει μία επαναδιαμόρφωση της εσωτερικής μεμβράνης (Inner membrane proeins redistribution) του βακτηρίου-ξενιστή για μία επιτυχή μόλυνση (Εικόνα 3.60, Tarahovsky et al., 1991). Μία μεταγραφική μεταβολή αυτών των πρωτεϊνών από το ίδιο το κύτταρο πιθανά θα μπορούσε να μειώσει την πιθανότητα για μία πετυχημένη ιική πρόσδεση και μόλυνση.



Εικόνα 3.60: Σχηματική απεικόνιση της σύμπτυξης των 2 μεμβρανών κατά τη διάρκεια της μόλυνσης του βακτηριοφάγου T4 και η αναφορά στην αναγκαία επαναδιαμόρφωση των πρωτεϊνών της εσωτερικής μεμβράνης (Inner membrane proteins redistribution). ΟΜ για εξωτερική μεμβράνη, IM για εσωτερική μεμβράνη (Tarahovsky et al., 1991).

3.4.2.3 Μελέτη του μεταγραφικού προτύπου γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση αμινοξέων

Οι μεγάλες μεταβολές στο μεταγραφικό πρότυπο πολλών πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη μεταφορά θρεπτικών συστατικών, οδήγησαν στην υπόθεση ότι πιθανά μεταβάλλεται αρκετά και η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, κυρίως αμινοξέων, εντός του κυττάρου. Μελετήθηκαν βιοχημικά μονοπάτια, όπως η βιοσύνθεση των **Πίνακας 3.12:** Λίστα με τα γονιδία που μελετήθηκαν, και παρουσιάζονται και στην εικόνα 3.64, σε ανθεκτικά στους βακτηριοφάγους και μη στελέχη και σχετίζονται με βασικές βιοχημικές διεργασίες του βακτηρίου *Vibrio alginolyticus*.

Γονίδιο	Ένζυμο που κωδικοποιεί	E.C. Number	Βιοχημικό μονοπάτι
Ald	Αφυδρογονάση της αλανίνης	1.4.11	Μεταβολισμός αλανίνης
Agxt	Αμινομεταφοράση της αλανίνης- γλυοξυλικού οξέος	2.6.1.44	Μεταβολισμός αλανίνης
PanD	Αποκαρβοξυλάση του ασπασρτικού οξέος	4.1.1.12	Μεταβολισμός αλανίνης
LysA 1	Αποκαρβοξυλάση της λυσίνης	4.1.1.20	Μεταβολισμός λυσίνης
LysA 2	Αποκαρβοξυλάση της λυσίνης	4.1.1.20	Μεταβολισμός λυσίνης
MurE	Λιγάση αμινοξέων	6.3.2.13	Βιοσύνθεση πεπτιδογλυκάνης
CL	Συνθετάση του κιτρικού οξέος	2.3.3.1	Κύκλος του κιτρικού οξέος
MDH 1	Αφυδρογονάση του μηλικού οξέος	1.1.1.37	Κύκλος του κιτρικού οξέος
Fr	Αναγωγάση του φουμαρικού οξέος	1.3.5.4	Κύκλος του κιτρικού οξέος
PykA	Κινάση του πυροσταφυλικού οξέος	2.7.1.40	Αναπληρωτικές αντιδράσεις κύκλου κιτρικού οξέος
PykF	Κινάση του πυροσταφυλικού οξέος	2.7.1.40	Αναπληρωτικές αντιδράσεις κύκλου κιτρικού οξέος
РерСК	PEP καρβοξυκινάση	4.1.1.49	Αναπληρωτικές αντιδράσεις κύκλου κιτρικού οξέος
MDH 2	Αφυδρογονάση του μηλικού	1.1.1.38	Αναπληρωτικές αντιδράσεις κύκλου κιτρικού οξέος
MDH 3	Αφυδρογονάση του μηλικού	1.1.1.39	Αναπληρωτικές αντιδράσεις κύκλου κιτρικού οξέος
РерС	PEP αποκαρβοξυλάση	4.1.1.31	Αναπληρωτικές αντιδράσεις κύκλου κιτρικού οξέος

αμινοξέων αλανίνης, ασπαρτικού οξέους και λυσίνης, ο κύκλος του κιτρικού οξέος και οι αναπληρωτικές αντιδράσεις του. Τα αποτελέσματα έδειξαν αρκετές διαφορές ανάμεσα στα ανθεκτικά και τα μη ανθεκτικά στελέχη.

Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκαν τα γονίδια σχετικά με το μεταβολισμό του ασπαρτικού οξέος, της αλανίνης και της λυσίνης Ald, Agxt, PanD, LysA 1, LysA 2, MurE. Αναφορικά με τα ανθεκτικά στελέχη του βακτηριοφάγου Aphrodite1, VaAphrodite1, δε φάνηκε να επηρεάζονται στατιστικά σημαντικά τα σχετικά επίπεδα έκφρασης αυτών των γονιδίων σε σχέση με τα μη ανθεκτικά στελέχη του μάρτυρα αν και παρατηρήθηκαν διάφορες διακυμάνσεις, που στην περίπτωση της αποκαρβοξυλάσης της λυσίνης 2 (LysA 2) τα σχετικά επίπεδα έκφρασης σχεδόν διπλασιάστηκαν (Εικόνα 3.61). Όσον αφορά τα ανθεκτικά στελέχη VaφSt2 παρουσίασε στατιστικά σημαντικά αύξηση στην αφυδρογονάση της αλανίνης έως και 8 φορές σε σχέση με τον μάρτυρα και στατιστικά σημαντικά μείωση στο γονίδιο της λιγάσης των αμινοξέων (MurE)έως και 2 φορές που σχετίζεται με την βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης των βακτηρίων (Εικόνα 3.61). Επί προσθέτως τα ανθεκτικά στελέχη στον βακτηριοφάγο Ares1, VaAres1, εμφάνισαν στατιστικά σημαντική αύξηση στο ένα από τα δύο γονίδια που κωδικοποιούν για την αποκαρβοξυλάση της λυσίνης (LysA 2) που φτάνει μέχρι και τις 10 φορές αύξηση σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα γονίδια της αμινομεταφοράσης της αλανίνης-γλυοξιλικού οξέος, της αποκαρβοξυλάσης του ασπαρτικού οξέος και του ενός γονίδιου που κωδικοποιεί για τη μία αποκαρβοξυλάση της λύσινης, δεν εμφάνισαν καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή σε σχέση με τα μη ανθεκτικά στελέχη για κανένα ανθεκτικό στέλεχος του βακτηρίου (Εικόνα 3.61).

Σχετικά με τον κύκλο του κιτρικού οξέος και τις αναπληρωτικές αντιδράσεις του, τα ανθεκτικά στελέχη **VaAphrodite1** εμφάνισαν στατιστικά σημαντική αύξηση στο γονίδιο της καρβοξυκινάσης του φωσφοένολοπυροσταφυλικού (*PepCK*) έως και 2 φορές σε σχέση με τον μάρτυρα. Ταυτόχρονα η αναγωγάση του φουμαρικού εμφάνισε στατιστικά σημαντική αύξηση και 7 φορές σε σχέση με τον μάρτυρα, ενώ αντίθετα το γονίδιο της αφυδρογονάσης του μηλικού οξέος είχε στατιστικά σημαντική μείωση έως και 5 φορές σε σχέση με τον μάρτυρα, ενώ και η αποκαρβοξυλάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού οξέος (*PepC*) παρουσίασε μιωμένη μεταβολή σε σχέση με τα με ανθεκτικά στελέχη, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική (Εικόνα 3.61).

Τα ανθεκτικά στελέχη **VaφSt2** εμφάνισαν στατιστικά σημαντική μείωση στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την καρβοξυκινάση του φωσφοένολοπυροσταφυλικού (*PepCK*) με τα σχετικά επίπεδα έκφρασής της να είναι έως και 40 φορές μειωμένα, αλλά και στην κινάση του πυροσταφυλικού *PykA* που ήταν έως και 6 φορές μειωμένα. Σχετικά με τον κύκλο του κιτρικού οξέος τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί η αφυδρογονάση του μηλικού οξέος εμφανίζονται στατιστικά σημαντικά μειωμένα έως και 10 φορές σε σχέση με τον μάρτυρα, ενώ και το γονίδιο της αναγωγάσης του φουμαρικού οξέος, αλλά και η συνθετάση του κιτρικού οξέος το καθένα σε σχέση με τον μάρτυρα (Εικόνα 3.61).

Τα ανθεκτικά στελέχη **VaAres1**, εμφάνισαν μόνο στατιστικά σημαντική μείωση στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την αναγωγάση του φουμαρικού οξέος και συμμετέχει στον κύκλο του κιτρικού οξέος με τα σχετικά επίπεδα έκφρασης να μειώνονται στο μισό. Τα υπόλοιπα γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα των αναπληρωτικών αντιδράσεων,αλλά και του ίδιου του κυκλου του κιτρικού οξέος δεν εμφάνισαν κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή σε σχέση με τον μάρτυρα (Εικόνα 3.61).





246



3.4.3 Το μεταβόλωμα των ανθεκτικών βακτηρίων, μεταβάλλεται ανάλογα με το είδος του βακτηριοφάγου που έχει αλληλεπιδράσει

Είναι λογικό να σκεφτούμε ότι ένας μη φυσιολογικός μεταβολικός επαναπρογραμματισμός θα μπορούσε να έχει αποτελέσματα φαινοτυπικά στο κύτταρο, όπως στην περίπτωση που προαναφέραμε του βακτηριοφάγου VHS1, όπου τα βακτήρια μετά την αλληλεπίδραση με τον ιό εμφάνισαν υψηλότερη μολυσματική ικανότητα (Khemayan et al., 2012). Ένας τέτοιος μεταβολικός επαναπρογραμματισμός θα μπορούσε αντίστοιχα να εξηγήσει και μειωμένη μολυσματικότητα των βακτηρίων σε άλλος περιπτώσεις (Laanto et al., 2012). Επιπροσθέτως αυτή η προοπτική θα μπορούσε

να εξηγήσει και να συσχετίσει τυχόν μεταβολές στην βακτηριακή ανάπτυξη (Bohannan και Lenski, 1999; Lenski και Levin, 1985; Lenski, 1988; Brockhurst et al., 2004), την κινητικότητα (Heierson et al., 1986; Paruchuri et al.,1987; Brockhurst et al.,2005) και πιθανά άλλα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Προκειμένου να διαπιστώσουμε εάν η ανθεκτικότητα που εμφάνιζαν τα στελέχη βακτηρίων συνεπαγόταν αλλαγή και στο μεταβολικό προφίλ τους έγινε εκχύλιση ενδοκυτταρικών δευτερογενών μεταβολιτών κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης των βακτηρίων, αναγνώριση και σχετική ποσοτικοποίηση αυτών με αέρια χρωματογραφία συγχωνευμένη με φασματοφωτομετρία μάζας (GC/MS). Αρχικά τα αποτελέσματα αφού φιλτραρίστηκαν, αναλύθηκαν στατιστικά ολιστικά με τη μέθοδο της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (PCA) η οποία έδειξε ομαδοποίηση των επαναλήψεων των στελεχών ανάλογα με τον βακτηριοφάγο που είχαν αναπτύξει ανθεκτικότητα (Διάγραμμα 3.10). Ταυτόχρονα φάνηκε ότι το φαινόμενο αυτό έχει συνέπεια, αφού οι αποικίες που αναπτύχθηκαν προέρχονταν από διαφορετικές βιολογικές επαναλήψεις.



Διάγραμμα 3.10: Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA) των συνιστωσών 1 και 3 που συμμετέχουν με πάνω από 30% της παραλλακτικότητας των επαναλήψεων. Με μωβ φαίνεται η ομαδοποίηση των ανθεκτικών στελεχών στον βακτηριοφάγο Aphrodite1, με κόκκινο στον φSt2, με πράσινο στον Ares1, ενώ τα μη ανθεκτικά στελέχη εμφανίζονται με μπλε χρώμα.

Στη συνέχεια αναλύθηκαν οι μεταβολίτες που εντοπίστηκαν χωριστά. Αυτοί που αναγνωρίστηκαν, ήταν κυρίως αμινοξέα, παράγωγά τους και οργανικά οξέα και εμφάνισαν αρκετές στατιστικά σημαντικές διαφορές (Εικόνα 3.62).

Πιο συγκεκριμένα σχετικά με τα ανθεκτικά στελέχη στον βακτηριοφάγο **Aphrodite1** (VaAphrodite1) τα σχετικά επίπεδα προλίνης και ασπαρτικού οξέους φαίνεται ότι επηρεάστηκαν αρκετά αφού δεν κατάφεραν να εντοπιστούν ενδοκυτταρικά σε αντίθεση με τα υπόλοιπα στελέχη, αλλά και τον μάρτυρα. Ταυτόχρονα υπήρχε στατιστικά σημαντική μείωση των σχετικών επιπέδων του γλουταμινικού οξέος έως και 2 φορές σε σχέση με τον μάρτυρα. Στατιστικά σημαντική αύξηση υπήρξε στην καδαβερίνη έως και 2 φορές, αλλά και στην Ν-ακέτυλο-ορνιθίνη που αποτελεί πρόδρομο μεταβολίτη της. Διακυμάνσεις παρατηρήθηκαν και σε άλλα αμινοξέα, όπως η αλανίνη και η βαλίνη χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντικές (Εικόνα 3.62).

Αναφορικά με τα ανθεκτικά στελέχη **VaφSt2,** η καδαβερίνη παρουσιάζει στατιστικά σημαντικά μείωση έως και 2 φορές, αλλά και η N-ακέτυλο-ορνιθίνη τουλάχιστον 3 φορές σε σχέση με τον μάρτυρα. Η λυσίνη εμφανίζει στατιστικά σημαντικά συσσώρευση έως και 10 τουλάχιστον φορές σε σχέση με τον μάρτυρα, ενώ η λευκίνη το γλουταμινικό οξύ και το πυρογλουταμινικό οξύ είναι και εκείνα στατιστικά σημαντικά αυξημένα τουλάχιστον 2 φορές σε σχέση με τον μάρτυρα (Εικόνα 3.62).





Εικόνα 3.62. Διαγραμματική απεικόνιση αμινοξέων και άλλων δευτερογενών μεταβολιτών που εντοπίστηκαν και ποσοτικοποήθηκαν σχετικά ενδοκυτταρικά σε μη ανθεκτικά στελέχη (Control) και ανθεκτικά στελέχη στους βακτηριοφάγους Aphrodite1, *φ*St2 και Ares1. Οι μαύροι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα ανθεκτικά στελέχη και τα μη ανθεκτικά (±SE, ANOVA, t-test, *P*≤0.05).

Διακυμάνσεις παρατηρήθηκαν και στους μεταβολίτες ορνιθίνη, νορλευκίνη και φαινυλαλανίνη, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντικές.

Τέλος σχετικά με τα ανθεκτικά στελέχη στον βακτηριοφάγο της οικογένειας *Siphoviridae* **Ares1 (VaAres1)** δεν εντοπίστηκε καθόλου η ορνιθίνη σε αντίθεση με τα υπόλοιπα ανθεκτικά στελέχη και τα μη ανθεκτικά του μάρτυρα. Στατιστικά σημαντική αύξηση υπήρχε στην λευκίνη με τη συσσώρευσή της να φτάνει έως και τις 5 φορές σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα σχετικά επίπεδα της νορλευκίνη αυξήθηκαν ομοίως διπλασιάζοντάς την, ενώ και η αλανίνη εμφάνισε στατιστικά σημαντική συσσώρευση περίπου στις 2 φορές. Τέλος σε δύο ακόμη μεταβολίτες αυξήθηκαν τα επίπεδα τους από 3 φορές και αυτοί είναι η γλυκίνη και το ηλεκτρικό οξύ σε σχέση με τον μάρτυρα. Διακυμνάσεις παρουσιάστηκαν και στους μεταβολίτες καδαβερίνη και ισολευκίνη χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντικές οι διαφορές σε σχέση με τον μάρτυρα (Εικόνα 3.62). Αλλαγή στη διαμόρφωση των μεταφορέων είτε για απόρριψη της ιικής μόλυνσης ή επειδή συμμετέχουν σε έναν άγνωστο μεταβολικό επαναπρογραμματισμό του κυττάρου, θα μπορούσε να καταλήξει σε αλλαγή φαινοτυπικών χαρακτηριστικών ή μια γενικότερη μεταβολική αλλαγή σε ανθεκτικά στελέχη (Lenski, 1988; Bohannan και Lenski, 2000; Lennon et al., 2007; Lennon και Martiny, 2008; Middelboe et al., 2009), καθώς πιθανά αποτυγχάνουν να αφομοιώσουν αποτελεσματικά τις πηγές θρεπτικών μέσων που είναι διαθέσιμες στο περιβάλλον (Lenski και Levin, 1985; Bohannan et al., 1999; Buckling και Rainey, 2002).

3.4.4 Ο βακτηριακός μεταβολικός επαναπρογραμματισμός συνεπάγεται και μεταβολικό κόστος

Τα αποτελέσματα της μελέτης των ενδοκυτταρικών μεταβολιτών που φέρουν τα μη ανθεκτικά και τα ανθεκτικά στελέχη στους λυτικούς βακτηριοφάγους κατέδειξαν έναν ισχυρό μεταβολικό επαναπρογραμματισμό και συσσώρευση ή κατανάλωση δευτερογενών μεταβολιτών που εξαρτάται από το είδος του βακτηριοφάγου που τα βακτήρια αλληλεπίδρασαν και που μπορεί να έχουν άμεση σχέση με την λήψη ή εξαγωγή τους από τους διαμεμβρανικούς μεταφορείς (Εικόνα 3.63).

Τα ανθεκτικά στελέχη **VaAphrodite1** φαίνεται ότι κατευθύνουν τον μεταβολισμό προς την επαγωγή της γλυκονεογένεσης, αφού το γονίδιο *PepCK* επάγει τα σχετικά επίπεδα έκφρασής της την ίδια ώρα που τα επίπεδα έκφρασης δύο υπομονάδων του PTS μεταφορέα γλυκόζης (*PtsG 2, Crr*), αλλά και άλλων μεταφορέων σακχάρων είναι μειωμένα. Ένας τέτοιος επαναπρογραμματισμός προς τη γλυκονεογένεση πιθανά είναι και αρκετά ενεργοβόρος για το κύτταρο, γεγονός που σημαίνει ότι και τα επίπεδα του ATP είναι πιθανά μειωμένα, ένδειξη που μπορεί να συσχετισθεί και με τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης των ATP-υπομονάδων των μεταφορέωνπου ρυθμίζονται αλλοστερικά (Jones and George, 2007) (Εικόνα 3.63).

Στα ανθεκτικά στελέχη **VaφSt2** η λυσίνη συσσωρεύεται σε μεγάλο βαθμό ενώ παράλληλα έχει μειωμένα επίπεδα έκφρασης ο *LysE* μεταφορέας λυσίνης που ευθύνεται για την απόρριψή της από το κύτταρο. Αντίστοιχα η μειωμένη έκφραση της
υπομονάδας που συμμετέχει στη μεταφορά της ορνιθίνης οδηγεί στην στατιστικά σημαντικά συσσώρευσή αυτής και της Ν-ακέτυλο ορνιθίνης στο κυτταρόπλασμα των ανθεκτικών στελεχών VaAphrodite1 και VaφSt2. Ακόμη στην περίπτωση των ανθεκτικών βακτηρίων VaφSt2 φαίνεται η κατά πολύ μείωση των σχετικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων PepCK, CL, PykA, MDH, και Fr γεγονός που καταδεικνύει την μειωμένη λειτουργία του κύκλου του κιτρικού οξέος και των αναπληρωτικών αντιδράσεών του και επομένως της βιοσύνθεσης αμινοξέων, που πιθανά είναι αποτέλεσμα της συσσώρευσης κάποιων από αυτών στο κυτταρόπλασμα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η συσσώρευση λευκίνης στο κυτταρόπλασμα με ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις διαμεμβρανικές περμεάσες LivH, LiVB και Azlc 1 αλιφατικών αμινοξέων με πλευρικές ομάδες. Ταυτόχρονα πιθανά μειωμένη γλυκόλυση και αυξημένη γλυκονεογένεση συνεπάγεται και μειωμένα επίπεδα του φωσφοενολοπυρουβικού (PEP), το οποίο συμμετέχει άμεσα στη ρύθμιση των PTS μεταφορέων με μόρια φωσφόρου που μεταφέρονται με το γονίδιο PtsH (το οποίο έχει και αυτό μειωμένη σχετική γονιδιακή έκφραση) στου μεταφορείς (Siebold et al., 2001). Συγκριτικά ανάμεσα στα τρία ανθεκτικά στελέχη φαίνεται ότι ο βακτηριοφάγος **φSt2** έχει την μεγαλύτερη επιρροή και υποβάλλει τα κύτταρα σε μεγαλύτερο μεταβολικό επαναπρογραμματισμό σε σχέση με τους άλλους δύο (Εικόνα 3.63), γεγονός που μπορεί να οφείλεται από την ισχυρή και γρήγορη λυτική του δράση (μόλις 30 λεπτά λανθάνουσα περίοδο με σχέση τα 80 λεπτά του Aphrodite1 και ~97 ιοσωματίδια/κύτταρο σε σχέση με τα ~17 του Ares1), αλλά και το ευρύ γονιδιακό του «οπλοστάσιο».

Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε και ελαφρά μειωμένη ανάπτυξη των ανθεκτικών στελέχων στον συγκεκριμένο βακτηριοφάγο, γεγονός που υποδηλώνει και πιθανά και εμφανή μεταβολή φαινοτύπου που επιφέρει ο επαναπρογραμματισμός που βιώνει το κύτταρο. Αν και στα άλλα δύο στελέχη δεν παρατηρήθηκε ο ίδιος φαινότυπος, μελλοντικοί φαινοτυπικοί χαρακτηρισμοί πιθανά θα μπορούσαν να δείξουν κάποια άλλη μεταβολή. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται άμεση σύνδεση του τρίπτυχου μεταγραφομικής, μεταβολομικής και φαινομικής σαν αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των βακτηρίων με τους βακτηριοφάγους και πιθανά ανοίγει ο δρόμος για τη συζήτηση της ανάπτυξης ενός νέου μοντέλου εξωκυτταρικού τρόπου ανθεκτικόττητας στο Vibrio alginolyticus, αλλά και γενικότερα για τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Εικόνα 3.64).



Εικόνα 3.63. Σχηματική απεικόνιση σχετικών επιπέδων γονιδιακής έκφρασης (έντονο πράσινο, θερμικοί χάρτες) μεταφορέων σακχάρων (μπλε ημισέλινος) και αμινοξέων (καφέ ημισέλινος) και γονιδίων που σχετίζονται με βιοχημικά μονοπάτια εντός του κυττάρου και διαγράμματα με σχετική απόκριση ενδοκυτταρικών δευτερογενών μεταβολιτών (±SE) σε μη ανθεκτικά (A) και σε ανθεκτικά στελέχη στους βακτηριοφάγους Aphrodite1 (B), *φ*St2 (C) και Ares1 (D). Με μπλε βέλη συμβολίζονται τα βιοχημικά μονοπάτια με θαλασσί μεγάλο βέλος ο κύκλος του κιτρικού οξέος (TCA cycle) και με κίτρινα βέλη οι μεταφορείς χαρακτηρισμένοι ως αποκλειστικά εισαγωγείς ή εξαγωγείς μεταβολιτών. Οι άσπροι αστερίσκοι στους θερμικούς χάρτες και οι μαύροι αστερίσκοι στα διαγράμματα, συμβολίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά στο ανθεκτικό στέλεχος σε σχέση με το μη ανθεκτικό στέλεχος (Anova *P*≤0.05) (Skliros et al., 2019 *in preparation*). Τέλος σημαντικό είναι να τονιστεί η συνέπεια των βιοχημικών μεταβολών που έδειξαν τα ανθεκτικά στελέχη αν και προήλθαν από διαφορετικές βιολογικές επαναλήψεις, ενώ ταυτόχρονα φαίνεται ότι για την ανάπτυξη κάθε διαφορετικού στελέχους ανθεκτικού σε διαφορετικό βακτηριοφάγο, τα κύτταρα βιώνουν και διαφορετική μεταβολική προσαρμογή και υποβάλλονται σε διαφορετική μεταβολική «μηχανική» από τους βακτηριοφάγους. Μελλοντικές ερευνητικές εργασίες πιθανά να δείξουν ότι μία συνδυασμένη εφαρμογή πολλών βακτηριοφάγων μπορεί να εμποδίσει ή να καθυστερήσει έναν τέτοιο επαναπρογραμματισμό του βακτηριακού μεταβολισμού και να αυξήσει τον χρόνο δημιουργίας επίκτητης ανθεκτικότητας, με σκοπό μία πιο αποτελεσματική εφαρμογή βακτηριοφάγων για βιολογικό έλεγχο παθογόνων βακτηρίων.



Εικόνα 3,64: Σχηματική απεικόνιση του μοντέλου της γονιδιακής ρύθμισης των μεμβρανικών μεταφορέων της βακτηριακής μεμβράνης σε ανθεκτικά και μη στελέχη, ως αποτέλεσμα του μεταβολικού επαναπρογραμματισμού που λαμβάνει χώρα, ώστε να επέλθει η ανθεκτικότητα, και πιθανά φαινοτυπική μεταβολή των κυττάρων. ΟΜ για εξωτερική μεμβράνη, PG για στρώμα πεπτιδογλυκάνης (Skliros et al., 2019 *in preparation*).

3.4.5 Η βιολογία του συστήματος σε μεγάλη κλίμακα

Είναι καλά πλέον αποδεκτό ότι οι βακτηριοφάγοι αποτελούν μέρος του συνολικότερου μικροβιώματος σε ανώτερους πολυκύτταρους οργανισμούς, αλλά και σε φυσικά ενδιαιτήματα. Έχουν την ικανότητα να κατευθύνουν τους βακτηριακούς πληθυσμούς με φαινόμενα εξελικτικής πίεσης και συνεξέλιξης (Scanlan et al., 2005). Επαναπρογραμματισμός που εμφανίζεται λόγω της αλληλεπίδρασης φάγων και βακτηρίων έχει ήδη προταθεί σε θαλάσσια οικοσυστήματα (Rosenwasser, et al., 2016, Hurwitz και U'Ren, 2016), ενώ ταυτόχρονα φαίνεται ότι αποτελούν και δυναμικό μέρος αυτών των οικοσυστημάτων (Middelboe και Brussaard, 2017). Γενικεύοντας αυτό το μοντέλο, θα μπορούσαμε να πούμε ότι οι βακτηριοφάγοι αποτελούν «μοχλό» πίεσης ολόκληρων μεταβολικών διεργασιών των ξενιστών τους και μπορούν να κατευθύνουν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά σε μεγαλύτερη κλίμακα. Όντας παρόντες και στο ανθρώπινο μικροβίωμα, μικροβίωμα το οποίο πλέον φαίνεται ότι ευθύνεται και για διάφορες φυσιολογικές καταστάσεις στον άνθρωπο (Huttenhower et al., 2012), οι βακτηριοφάγοι θα μπορούσαν να είναι υπεύθυνοι για τη γενικότερη ρύθμισή του (Nguyen et al., 2017), αλλά και γιατί όχι βιοτεχνολογικού χειρισμού του μικροβιώματος στο μέλλον.

3.5 Βιολογικός έλεγχος παθογόνων και συνθετική βιολογία

Μία αρκετή ενδιαφέρουσα συζήτηση ακόμη προκύπτει και από το γεγονός ότι η φαγική βιολογία μπορεί να αποτελέσει έναυσμα για την εφαρμογή της συνθετικής βιολογίας στην καθημερινότητα, αφού η ίδια αποτελεί αμφιλεγόμενο κομμάτι λόγο βιοηθικής και οικολογικής σκοπιάς (Douglas και Savulescu, 2010). Γενικά υπάρχει διάλογος για το αν κατά τον βιολογικό έλεγχο των παθογόνων αρκεί να επαναπαυόμαστε στη φυσική μικροχλωρίδα, ή αν κάνοντας πράξη τα αποτελέσματα που έχουν προέλθει από την βασική έρευνα, η συνθετική βιολογία μπορεί να παράξει γρηγορότερα και πιο αποδοτικά αποτελέσματα. Στις μέρες μας έχουν συσταθεί αρκετές νεοφυείς εταιρείες ανά τον κόσμο που ασχολούνται με την εφαρμογή φαγοθεραπείας σε διάφορους τομείς των ανθρωπογενών δραστηριοτήτων. Τέτοιες εταιρείες προσπαθούν να εκμεταλλευτούν συνθετικούς βακτηριοφάγους σαν οχήματα μεταφοράς στοχευόμενων γονιδίων σε παθογόνα για τον άνθρωπο βακτήρια, που στόχο έχουν την γρήγορη λύση των τελευταίων και την εμφάνιση μηδαμινής ανθεκτικότητας (Wong-Staal et al., 2000, Bikard et al., 2014, Citorik et al., 2014). Φαίνεται δηλαδή πώς υπάρχουν παραδείγματα, όπου οι φάγοι και η φαγοθεραπεία γενικότερα μπορούν να είναι το όχημα ή ο «δούρειος ίππος» της συνθετικής βιολογίας που χρόνια ψάχνει για να αποτελέσει κομμάτι της καθημερινότητάς μας.

3.6 Συμπεράσματα

Τα τελευταία χρόνια η φαγική βιολογία βρίσκεται στο επίκεντρο της μικροβιακής βιοτεχνολογίας, λόγω της προσέγγισης που μπορούν να προσφέρουν οι βακτηριοφάγοι για τον βιολογικό έλεγχο παθογόνων βακτηρίων. Οι σύγχρονες ομικές προσεγγίσεις, έρχονται να συμπληρώσουν ερευνητικές εργασίες του παρελθόντος που αφορούν τη βασική έρευνα, γύρω από την βιολογία των βακτηριοφάγων, ενώ ταυτόχρονα ολοένα περισσότεροι βακτηριοφάγοι, απομονώνονται και χαρακτηρίζονται πλήρως ανά τον κόσμο, αυξάνοντας το βιολογικό «οπλοστάσιό» έναντι των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων. Μέσα σε αυτό το πλαίσιο η παρούσα διδακτορική διατριβή συζητά αποτελέσματα που αφορούν την προώθηση της γνώσης της βασικής φαγικής βιολογίας, και δυνητικά την εφαρμογή των βακτηριοφάγων in vivo. Πιο συγκεκριμένα ο πλήρης χαρακτηρισμός 5 νέων λυτικών βακτηριοφάγων έναντι ενδημικών παθογόνων των ψαριών ενδυναμώνει τις κατευθυνόμενες προσπάθειες μιας εφαρμογής επιτυχούς φαγοθεραπείας στην Ελλάδα, ενώ ταυτόχρονα η συγκριτική λειτουργική γονιδιωματική μελέτη αποκαλύπτει νέα στοιχεία της βασικής τους βιολογίας, όπου μελλοντικός χειρισμός τους κατάλληλα θα μπορούσε να επιφέρει μια πιο αποδοτική και με προβλεπόμενα αποτελέσματα φαγοθεραπεία. Επίσης γίνεται αναφορά σε έναν νέο άξονα που μπορεί να αναδειχθεί στο μέλλον πολύ σημαντικό, αυτόν της ανάπτυξης επίκτητης ανθεκτικότητας των αρνητικών κατά Gramm βακτηρίων έναντι των λυτικών βακτηριοφάγων, προτείνοντας ένα νέο πιθανό μοντέλο σύνδεσης της αλληλεπίδρασής τους. Αυτό το μοντέλο προωθεί το Vibrio sp. σαν μοντέλο μελέτης της αλληλεπίδρασης των Gram αρνητικών βακτηρίων με τους λυτικούς ιούς, ενώ ταυτόχρονα υπογραμμίζει και την ανάγκη δημιουργίας φαγικών κοκτέιλ έναντι των βακτηριακών παθογόνων, αντί για την εφαρμογή ενός μόνο ιού. Τέλος τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσαν να συσχετιστούν σε ένα μεγαλύτερο πλαίσιο της βιολογία συστημάτων, αφού μελετώντας τις αλληλεπιδράσεις *in vitro* μπορούμε σιγά σιγά να κατανοήσουμε την οικολογία του συστήματος σε μεγάλη κλίμακα και πώς μπορούν οι βακτηριοφάγοι να κατευθύνουν μεταλλάξεις και μεταβολικούς επαναπρογραμματισμούς στη φύση και επομένως τη διάθεση θρεπτικών σε οικοσυστήματα, ενδιαιτήματα, αλλά και εντός πολυκύτταρων οργανισμών.

<u>Κεφάλαιο</u>

Παραρτήματα





Παραρτήματα

Πίνακας 1. Σχετικά επίπεδα έκφρασης (\pm SE) του V. alginolyticus strain V1 (A) και φ St2 (B) genes. Οι θερμικοί χάρτες που εμφανίζονται στην

Εικόνα 3.42 φαίνονται επισημασμένοι και εδώ.

A.

Treatment	Gene	Relative Expression	SE	Gene	Relative Expression	SE	Gene	Relative Expression	SE	Gene	Relative Expression	SE
Control	nrdB	0.677035225	0.07997	nrD1	0.004257074	0.00414	nrD2	0.004140938	0.001221	NDK	0.1302	5.04E-03
1 minute p.i.	nrdB	0.343469531	0.05396	nrD1	0.005435401	0.00799	nrD2	0.007989359	0.002182	NDK	0.0919	4.51E-03
5 minutes p.i.	nrdB	0.364827572	0.06413	nrD1	0.007543919	0.01633	nrD2	0.016331852	0.002769	NDK	0.1164	5.90E-03
10 minutes p.i.	nrdB	0.4144773	0.0651	nrD1	0.004758148	0.0115	nrD2	0.011497455	0.001435	NDK	0.1618	8.48E-03
20 minutes p.i.	nrdB	0.392136624	0.0406	nrD1	0.003978105	0.01649	nrD2	0.016486242	0.008984	NDK	0.1677	1.48E-03
30 minutes p.i.	nrdB	0.385304088	0.14161	nrD1	0.026040271	0.03666	nrD2	0.036663304	0.020038	NDK	0.1121	6.32E-03
Treatment	Gene	Relative Expression	SE	Gene	Relative Expression	SE	Gene	Relative Expression	SE	Gene	Relative Expression	SE
Control	ACS	5.62E-03	4.76E-04	Sir2	0.0133	1.15E-03	NMNAT	0.0419	2.91E-04	pncA	0.0546	6.30E-03
1 minute p.i.	ACS	6.38E-03	4.66E-04	Sir2	0.0139	1.70E-03	NMNAT	0.0478	4.63E-03	pncA	0.0643	8.88E-03
5 minutes p.i.	ACS	4.10E-03	6.82E-04	Sir2	0.0114	2.88E-04	NMNAT	0.0407	5.24E-03	pncA	0.0603	5.34E-03
10 minutes p.i.	ACS	4.89E-03	3.95E-04	Sir2	0.0186	1.94E-03	NMNAT	0.0473	5.31E-03	pncA	0.0814	7.56E-03
20 minutes p.i.	ACS	4.58E-03	6.01E-04	Sir2	0.0238	1.20E-03	NMNAT	0.0464	2.46E-03	pncA	0.0698	4.61E-03
30 minutes p.i.	ACS	0.0135	1.17E-03	Sir2	0.0315	1.20E-03	NMNAT	0.0412	5.43E-03	pncA	0.0584	3.79E-03
Treatment	Gene	Relative Expression	SE	Gene	Relative Expression	SE	Gene	Relative Expression	SE			
Control	ТМК	0.1574	0.0214	TYMS1	0.311510625	0.08019	TYMS2	0.016288251	0.00263			
1 minute p.i.	ТМК	0.0726	0.0156	TYMS1	0.171735011	0.04667	TYMS2	0.008227093	0.00422			
5 minutes p.i.	ТМК	0.1206	4.40E-03	TYMS1	0.212795398	0.01678	TYMS2	0.014604793	0.00343			
10 minutes p.i.	ТМК	0.0886	5.35E-03	TYMS1	0.221664245	0.02848	TYMS2	0.019071085	0.00285			
20 minutes p.i.	ТМК	0.1323	0.017	TYMS1	0.235064069	0.02066	TYMS2	0.023821018	0.00285			
30 minutes p.i.	ТМК	0.1638	0.0186	TYMS1	0.430320391	0.1137	TYMS2	0.03426018	0.00831			

	\sim
indpuptiput	~

B.

Treatment	Gene	Relative expression	SE	Gene	Relative expression	SE
1 minute p.i.	МСР	0.3723	0.1656	DUT	0.1527	2.84E-03
5 minutes p.i.	МСР	3.0162	0.4396	DUT	1.3397	0.1042
10 minutes p.i.	МСР	4.9353	1.0555	DUT	9.046	0.6725
20 minutes p.i.	МСР	17.595	2.703	DUT	34.0174	5.3015
30 minutes p.i.	МСР	94.3912	14.5341	DUT	15.5621	2.3077
Treatment	Gene	Relative expression	SE	Gene	Relative expression	SE
1 minute p.i.	grx	0.0964	1.81E-03	TYMS	0.1196	1.86E-03
5 minutes p.i.	grx	0.4875	0.0595	TYMS	6.5248	1.5237
10 minutes p.i.	grx	12.5785	3.5296	TYMS	23.1372	7.8951
20 minutes p.i.	grx	8.828	1	TYMS	29.1679	8.4112
30 minutes p.i.	grx	5.3073	0.7948	TYMS	8.4729	1.8125
Treatment	Gene	Relative expression	SE	Gene	Relative expression	SE
1 minute p.i.	NAMPT	0.4073	9.48E-03	Sir2	0.0657	0.0124
5 minutes p.i.	NAMPT	14.1438	2.4144	Sir2	4.3085	0.2549
10 minutes p.i.	NAMPT	27.8278	5.9351	Sir2	4.9353	0.5988
20 minutes p.i.	NAMPT	67.6817	14.0995	Sir2	12.163	1.4249
30 minutes p.i.	NAMPT	52.5689	4.062	Sir2	3.3882	0.5581
Treatment	Gene	Relative expression	SE	Gene	Relative expression	SE
1 minute p.i.	NMNAT	0.2117	0.0877	nrdB	0.1336	8.29E-03
5 minutes p.i.	NMNAT	4.9885	0.3742	nrdB	0.8561	0.0431
10 minutes p.i.	NMNAT	16.0469	3.773	nrdB	9.4089	0.6354
20 minutes p.i.	NMNAT	12.5093	2.3824	nrdB	17.7425	2.77E+00
30 minutes p.i.	NMNAT	10.9091	1.4877	nrdB	27.6266	3.7077

Πίνακας 2. Βακτηριακοί και βακτηριοφαγικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα με τη μεταγραφομική μελέτη του βακτηριοφάγου φSt2 με το βακτήριο V. alginolyticus (Skliros et al., 2016).

	Λίστα						
Gene	Forward/Reverse	Organism	Sequence	Gene	Forward/Revers e	Organism	Sequence
МСР	Forward	φSt2	5'-CGACCAATACGCAGTGAACG- 3'	dnaK	Forward	V. alginolyticus	5'-TCCTACACGTGTCTGCGAAA- 3'
МСР	Reverse	φSt2	5'-CACACCTGCGTCCATTTCAG-3'	dnaK	Reverse	V. alginolyticus	5'-CCGCCAGAAGCTTGGATAGT- 3'
grx	Forward	φSt2	5'-TACGTGTGGTTGGTCTGGTG-3'	gyrA	Forward	V. alginolyticus	5'-CGGTACTGAGCAGATCCCAG- 3'
grx	Reverse	φSt2	5'-GCGTTCACCACAAACAGGAC-3'	gyrA	Reverse	V. alginolyticus	5'-ACCAGAAGCACCGTTAACCA- 3'
DUT	Forward	φSt2	5'-AGCTACAACCGGGTGATTCA-3'	NMNAT	Forward	V. alginolyticus	5'-TGCAAAATGGTTGACGCGTT- 3'
DUT	Reverse	φSt2	5'-TGTAGTGGGTGCGAACCAAT-3'	NMNAT	Reverse	V. alginolyticus	5'-CTTGCTCTGCATCAGAACGC- 3'
Sir2	Forward	φSt2	5'-TTTAGCGGTGCTGGTCTTGA-3'	NDK	Forward	V. alginolyticus	5'-CTGGCCTACGTATCATCGCT- 3'
Sir2	Reverse	φSt2	5'-TTTCCCACAGACCATTTGCG-3'	NDK	Reverse	V. alginolyticus	5'-TCTGCATAAAAGCCGCTTGC- 3'
NMNAT	Forward	φSt2	5'-TGCGATTCGTGAACTGCAAG-3'	Sir2	Forward	V. alginolyticus	5'-ATGTAGCAACGCCTGAAGGG- 3'
NMNAT	Reverse	φSt2	5'-TTTGAGAGAGCCACGCAAGA- 3'	Sir2	Reverse	V. alginolyticus	5'-TTGCGGCGTTGGTTGTAAAA- 3'
NAMPT	Forward	φSt2	5'-TCGTGTCTCAACTGGTCGTT-3'	pncA	Forward	V. alginolyticus	5'-CCAGCCAATATGCTTGAGCC- 3'
NAMPT	Reverse	φSt2	5'-GTCAGGACGAGCAACAAACG- 3'	pncA	Reverse	V. alginolyticus	5'-CAAGCACACAGTGACGGTTC- 3'
nrdAB	Forward	φSt2	5'-GCACAAGAAGCTGAACTGAGT- 3'	ACS	Forward	V. alginolyticus	5'-GATGAATCTTGCTGCTGCGT- 3'
nrdAB	Reverse	φSt2	5'-TCAGGAATTCAGCGCGTACA-3'	ACS	Reverse	V. alginolyticus	5'-GCCACATATCAACGCCGTTT- 3'
nrdD	Forward	φSt2	5'-GCACAAGAAGCTGAACTGAGT- 3'	ТМК	Forward	V. alginolyticus	5'-GCTAAAAGCGGCCGGTATTG- 3'
nrdD	Reverse	φSt2	5'-TCAGGAATTCAGCGCGTACA-3'	ТМК	Reverse	V. alginolyticus	5'-TTTTTCTGCTAGCGGTGTGC- 3'
thyA	Forward	φSt2	5'-AGCGGTTAATGAAGACCCGA- 3'	nrdD 1	Forward	V. alginolyticus	5'-ACGCGCTATTCGGTACAGAA- 3'
thyA	Reverse	φSt2	5'-GAAGTACGGGTCCCATGCTT-3'	nrdD 1	Reverse	V. alginolyticus	5'-ATGATCGCGACCGCTTTTTC- 3'
	·			nrdD 2	Forward	V. alginolyticus	5'-TGTTAACGGACCGGGTACAC- 3'
				nrdD 2	Reverse	V. alginolyticus	5'-ATAACAGCCACGGCACTGAT- 3'
				thyA 1	Forward	V. alginolyticus	5'-TGACCGCGGTGAAATCTTGA- 3'
				thyA 1	Reverse	V. alginolyticus	5'-CATACAAGGACGCAAGCACC- 3'
				thyA 2	Forward	V. alginolyticus	5'-GCCAATGGGTATGGGAGTCA- 3'
				thyA 2	Reverse	V. alginolyticus	5'-ATGGCGTAGTTTGTCGACCA- 3'
				nrdB	Forward	V. alginolyticus	5'-AGACATCGCGCACTACTACG- 3'
				nrdB	Reverse	V. alginolyticus	5'-CTCACCTTCACCGTAGCGAT- 3'

Πίνακας 3. Βακτηριακοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα με τη μεταγραφομική μελέτη των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών του V. *alginolyticus*.

Γονίδια σ	Γονίδια σχετικά με τη μεταφορά σακχάρων										
Γονίδιο	Αλληλουχία Εκκινητών (R'/F')	Μήκος									
CollB	GGATCGCAATACCGTTTCCG	20									
Cellb	GAGCTGTTCGAATGCATGCT	20									
MtlA	CTCATTGCGCGAACATGGG	19									
	GGCGCAGTCGAAAAGCATAT	20									
FruA	ACGAGAAGTGTCGACGCTAG	20									
	GACGGAAGCTGACGTTGAAC	20									
PtsG 1	GGCAGCACCCACACCTAATA	20									
	TGGTAAGGCTCTGATGCTTCC	21									
PtsG 2	ATCTGGCACGTCTTCGATGT	20									
	TGACGCTGGTGCTATCGAAA	20									
DtcN	TGATGTCTGCGTCGAATGCT	20									
PISN	GAAAACGGCCTTCACACTCG	20									
PheA	AGTGAGTTCATCGCGCTCTG	20									
NDSA	CAGACTCTGAACTGACCGCT	20									
DtcH	CGTCGCTCTGAGGGTAAGAC	20									
risn	TGGGGGCATAGAAAACCTGC	20									
TroP	ACGCAAGCGAGTTAAACAGT	20									
ITED	GCGTCTTATTGAGCTGGTCG	20									
MtlA	TTGGTAGCCATCCAGTTGGG	20									
	CCAAACATCGGCGCGTTTAT	20									

Γονίδι	α σχετικά με τη μεταφορά αμινοξέα	ωv
Γονίδιο	Αλληλουχία Εκκινητών (R'/F')	Μήκος
Mato	TGTTTTCAAGTAGGCCGCCT	20
WetQ	GGCTTTGCTGTGGGTATTCC	20
Metl	GTGCATGTGGTCCAACTGTC	20
	GGCTTAAGCGCTTGTGGAGA	20
Moth	GTCAACAAAGCGAGCAAGGT	20
WEIN	CACAAGGCGAGCATGTGTTT	20
A-IC 1	TCAATTGCGAATGAGCCTGC	20
AZIC I	CACTTGCGATGATGCCTCTG	20
AzIC2	TTGGGTGAATCCGTTCCAGA	20
	ACATCTTCAACGCTCCTCCA	20
Art D	TAGTGCATTCGCCAGATCCA	20
AITF	CGCACCGTTCGAATACATGG	20
Artl	TCATATGCGGCCATAGGTTGT	21
AIU	AAGCAAGGTTTAGCGCTTCG	20
Dh+h1	GCTGCGCCAATCATTTTTACG	21
RIILDI	CGGTTGGTATCTCGGCGATT	20
Rhtb2	AAGGTTCGAAGTAGCCCCAG	20
	ACGTGGCCACAAGTACAGTT	20
tovP	GCCACTGCCTACAATGCCTA	20
llyr	ACTCATTCACGGTGAAGGCA	20
HisP	CGGTAGGCGTTTCTAGCAAG	20
	ATCATTGGCTCTTCCGGCTC	20

Πίνακας 4. Βακτηριακο	νί εκκινητές που χρης	πμοποιήθηκαν στο π	είραμα με τη με	εταγραφομική μ	μελέτη των γ	γονιδίων που α	σχετίζονται με τον με-
ταβολισμό του V. alginol	lyticus.						

MDH2F	5'-TTCAGGGTACTGCAGCTGTT-3'	TolCR	5'-AGTCGTAACGAGCGTTCGAT-3'
MDH2R	5'-GAAAGCTGAGTTCCTGCTGC-3'	TolCF	5'-GTTGATGTACTGGACGCGAC-3'
MDH1F	5'-GCATGTCGCTTTGGTCTGTC-3'	OmpF-F	5'-AATAGCACCCGTTAGCAGCT-3'
MDH1R	5'-CGTAAGCGCACTCAACTACG-3'	OmpFR	5'-TGCGCTTGGTTACAACGAAG-3'
MDH3F	5'-TTGAAGTTAAGCACCGCACG-3'	LivHR	5'-CCGAAATGGCCCAACTGATG-3'
MDH3R	5'-CCGCCAAAAGTGTCTGCAAT-3'	LivHF	5'-AACCAGCAAGTAGCCCAGAG-3'
PEPCF	5'-AGAACTCGAACTCGGCAAGT-3'	LivFR	5'-CCTTTAATTCGAGCCGCTGG-3'
PEPCR	5'-TTCTACTCCGCCCTTAGGGT-3'	LivFF	5'-TTCCGCTTGCGGGTTACTTA-3'
AldF	5'-TATGGGTCGTTTGCCACTGT-3'	LamBR	5'-CAGAAGCTAGAGCCAGCAGA-3'
AldR	5'-CGCACCAGCTTGGATAGACA-3'	LamBF	5'-ACGACGGCGAAGAAAACAAA-3'
AGRXF	5'-TTTGTGCATGCGGAAACCTC-3'	BtuBR	5'-GCTAACCGACCAGTCCACTT-3'
AGRXR	5'-GCTGTTTCGCCAGCTTACTC-3'	BtuBF	5'-GCGTCGCGCTAAAGAAATGT-3'
PanDF	5'-AGTGCCACCACGTATGTTGA-3'	MurEF	5'-TTGACCATAAAGCGGCGGTA-3'
PanDR	5'-GCCGTACATCTCTTCTGCGA-3'	MurER	5'-TTCGCAGCTTGTTGCAAGTT-3'
Lys1F	5'-TTCCCGCAAGTGTCACTCAA-3'	PepCF	5'-ATGTTTATTCGCCCGACGGA-3'
Lys1R	5'-AGTGGCGTTCAACATCAAGC-3'	PepCR	5'-TTGCGCCATTCATTACCACG-3'
FrF	5'-ACAGAGCGTGATGACGTGAA-3'	PykFF	5'-GGACGGTACTGACGCAGTAA-3'
FrR	5'-TACTTGGTGCTGACTCTGGC-3'	PykFR	5'-AGTTACCGCTTCAACAGGGT-3'
CLF	5'-GACCCAGGTTTTCTTGCCAC-3'		
CLR	5'-GAATACCTTTGCCGCCATCG-3'		
PykAF	5'-GCATTACGCTCGACGCTTAG-3'		
PykAR	5'-TGCTCGTTCGACTTTAGCCA-3'		
Lys2F	5'-CTTGGGTAAAGATCGCGCAC-3'		
Lys2R	5'-ATAGGCACCTGCTGAACGAA-3'		

Πίνακας 5. Σχετικά επίπεδα έκφρασης γονιδίψν του *V. alginolyticu*s strain V1 και των ανθεκτικών στους βακτηριοφάγους στελεχών του. Οι θερμικοί χάρτες που εμφανίζονται στην Εικόνα 3.63 φαίνονται επισημασμένοι και εδώ.

Σχ	Σχετικά επίπεδα έκφρασης υποδοχέων της εξωτερικής μεμβράνης												
	TolC	±SE	OmpF	±SE	BtuB	±SE	LamB	±SE					
Control	0.2925	0.0139	0.0400	0.0039	0.1906	0.0142	5.7379	1.2186					
VaAphrodite1	0.6417	0.0189	0.0066	0.0002	0.1164	0.0096	3.6332	0.2073					
VaphiSt2	0.5827	0.0215	0.0061	0.0008	0.1214	0.0156	0.1063	0.0051					
VaAres1	0.5084	0.1005	0.0414	0.0067	0.1775	0.0395	0.8058	0.0373					

Σ	χετικά επίπεδ	δα έκφρασης	γονιδίων	σχετικών με	τη μεταφορ	ά σακχάρων		
	PtsG 1	± SE	PtsG 2	± SE	Crr	± SE	CelB	± SE
Control	0.3775	0.0856	1.4519	0.1877	1.6949	0.4925	0.9120	0.0521
VaAphrodite1	1.3587	0.0258	0.3239	0.0395	0.2358	0.0428	0.1731	0.0516
VaøSt2	0.2810	0.0994	0.6870	0.1674	0.4834	0.1204	0.2966	0.0845
VaAres1	0.2200	0.0184	0.6007	0.0645	0.5378	0.1469	0.8508	0.1208
	RbsA	± SE	TreB	± SE	MtlA	± SE	FruA	± SE
Control	1.5333	0.0949	1.0427	0.1180	0.7908	0.1704	0.3136	0.0331
VaAphrodite1	0.2333	0.0427	0.1652	0.1069	0.6234	0.0468	0.1980	0.0143
VaøSt2	0.5638	0.1894	0.8708	0.0177	0.0755	0.0490	0.1924	0.0353
VaAres1	0.5664	0.1793	0.6453	0.0358	0.7221	0.0476	0.3474	0.0409

PtsN	± SE	PtsH	± SE
1.0454	0.0709	0.7503	0.0700
0.1212	0.0257	1.0928	0.1022
0.2781	0.1157	0.2722	0.0915
1.0167	0.1654	0.5863	0.0292

				Σχε	ετικά επίπεὄ	δα έκφρασης	ς γονιδίων σ	(ετικών με τι	η μεταφορά α	αμινοξέων						
	LysE	± SE	TyrP	± SE	Metl	± SE	MetN	± SE	MetQ	± SE	ArtP	± SE	Artl	± SE	LiVB	± SE
Control	0.6267	0.1318	0.3810	0.1075	1.1441	0.1223	1.2661	0.0236	0.9026	0.1715	0.0152	0.0006	0.2992	0.0152	0.0021	0.0003
VaAphrodite1	0.6481	0.0164	0.2690	0.0964	0.3791	0.0692	0.1174	0.0375	0.1265	0.0566	0.0037	0.0016	0.0695	0.0207	0.0009	0.0001
VaøSt2	0.0082	0.0031	0.3319	0.0034	0.6151	0.0431	0.4308	0.1407	0.5843	0.1493	0.0119	0.0019	0.4801	0.1178	0.0001	0.0000
VaAres1	0.5162	0.0533	0.3636	0.0566	1.0528	0.1392	1.2330	0.0666	0.9403	0.0840	0.0117	0.0040	0.1239	0.0239	0.0007	0.0001
	Rhtb1	± SE	Rhtb2	± SE	tcyp	± SE	HisP	± SE	AzlC 1	± SE	AzlC 2	± SE	LivH	± SE		
Control	0.6020	0.0980	0.3086	0.0481	0.4799	0.0541	0.7633	0.0824	0.0363	0.0025	0.0121	0.0010	0.0107	0.0015		
VaAphrodite1	0.2410	0.0582	0.3459	0.0564	0.0931	0.0023	0.3324	0.0329	0.0512	0.0027	0.0178	0.0024	0.0041	0.0010		
VaøSt2	0.1928	0.0422	0.3796	0.1071	0.0723	0.0273	0.2552	0.1285	0.0168	0.0006	0.0164	0.0022	0.0017	0.0006		
VaAres1	0.4428	0.0289	0.2417	0.0559	0.2172	0.0146	0.5578	0.0522	0.0344	0.0039	0.0064	0.0005	0.0041	0.0002		

Σχετικά επίπεδα έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στον ενδοκυτταρικό βασικό μεταβολισμό τοων κυττάρων																
	Ald	± SE	Agtx	± SE	PanD	± SE	LysA 2	± SE	PykA	± SE	Fr	± SE	PykF	± SE	PepCK	± SE
Control	0.5209	0.2187	0.0365	0.0138	0.0005	0.0002	0.1652	0.0323	0.6124	0.1873	2.8835	0.1460	1.0785	0.1462	7.2277	0.7000
VaAphrodite1	1.3178	0.0204	0.0275	0.0085	0.0001	0.0000	0.4523	0.0637	0.6395	0.2170	14.1752	1.5394	1.3193	0.1288	13.2575	0.6990
VaøSt2	3.6661	0.5307	0.0143	0.0026	0.0001	0.0000	0.5538	0.0256	0.0535	0.0051	0.1669	0.0165	1.4789	0.1546	0.4540	0.1260
VaAres1	0.2191	0.0509	0.0420	0.0054	0.0003	0.0001	1.1338	0.1234	1.4136	0.3587	1.7651	0.0954	0.9863	0.0656	5.5833	0.5228
	LysA 2	± SE	CL	± SE	MurE	± SE	PEPC	± SE	MDH 1	± SE	<i>MDH 2</i>	± SE	MDH 3	± SE		
Control	0.0367	0.0034	5.0889	0.6599	0.2192	0.0288	0.3602	0.0903	5.4497	0.0115	0.4060	0.1487	0.9289	0.2133		
VaAphrodite1	0.0183	0.0015	6.1671	0.7864	0.1487	0.0122	0.1440	0.0282	1.6533	0.1745	0.5390	0.1245	1.0160	0.1629		
VaøSt2	0.0177	0.0030	0.7964	0.2812	0.1143	0.0058	0.1606	0.0317	0.4048	0.0654	0.6721	0.0793	0.8036	0.0051		
VaAres1	0.0488	0.0126	4.5747	0.6796	0.1890	0.0157	0.2558	0.0164	5.5623	0.5020	0.6324	0.2170	0.6264	0.0339		

κτικά κα	ι μη ανθεκτικά στελε	έχη του είδο	ος Vibrio a	alginolyticus [,]	για κάθε έναν από	τους βακτηρι	οφάγους.	
#	Μεταβολίτες	RT	MZ	Control RR	VaAphrodite1 RR	VaøSt2 RR	VaAres1 RR	Р
1	Phenylalanine	25.9031	218	0.04632326	0.068241174	0.078640612	0.08700849	0,093
2	Lysine	32.1889	73	0.0372871	0.053395844	0.557759362	0.02536262	0,000
3	Isoleucine	17.3396	158	0.07408744	0.09063511	0.113300955	0.10463862	0,129
4	Alanine	12.0548	116	0.24558023	0.183777927	0.30377199	0.44009627	0,000
5	Ornithine	30.0238	142	0.02432162	0.127473517	0.080233931	0	0,000
6	Proline	17.5387	142	0.05917034	0	0.056775168	0.07219211	0,000
7	Valine	15.1946	144	0.12147404	0.170262135	0.183249641	0.17418912	0,243
8	Glycine	17.7321	174	0.08424947	0.157283116	0.121427943	0.21921634	0,032
9	Aspartic acid	23.2104	232	0.08574572	0	0.071253289	0.07286701	0,000
10	Glutamic acid	25.6107	246	0.24762622	0.115937352	0.485543836	0.34283825	0,000
11	Pyroglutamic acid	23.37285	156	0.12087109	0.092303663	0.239228448	0.15587289	0,001
12	Norleucine	16.7325	158	0.17820601	0.238421979	0.324379263	0.34706049	0,047
13	Putrescine	28.3884	174	0.16624146	0.120706207	0.267727211	0.20080801	0,000
14	Cadaverine	30.5207	174	0.7170356	1.119824227	0.360916451	0.5074885	0,000
15	Succinic acid	17.9151	148	1.39366518	1.270969561	1.784015318	2.88065221	0,003
16	Pipecolic acid	23.3721	156	0	0.073960918	0	0	0,000
17	N-acetyl-ornithine	30.5207	174	0.7170356	1.119824227	0.360916451	0.5074885	0,000

158 0.16117258

Πίνακας 6. Μέσοι όροι σχετικών επίπεδα (Relative Response) με θερμικούς χάρτες ενδοκυτταρικών μεταβολιτών που μελετήθηκαν για ανθεκτικά και μη ανθεκτικά στελέχη του είδος Vibrio alginolyticus για κάθε έναν από τους βακτηριοφάγους.

0.238875766

low

16.73285

19 L-leucine

high

0,002

0.53196015

0.375960787

Βιβλιογραφία

Abbasifar, R., Griffiths, M.W., Sabour, P.M., Ackermann, H.W., Vandersteegen, K., Lavigne, R., Noben, J.P., Alanis Villa, A., Abbasifar, A., Nash, J.H.E., Kropinski, A.M. (2014). Supersize me: *Cronobacter sakazakii* phage GAP32. *Virology*. 460-461, 138– 146.

Adriaenssens, E. M. *et al.* Taxonomy of prokaryotic viruses: 2016 update from the ICTV bacterial and archaeal viruses subcommittee. *Arch. Virol.* **162**, 1153–1157 (2017).

Abedon, ST (editor) (2008) Bacteriophage Ecology: Population Growth, Evolution, and Impact of Bacterial Viruses. Cambridge University Press. 526p.

Arisaka, F., Kanamaru, S., Leiman, P., Rossmann, M.G. (2003). The tail lysozyme complex of bacteriophage T4. Int. J. Biochem. Cell Biol. 35, 16–21.

Armstrong, S.M., Hargrave, B.T., and Haya, K. (2005). Antibiotic use in finfish aquaculture: modes of action, environmental fate, and microbial resistance. Hdbk Environ Chem 5, 341–357.

Arthur, J.R., Lavilla-Pitogo, C.R., and Subasinghe, R.P. (2000). Use of Chemicals in Aquaculture in Asia. Proceedings of the Meeting on the Use of Chemicals in Aquaculture in Asia. Tighauan, Iloilo, Philippines. Tigbauan, Philippines: Southeast Asian Fisheries. Austin, B. (1985). Antibiotic pollution from fish farms: effects on aquatic microflora. Microbiol. Sci. 2, 113–117.

Aylett, Christopher HS, et al. (2013). Structure of the tubulin/FtsZ-like protein TubZ from Pseudomonas bacteriophage phiKZ. Journal of molecular biology 425.12, 2164-2173.

Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A.A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E.M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G.J., Olson, R., Osterman, A.L., Overbeek, R.A., McNeil, L.K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G.D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A., Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics.* 9, 75-89.

Ackermann H-W (2006) 5500 Phages examined in the electron microscope. Arch Virol 152: 227–243.

Arslan, D.; Legendre, M.; Seltzer, V.; Abergel, C.; Claverie, J.-M. (2011). "Distant Mimivirus relative with a larger genome highlights the fundamental features of Megaviridae". Proceedings of the National Academy of Sciences. 108 (42): 17486–91.

Baglivo, I., Russo, L., Esposito, S., Malgieri, G., Renda, M., Salluzzo, A., Di Blasio, B., Isernia, C., Fattorusso, R., Pedone, P.V. (2009). The structural role of the zinc ion can be dispensable in prokaryotic zinc-finger domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 6933– 6938.

Balcazar, J.L. (2014). Bacteriophages as Vehicles for Antibiotic Resistance Genes in the Environment. *PLOS Pathog.* 10:doi:10.1371/journal.ppat.1004219.

Barazi-Yeroulanos, L. (2010). Syntesis of Mediterranean marine finfish aquaculture-a marketing and promotion strategy. Studies and Rviews General Fisheries Commision for the Mediterranean. No 88 Rome, FAO.

Belfort, M. (1991). Self-Splicing Introns in Prokaryotes. *Cell* 64, 9–11.

Bohannan, B. J., & Lenski, R. E. (1999). Effect of prey heterogeneity on the response of a model food chain to resource enrichment. The American Naturalist, 153(1), 73-82.

Bohannan, B. J., Travisano, M., & Lenski, R. E. (1999). Epistatic interactions can lower the cost of resistance to multiple consumers. Evolution, 292-295.

Bohannan, Brendan JM, and Richard E. Lenski. "Effect of prey heterogeneity on the response of a model food chain to resource enrichment." The American Naturalist 153.1 (1999): 73-82.

Bolger-Munro, M., Cheung, K., Fang, A., & Wang, L. (2013). T4 bacteriophage average burst size varies with Escherichia coli B23 cell culture age. J. Exp. Microbiol. Immunol, 17, 115-119.

Bowie, J.U., Luthy, R., Eisenberg, D. (1991). A method to identify protein sequences that fold into a known three- dimensional structure. *Science* 253, 164–170.

Breyne, K., Honaker, R. W., Hobbs, Z., Richter, M., Żaczek, M., Spangler, T., et al. & Meyer, E. (2017). Efficacy and Safety of a bovine-associated Staphylococcus aureus Phage Cocktail in a Murine Model of Mastitis. Frontiers in microbiology, 8.

Brockhurst, M. A., Buckling, A., & Rainey, P. B. (2005). The effect of a bacteriophage on diversification of the opportunistic bacterial pathogen, Pseudomonas aeruginosa. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 272(1570), 1385-1391. Brockhurst, M. A., Rainey, P. B., & Buckling, A. (2004). The effect of spatial heterogeneity and parasites on the evolution of host diversity. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 271(1534), 107-111.

Buckling, A., & Rainey, P. B. (2002). Antagonistic coevolution between a bacterium and a bacteriophage. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 269(1494), 931-936.

Buchen-Osmond, C. The universal virus database ICTVdB. *Comput. Sci. Eng.* **5**, 16–25 (2003).

Burgos, E.S., Vetticatt, M.J., Schramm, V.L. (2013). Recycling nicotinamide. the transition-state structure of human nicotinamide phosphoribosyltransferase. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 3485–3493.

Burt, A., and Koufopanou, V. (2004). Homing endonuclease genes: the rise and fall and rise again of a selfish element. Current opinion in genetics & development 14.6, 609-615.

Buttimer, C., McAuliffe, O., Ross, R. P., Hill, C., O'Mahony, J., & Coffey, A. (2017). Bacteriophages and bacterial plant diseases. Frontiers in microbiology, 8, 34.

Bonhivers, M., Ghazi, A., Boulanger, P., & Letellier, L. (1996). FhuA, a transporter of the Escherichia coli outer membrane, is converted into a channel upon binding of bacteriophage T5. The EMBO journal, 15(8), 1850-1856.

Breitbart, M., Thompson, L. R., Suttle, C. A., Sullivan, M. B. Exploring the vast diversity

of marine viruses. Oceanography 2, 135–139 (2007).

Brussaard, C. P. D. et al. Global-scale processes with a nanoscale drive: the role of marine viruses. ISME J. 2, 575–578 (2008).

Baptista C., Santos M. A., São-José C. 2008. Phage SPP1 reversible adsorption to Bacillus subtilis cell wall teichoic acids accelerates virus recognition of membrane receptor YueB. J. Bacteriol. 190:4989–4996.

Brister, J. R., Ako-Adjei, D., Bao, Y., & Blinkova, O. (2014). NCBI viral genomes resource. Nucleic acids research, 43(D1), D571-D577.

Cabello, F.C., et al. (2013). Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. Environmental microbiology 15.7, 1917-1942.

Castillo, D., D'Alvise, P., Kalatzis, P.G., Kokkari, C., Middelboe, M., Gram, L., Liu, S., Katharios, P. (2015). Draft genome sequences of *Vibrio alginolyticus* strains V1 and V2, opportunistic marine pathogens. *Genome Announc.* 3:doi:10.1128/genomeA.00729-15.

Conceição, L.E.C., Yúfera, M., Makridis, P., Morais, S., Dinis, M.T. (2010). Live feeds for early stages of fish rearing. Aquac Res. 41:613–40.

Ceyssens, P.J., Brabban, A., Rogge, L., Lewis, M.S., Pickard, D., Goulding, D., Dougan, G., Noben, J.P., Kropinski, A., Kutter, E., Lavigne, R. (2010). Molecular and physiologi-

cal analysis of three *Pseudomonas aeruginosa* phages belonging to the "N4-like viruses." Virology 405, 26–30.

Ceyssens, P. J., Minakhin, L., Van den Bossche, A., Yakunina, M., Klimuk, E., Blasdel, B., et al. & Lavigne, R. (2014). Development of giant bacteriophage ϕ KZ is independent of the host transcription apparatus. Journal of virology, 88(18), 10501-10510. ISO 690.

Charpentier, E., Doudna, J. A. (2013). Biotechnology: Rewriting a genome. Nature, 495(7439), 50.

Chang, K.T., Min, K.T. (2002). Regulation of lifespan by histone deacetylase. *Ageing Res. Rev.* 1, 313–326.

Chang, H. C., Chen, C. R., Lin, J. W., Shen, G. H., Chang, K. M., Tseng, Y. H., & Weng, S. F. (2005). Isolation and characterization of novel giant Stenotrophomonas maltophilia phage φSMA5. *Applied and environmental microbiology*, *71*(3), 1387-1393.

Chatterjee, S., and Rothenberg, E. (2012). Interaction of bacteriophage I with its E. coli receptor, LamB. Viruses, 4, 3162-3178.

Chauthaiwale, V.M., Therwath, A., and Deshpande, V.V. (1992). Bacteriophage lambda as a cloning vector. Microbiological reviews 56.4, 577-591.

Chen, Z., Wang, Y., Zhai, Y-F., Song, J., Zhang, Z. (2013). ZincExplorer: an accurate hybrid method to improve the prediction of zinc-binding sites from protein sequences. *Mol. Biosyst.* 9, 2213–22.

Chevallereau, A., Blasdel, B.G., De Smet, J., Monot, M., Zimmermann, M., Kogadeeva, M., Sauer, U., Jorth, P., Whiteley, M., Debarbieux, L., Lavigne, R. (2016). Next-Generation "-omics" Approaches Reveal a Massive Alteration of Host RNA Metabolism during Bacteriophage Infection of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet*. 12:doi:10.1371/journal.pgen.1006134.

Clark, S. (1978). Transcriptional specificity of a multi subunit RNA polymerase induced by *Bacillus subtilis* bacteriophage PBS2. J. Virol. 25, 224–237.

Clark, S., Losick, R., Pero, J. (1974). New RNA polymerase from *Bacillus subtilis* infected with phage PBS2. Nature 252, 21–24.

Clokie, M. R., Millard, A. D., Letarov, A. V & Heaphy, S. Phages in nature. Bacteriophage 1, 31–45 (2011).

Colorni, A., Paperna, I., Gordin, H. (1981). Bacterial infections in gilthead sea bream *Sparus aurata* culture in Elat. Aquaculture 23, 257-267.

Comeau, A. M., Tremblay, D., Moineau, S., Rattei, T., Kushkina, A. I., Tovkach, F. I., et al & Ackermann, H. W. (2012). Phage morphology recapitulates phylogeny: the comparative genomics of a new group of myoviruses. PLoS One, 7(7), e40102.

Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., et al. & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science, 339, 819-823.

Costantini, S., Colonna, G., Facchiano, A.M. (2008). Bioinformation ESBRI : A web server for evaluating salt bridges in proteins. *Bioinformation*. 3, 137–138.

Cramer, P. (2002). Multisubunit RNA polymerases. Curr. Opin. Struct. Biol. 12, 89–97.

Cui, Z., Shen, W., Wang, Z., Zhang, H., Me, R., Wang, Y., Zeng, L., Zhu, Y., Qin, J., He, P., Guo, X. (2012). Complete genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* phage JD001. *J. Virol.* 86, 13843.

Cenens, W. et al. Expression of a novel P22 ORFan gene reveals the phage carrier state in *Salmonella Typhimurium*. PLoS Genet. 9, e1003269 (2013).

Cenens, W., Makumi, A., Govers, S. K., Lavigne, R. & Aertsen, A. (2015). Viral transmission dynamics at single-cell resolution reveal transiently immune subpopulations caused by a carrier state association. PLoS Genet. 11, e1005770.

Conter, A., Bouché, J. P. & Dassain, M. Identification of a new inhibitor of essential division gene ftsZ as the kil gene of defective prophage Rac. J. Bacteriol. 178, 5100–5104 (1996).

Chaturongakul, S., & Ounjai, P. (2014). Phage–host interplay: examples from tailed phages and Gram-negative bacterial pathogens. Frontiers in microbiology, 5, 442.

Callaghan, A. J., Aurikko, J. P., Ilag, L. L., Grossmann, J. G., Chandran, V., Kühnel, K., et al., Luisi, B. F. (2004). Studies of the RNA degradosome-organizing domain of the Escherichia coli ribonuclease RNase E. Journal of molecular biology, 340(5), 965-979.

Campillo-Balderas, J. A., Lazcano, A., & Becerra, A. (2015). Viral genome size distribution does not correlate with the antiquity of the host lineages. Frontiers in Ecology and Evolution, 3, 143. Cui, J., Schlub, T. E., & Holmes, E. C. (2014). An allometric relationship between the genome length and virion volume of viruses. Journal of virology, 88(11), 6403-6410.

Chaikeeratisak, V., Nguyen, K., Egan, M. E., Erb, M. L., Vavilina, A., & Pogliano, J. (2017). The Phage Nucleus and Tubulin Spindle Are Conserved among Large Pseudomonas Phages. Cell reports, 20(7), 1563-1571.

Darling, A.C.E., Mau, B., Blattner, F.R., Perna, N.T. (2004). Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res.* 14, 1394–1403. Davidson, A.L., and Maloney, P.C. (2007). ABC transporters: how small machines do a big job. Trends in microbiology, 15, 448-455.

Davis, B.M., et al. (2000). CTX prophages in classical biotype Vibrio cholerae: functional phage genes but dysfunctional phage genomes. Journal of bacteriology 182.24, 6992-6998.

Douglas, T., & Savulescu, J. (2010). Synthetic biology and the ethics of knowledge. Journal of medical ethics, 36(11), 687-693.

Davies, E., V. et al. (2016). Temperate phages both mediate and drive adaptive evolution in pathogen biofilms. Proc. Natl Acad. Sci. USA 113, 8266–8271.

Datta, D. B., Arden, B. and Henning, U. (1977). Major proteins of the Escherichia coli outer cell envelope membrane as bacteriophage receptors. Journal of bacteriology, 131(3), 821-829.

De Smet, J., Zimmermann, M., Kogadeeva, M., Ceyssens, P-J., Vermaelen, W., Blasdel,

Bin, B., Jang, H., Sauer, U., Lavigne, R. (2016). High coverage metabolomics analysis reveals phage-specific alterations to *Pseudomonas aeruginosa* physiology during infection. *Isme J.* 10, 1823-1835.

De Smet, J., Hendrix, H., Blasdel, B. G., Danis-Wlodarczyk, K., & Lavigne, R. (2017). Pseudomonas predators: Understanding and exploiting phage–host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, *15*(9), *517*.

Dedrick, R. M., Jacobs-Sera, D., Bustamante, C. A. G., Garlena, R. A., Mavrich, T. N., Pope, W., H., et al. and Bonilla, J. A. (2017). Prophage-mediated defence against viral attack and viral counter-defence. Nature microbiology, 2, 16251.

Delcher, A.L., Harmon, D., Kasif, S., White, O., Salzberg, S.L. (1999). Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic. Acids. Res.* 27, 4636–4641.

Duckworth, D.H. (1976). Who discovered bacteriophage? Bacteriological reviews 40.4, 793.

Dujon, B. (1989). Group I introns as mobile genetic elements: Facts and mechanistic speculations - a review. *Gene.* 82, 91–114.

Edgell, D.R., Gibb, E.A., and Belfort, M. (2010). Mobile DNA elements in T4 and related phages. Virol. J. 7, 290–304.

Edgell, D.R., Gibb, E.A., Belfort, M. (2010). Mobile DNA elements in T4 and related phages. *Virol. J.* 7, 290-304.

Egidius, E., Wiik, R., Andersen, K. (1986). *Vibrio salmonicida* sp. nov., a new fish pathogen. International Journal of Systematic Bacteriology 36, 518-520.

El-Galil, MAA Abd, and Mohamed, M.H. (2012). First Isolation of *Vibrio alginolyticus* from Ornamental Bird Wrasse Fish (*Gomphosus caeruleus*) of the Red Sea in Egypt. Journal of Fisheries and Aquatic Science 7.6, 461.

Enault, F., Briet, A., Bouteille, L., Roux, S., Sullivan, M.B., and Petit, M. A. (2016). Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses. The ISME journal.

Erez, Z., Steinberger-Levy, I., Shamir, M., Doron, S., Stokar-Avihail, A., Peleg, Y., et al. & Amitai, G. (2017). Communication between viruses guides lysis–lysogeny decisions. Nature, 541, 488-493.

Erni, B; Zanolari, B; Kocher, HP (Apr 1987). "The mannose permease of Escherichia coli consists of three different proteins. Amino acid sequence and function in sugar transport, sugar phosphorylation, and penetration of phage lambda DNA". J Biol Chem. 262 (11): 5238–47.

Falco, S.C., Laan, K.V., Rothman-Denes, L.B. (1977). Virion-associated RNA polymerase required for bacteriophage N4 development. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 520–523.

Feldman, J.L., Dittenhafer-Reed, K.E., Kudo, N., Thelen, J.N, Ito, A., Yoshida, M., Denu, J.M. (2015). Kinetic and structural basis for Acyl-group selectivity and NAD⁺ dependence in sirtuin-catalyzed deacylation. *Biochemistry* 54, 3037–3050.

Freeman, J.M. (1998). Patterns of Genome Organization in Bacteria. *Science* 279, 1827a.

Frye, R.A. (2000). Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 793–798.

Friman, V.-P. & Buckling, A. (2013). Effects of predation on real-time host–parasite coevolutionary dynamics. Ecol. Lett. 16, 39–46.

Frank, J. A. et al. Structure and function of a cyanophage-encoded peptide deformylase. ISME J. 7, 1150–1160 (2013).

Friedman SD, Genthner FJ, Gentry J, Sobsey MD, Vinjé J J Virol. 2009. Gene mapping and phylogenetic analysis of the complete genome from 30 single-stranded RNA male-specific coliphages (family Leviviridae). Nov; 83(21):11233-43.

Gadsden, M.H., McIntosh, E.M., Game, J.C., Wilson, P.J., Haynes, R.H. (1993). dUTP pyrophosphatase is an essential enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 12, 4425–4431.

Gary, T.P., Colowick, N.E., Mosig, G. (1998). A species barrier between bacteriophages T2 and T4: Exclusion, join- copy and join-cut-copy recombination and mutagenesis in the dCTPase genes. *Genetics* 148, 1461–1473.

Gazzaniga, F., Stebbins, R., Chang, S.Z., McPeek, M.A., Brenner, C. (2009). Microbial NAD metabolism: lessons from comparative genomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73, 529–41.

Gerdes, K., Howard, M., and Szardenings, F. (2010). Pushing and pulling in prokaryotic DNA segregation. Cell 141, 927–942.

Gilbert, R. A., Kelly, W. J., Altermann, E., Leahy, S. C., Minchin, C., Ouwerkerk, D., & Klieve, A. V. (2017). Toward Understanding Phage: Host Interactions in the Rumen; Complete Genome Sequences of Lytic Phages Infecting Rumen Bacteria. Frontiers in microbiology, 8.

Gleghorn, M.L., Davydova, E.K., Rothman-Denes, L.B., Murakami, K.S. (2008). Structural basis for DNA-hairpin promoter recognition by the bacteriophage N4 virion RNA polymerase. Mol. Cell 32, 707–717.

Glockner, F.O., Zaichikov, E., Belkova, N., Denissova, L., Pernthaler, J., Pernthaler, A., Amann, R. (2000). Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5053–5065.

Glockner, F.O., Zaichikov, E., Belkova, N., Denissova, L., Pernthaler, J., Pernthaler, A., Amann, R. (2000). Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 66, 5053–5065.

Goldfarb, T., Sberro, H., Weinstock, E., Cohen, O., Doron, S., Charpak-Amikam, Y., et al. & Sorek, R. (2015). BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes. The EMBO journal, 34, 169-183.

Goldfarb, T., Sberro, H., Weinstock, E., Cohen, O., Doron, S., Charpak-Amikam, Y., et al. & Sorek, R. (2015). BREX is a novel phage resistance system widespread in

microbial genomes. The EMBO journal, 34(2), 169-183.

Gomez-Gil, B., Thompson, F.L., Thompson, C.C., Swings, J. (2003). *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53, 239-243.

Goulden, E. F., Høj, L., & Hall, M. R. (2013). Microbial management for bacterial pathogen control in invertebrate aquaculture hatcheries. In Advances in aquaculture hatchery technology (pp. 246-285).

Grayson, P., and Molineux, I.J. (2007). Is phage DNA "injected" into cells - biologists and physicists can agree. Current Opinion in Microbiology, 10, 401–409.

Grigoriev, A. (1998). Analyzing genomes with cumulative skew diaGrams. *Nucleic. Acids. Res.* 26, 2286–2290.

Grigoriev, A. (1999). Strand-specific compositional asymmetries in double-stranded DNA viruses. *Virus Res.* 60, 1–19.

Grisez, L., Sorgeloos, P., and Ollevier F. (1996). Mode of infection and spread of *Vibrio anguillarum* in turbot *Scophthalmus maximus* larvae after oral challenge through live feed. Diseases of Aquatic Organisms 26.3, 181-187.

Guerrero-Ferreira, R. C., Viollier, P. H., Ely, B., Poindexter, J. S., Georgieva, M., Jensen, G. J., & Wright, E. R. (2011). Alternative mechanism for bacteriophage adsorption to the motile bacterium *Caulobacter crescentus*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(24), 9963-9968.

Guex, N., Peitsch, M.C. (1997), SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*. 18, 2714-2723.

Gutiérrez, D., Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2016). Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. Frontiers in microbiology, 7, 825.

Gilbert, W., & Dressler, D. (1968, January). DNA replication: the rolling circle model. In Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology (Vol. 33, pp. 473-484). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Gilbert, W., & Dressler, D. (1968, January). DNA replication: the rolling circle model. In Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology (Vol. 33, pp. 473-484). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Haenen, O.L., Evans, J.J., and Berthe, F. (2013). Bacterial infections from aquatic species: potential for and prevention of contact zoonoses. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics) 32.2, 497-507.

Haeusser P.D., and Magolin W. (2012). Bacteriophage Tubulins: Carrying Their Own Cytoskeleton Key. Haeusser (2012). Bacteriophage tubulins: carrying their own cyto-skeleton key. Current Biology, 22, R639-R641.

Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis proGram for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 91-98.

Harris, F., Pierpoint, L. (2012). PhotodynamicTherapy Based on 5-Aminolevulinic Acid and Its Use as an Antimicrobial Agent. *Med. Res. Rev.* 29, 1292–1327.

Heierson, A., Sidén, I., Kivaisi, A., & Boman, H. G. (1986). Bacteriophage-resistant mutants of Bacillus thuringiensis with decreased virulence in pupae of Hyalophora cecropia. Journal of bacteriology, 167(1), 18-24.

Hermoso, J.A., García, J.L., García, P. (2007). Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 461–472.

Hertveldt, K., Lavigne, R., Pleteneva, E., Sernova, N., Kurochkina, L., Korchevskii, R., Robben, J., Mesyanzhinov, V., Krylov, V.N., Volckaert, G. (2005). Genome comparison of *Pseudomonas aeruginosa* large phages. *J. Mol. Biol.* 354, 536–545.

Hizi, A., Herzig, E. (2015). dUTPase: the frequently overlooked enzyme encoded by many retroviruses. *Retrovirology* 12, 70-84.

Holmfeldt, K., Middelboe, M., Nybroe, O., & Riemann, L. (2007). Large variabilities in host strain susceptibility and phage host range govern interactions between lytic marine phages and their Flavobacterium hosts. Applied and Environmental microbiology, 73(21), 6730-6739.

Huse, W.D., et al. (1989). Generation of a large combinatorial library of immunoglobulin repertoire in phage lambda. Science 246.4935, 1275.

Hyman, P., Abedon, S.T. (2015). Bacteriophage: Overview. Reference Module in Biomedical Sciences. Hanlon GW (2007). "Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections". Int. J. Antimicrob. Agents. 30 (2): 118–28. doi:10.1016/j.ijantimicag.2007.04.006. PMID 17566713.

Ho, T. D., and Slauch, J. M. (2001). OmpC is the receptor for Gifsy-1 and Gifsy-2 bacteriophages of Salmonella. J. Bacteriol. 183, 1495–1498. doi: 10.1128/JB.183.4.1495-1498.2001

Imai, S., Armstrong, C.M., Kaeberlein, M., Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403, 795–800.

Inoue, T., Matsuzaki, S., & Tanaka, S. (1995). A 26-kDa outer membrane protein, OmpK, common to Vibrio species is the receptor for a broad-host-range vibriophage, KVP40. FEMS microbiology letters, 125(1), 101-105.

Jang, H. B., Fagutao, F. F., Nho, S. W., Park, S. B., Cha, I. S., Yu, J. E., et al. & Jung, T. S. (2013). Phylogenomic network and comparative genomics reveal a diverged member of the φkz-related group, marine Vibrio phage φJM-2012. Journal of virology, 87(23), 12866-12878.

Jassim, S.A.A., Limoges, R.G. (2014). Natural solution to antibiotic resistance: Bacteriophages "The Living Drugs." *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 2153-2170.

Javed, M.A., Ackermann, H.W., Azeredo, J., Carvalho, C.M., Connerton, I., Evoy, S., Hammerl, J.A., Hertwig. S., Lavigne, R., Singh, A., Szymanski, C.M., Timms, A., Kropinski, A.M. (2014). A suggested classification for two groups of *Campylobacter* myoviruses. *Arch. Virol.* 159, 181–190. Jin, J., Li, Z-J, Wang, S-W., Wang, S-M., Chen, S-J., Huang, D-H., Zhang, G., Li, Y-H., Wang, X-T., Wang, J., Zhao, G-Q. (2014). Genome organisation of the *Acinetobacter* lytic phage ZZ1 and comparison with other T4-like *Acinetobacter* phages. *BMC Genomics.* 15, 793-806.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A proGramable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science, 337, 816-821.

Jones P.M. and George A.M. (2007).Nucleotide-dependent Allostery within the ABC Transporter ATP-binding Cassette: A COMPUTATIONAL STUDY OF THE MJ0796 DIMER. J. Biol. Chem. 282: 22793-. doi:10.1074/jbc.M700809200.

Jakutyte, L., Baptista, C., São-José, C., Daugelavicius, R., Carballido-López, R., & Tavares, P. (2011). Bacteriophage infection in rod-shaped gram-positive bacteria: evidence for a preferential polar route for phage SPP1 entry in Bacillus subtilis. Journal of bacteriology, 193(18), 4893-4903.

Jun, W. J., & Greenberg, J. (1978). Resistance relationships in Mycobacterium smegmatis ATCC 607 to phages sensitive or resistant to both chloroform and streptomycin sulphate. Journal of General Virology, 39(3), 555-557.

Kalatzis, P.G., Bastías, R., Kokkari, C., Katharios, P. (2016). Isolation and Characterization of Two Lytic Bacteriophages, φ St2 and φ Grn1; Phage Therapy Application for Biological Control of *Vibrio alginolyticus* in Aquaculture Live Feeds. *PLoS One.* **11**:doi:10.1371/journal.pone.0151101.
Kalatzis, P.G., Rørbo, N.I., Castillo, D., Mauritzen, J.J., Jørgensen, J., Kokkari, C., et al. & Middelboe, M. (2017). Stumbling across the Same Phage: Comparative Genomics of Widespread Temperate Phages Infecting the Fish Pathogen *Vibrio anguillarum*. Viruses, 9, 122.

Kanamaru, S., Gassner, N.C., Ye, N., Takeda, S., Arisaka, F. (1999). The C-terminal fragment of the precursor tail lysozyme of bacteriophage T4 stays as a structural component of the baseplate after cleavage. *J. Bacteriol.* 181, 2739–2744.

Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., Tanabe, M. (2016). KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res.* 44, D457–D462.

Karam, J.D., Drake, J.W. (1994). *Molecular biology of bacteriophage*. American Society for Microbiology.

Keen, E.C. (2012). Felix d' Herelle and our microbial future. Future microbiology 7.12, 1337-1339.

Keen, E.C. (2012). Phage therapy: concept to cure. Frontiers in Microbiology 3, 238. Keppel, F., Rychner, M., and Georgopoulos, C. (2002). Bacteriophage-encoded cochaperonins can substitute for *Escherichia coli*'s essential GroES protein. EMBO Reports, 3, 893–898.

Khemayan, K., Pasharawipas, T., Puiprom, O., Sriurairatana, S., & Flegel, T. W. (2006). Unstable lysogeny and pseudolysogeny in VHS1 bacteriophage of Vibrio harveyi. Appl. Environ. Microbiol, 72, 1355-1363. Khemayan, K., Prachumwat, A., Sonthayanon, B., Intaraprasong, A., Sriurairatana, S., & Flegel, T. W. (2012). Complete genome sequence of virulence-enhancing Siphophage VHS1 from Vibrio harveyi. Applied and environmental microbiology, 78(8), 2790-2796.

Khemayan, K., Prachumwat, A., Sonthayanon, B., Intaraprasong, A., Sriurairatana, S., & Flegel, T. W. (2012). Complete genome sequence of virulence-enhancing Siphophage VHS1 from Vibrio harveyi. Applied and environmental microbiology, 78(8), 2790-2796.

Kim, M., Ryu, S. (2011). Characterization of a T5-like coliphage, SPC35, and differential development of resistance to SPC35 in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. *Appl. Environ*. *Microbiol*. 77, 2042–2050.

Klumpp, J., Fouts, D.E., Sozhamannan, S. (2012). Next generation sequencing technologies and the changing landscape of phage genomics. *Bacteriophage*. 2, 190–199.

Kraemer, J.A., Erb, M.L., Waddling, C.A., Montabana, E.A., Zehr, E.A., Wang, H., Nguyen, K., Pham, D.S., Agard, D.A., and Pogliano, J. (2012). A phage tubulin assembles dynamic filaments by an atypical mechanism to center viral DNA within the host cell. Cell 149, 1488–1499.

Krylov, V.N., and Zhazykov, I.Z. (1978). Pseudomonas bacteriophage fKZ-possible model for studying the genetic control of morphogenesis. Genetika, 14, 678-685. Krylov, V.N., Smirnova, T.A., Rebentish, B.A., and Minenkova, I. B. (1978). Stucture offKZ bacteriophage particles.Vopr. Virusol. 5, 568-571. Kumar, S., Nussinov, R. (2002). Close Range Electrostatic Interactions in Proteins Close-Range Electrostatic Interactions in Proteins. *ChemBioChem.* 3, 604–617.

Kunisawa, T. (1992). Synonymous codon preferences in bacteriophage T4: a distinctive use of transfer RNAs from T4 and from its host *Escherichia coli*. *J. Theor. Biol.* 159, 287–298.

Kunisawa, T. (2002). Functional role of bacteriophage transfer RNAs: codon usage analysis of genomic sequences stored in the GENBANK/EMBL/DDBJ databases TT. *Data Sci. J.* 1, 216–228.

Kwan, T., Liu, J., DuBow, M., Gros, P., Pelletier, J. (2005). The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102, 5174–5179.

Kutter, E; De Vos, D; Gvasalia, G; Alavidze, Z; Gogokhia, L; Kuhl, S; Abedon, ST (January 2010). "Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections". Current pharmaceutical biotechnology. 11 (1): 69–86. doi:10.2174/138920110790725401. PMID 20214609.

Keary, R., McAuliffe, O., Ross, R. P., Hill, C., O'Mahony, J., & Coffey, A. (2013). Bacteriophages and their endolysins for control of pathogenic bacteria. Méndez-Vilas A. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, Formatex Research Center, Badajoz, Spain, 1028-1040.

Koonin EV, Galperin MY (2003). Sequence - Evolution - Function: Computational Approaches in Comparative Genomics.Boston: Kluwer Academic.

Kreuzer, K. N., & Brister, J. R. (2010). Initiation of bacteriophage T4 DNA replication and replication fork dynamics: a review in the Virology Journal series on bacteriophage T4 and its relatives. Virology journal, 7(1), 358.

Kutter, E; De Vos, D; Gvasalia, G; Alavidze, Z; Gogokhia, L; Kuhl, S; Abedon, ST (January 2010). "Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections". Current pharmaceutical biotechnology. 11 (1): 69–86. doi:10.2174/138920110790725401. PMID 20214609.

Keary, R., McAuliffe, O., Ross, R. P., Hill, C., O'Mahony, J., & Coffey, A. (2013). Bacteriophages and their endolysins for control of pathogenic bacteria. Méndez-Vilas A. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, Formatex Research Center, Badajoz, Spain, 1028-1040.

Koonin EV, Galperin MY (2003). Sequence - Evolution - Function: Computational Approaches in Comparative Genomics.Boston: Kluwer Academic.

Kreuzer, K. N., & Brister, J. R. (2010). Initiation of bacteriophage T4 DNA replication and replication fork dynamics: a review in the Virology Journal series on bacteriophage T4 and its relatives. Virology journal, 7(1), 358.

Kim, M., and Ryu, S. (2011). Characterization of a T5-like coliphage, SPC35, and differential development of resistance to SPC35 in Salmonella enterica serovar Typhimurium and Escherichia coli. Appl. Environ. Microbiol. 77, 2042–2050. doi: 10.1128/AEM.02504-10.

Laanto, E., Bamford, JK., Laakso, J., & Sundberg, L. R. (2012). Phage-driven loss of virulence in a fish pathogenic bacterium. PLoS One, 7(12), e53157.

Laanto, E., Bamford, J. K., Laakso, J., & Sundberg, L. R. (2012). Phage-driven loss of virulence in a fish pathogenic bacterium. PLoS One, 7(12), e53157.

Labrie, S. J., Samson, J. E., & Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. Nature Reviews Microbiology, 8(5), 317-327.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680–685.

Lai, M.J., Lin, N.T., Hu, A., Soo, P.C., Chen, L.K., Chen, L.H., Chang, K.C. (2011). Antibacterial activity of *Acinetobacter baumannii* phage ΦaB2 endolysin (LysAB2) against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 529–539.

Lal, T.M., Sano, M., Hatai, K., Ransangan, J. (2016). Complete genome sequence of a giant *Vibrio* phage ValKK3 infecting *Vibrio* alginolyticus. Genomics Data. 8, 37–38. Laurencin, F.B., and Germon, E. (1987). Experimental infection of rainbow trout, *Salmo* gairdneri R., by dipping in suspensions of *Vibrio* anguillarum: ways of bacterial penetration; influence of temperature and salinity. Aquaculture 67.1-2, 203-205.

Lavigne, R., Darius, P., Summer, E.J., Seto, D., Mahadevan, P., Nilsson, A.S., Ackermann, H.W., Kropinski, A.M. (2009). Classification of *Myoviridae* bacteriophages using protein sequence similarity. *BMC Microbiol.* 9, 224-239.

Lavysh, D., Sokolova, M., Minakhin, L., Yakunina, M., Artamonova, T., Kozyavkin, S., et al. & Severinov, K. (2016). The genome of AR9, a giant transducing Bacillus phage

encoding two multisubunit RNA polymerases. Virology, 495, 185-196.

Lee, J. Y., Li, Z., & Miller, E. S. (2017). Vibrio phage KVP40 encodes a functional NAD+ salvage pathway. Journal of bacteriology, 199(9), e00855-16.

Lee, J-H., Shin, H., Ji, S., Malhotra, S., Kumar, M., Ryu, S., Heu, S. (2012). Complete Genome Sequence of Phytopathogenic *Pectobacterium carotovorum* subsp. carotovorum Bacteriophage PP1. *J. Virol.* 86, 8899–8900.

Lennon, J. T., & Martiny, J. B. (2008). Rapid evolution buffers ecosystem impacts of viruses in a microbial food web. Ecology Letters, 11(11), 1178-1188.

Lennon, J. T., Khatana, S. A. M., Marston, M. F., & Martiny, J. B. (2007). Is there a cost of virus resistance in marine cyanobacteria?. The ISME journal, 1(4), 300.

Lenski, R. E. (1988). Dynamics of interactions between bacteria and virulent bacteriophage. In Advances in microbial ecology (pp. 1-44). Springer US. Lenski, R. E., & Levin, B. R. (1985). Constraints on the coevolution of bacteria and virulent phage: a model, some experiments, and predictions for natural communities. The American Naturalist, 125(4), 585-602.

Lenski, R. E., & Mongold, J. A. (2000). Cell size, shape, and fitness in evolving populations of bacteria. In Scaling in Biology. 221-235. Oxford University Press.

Li, J., Yie, J., Foo, R.W.T., Ling, J.M.L., Xu, H., Woo, N.Y.S. (1999). Antibiotic resistance and plasmid profiles of Vibrio isolates from cultured silver sea bream, *Sparus sarba*. Marine Pollution Bulletin 39, 245-249. Li, X.C., et al. (2009). Endophthalmitis caused by *Vibrio alginolyticus*. Journal of clinical microbiology 47.10, 3379-3381.

Lim, J.A., Shin, H., Heu, S., Ryu, S. (2014). Exogenous lytic activity of SPN9CC endolysin against Gram-negative Bacteria. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 803–811.

Lin, H., Kwan, A.L., Dutcher, S.K. (2010). Synthesizing and salvaging NAD+: Lessons learned from *Chlamydomonas reinhardtii*. PLoS Genet. 6: doi:10.1371/journal.pgen.1001105.

Lin, Y-R.Y., Lin, C-S.C. (2012). Genome-wide characterization of *vibrio* phage ϕ pp2 with unique arrangements of the mob-like genes. *BMC Genomics*. 13, 1–14.

Lowe, T.M., Eddy, S.R. (1997). tRNAscan-SE: A proGram for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.* 25, 955–964.

Luke, K., Radek, A., Liu, X., Campbell, J., Uzan, M., Haselkorn, R., et al. (2002). Microarray analysis of gene expression during bacteriophage T4 infection. Virology 299, 182–191.

Luke, K., Radek, A., Liu, X., Campbell, J., Uzan, M., Haselkorn, R., Kogan, Y. (2002). Microarray analysis of gene expression during bacteriophage T4 infection. *Virology*. 299, 182–191.

Luke, K., Radek, A., Liu, X., Campbell, J., Uzan, M., Haselkorn, R., Kogan, Y. (2002). Microarray analysis of gene expression during bacteriophage T4 infection. Virology. 299, 182–191.

Luo, Z.H., Yu, Y.P., Jost, G., Xu, W., Huang, X. Ling. (2015). Complete genome sequence of a giant *Vibrio* bacteriophage VH7D. *Mar. Genomics.* 24, 293–295.

Luthy, R., Bowie, J.U., Eisenberg, D. (1992). Assessment of protein models with threedimensional profiles. *Nature*. 356, 83–85.

Liu, J. et al. Antimicrobial drug discovery through bacteriophage genomics. Nat. Biotechnol. 22, 185–191 (2004).

Lindell, D., Jaffe, J. D., Johnson, Z. I., Church, G. M. & Chisholm, S. W. Photosynthesis genes in marine viruses yield proteins during host infection. Nature 438, 86–89 (2005).

Martiny, A. C., Huang, Y. & Li, W. Occurrence of phosphate acquisition genes in Prochlorococcus cells from different ocean regions. Environ. Microbiol. 11, 1340–1347 (2009).

Madigan M, Martinko J, Stahl D, Clark D (2010). Brock Biology of Microorganisms (13th Edition). Benjamin Cummings. doi:citeulike-article-id:10894293.

Maharjan, R. P., & Ferenci, T. (2003). Global metabolite analysis: the influence of extraction methodology on metabolome profiles of Escherichia coli. Analytical biochemistry, 313(1), 145-154.

Maloney, P. C. (1994). Bacterial transporters. Current opinion in cell biology, 6(4), 571-582.

Mann, N.H., Clokie, M.R.J., Millard, A., Cook, A., Wilson, W.H., et al. (2005). The genome of S-PM2, a "photosynthetic" T4-type bacteriophage that infects marine Synechococcus strains. J Bacteriol 187, 3188–3200.

Matsuzaki, S., Tanaka, S., Koga, T., and Kawata, T. (1992). Abroad-host-range vibriophage, KVP40, isolated from sea water. Microbiol. Immunol. 36, 93–97.

Mesyanzhinov, V. V., Robben, J., Grymonprez, B., Kostyuchenko, V. a., Bourkaltseva, M.V., Sykilinda, N.N., Krylov, V.N., Volckaert, G. (2002). The genome of bacteriophage φKZ of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* 317, 1–19.

Mesyanzhinov, V.V., et al. (2002). The genome of bacteriophage phiKZ of Pseudomonas aeruginosa. Journal of molecular biology 317.1, 1-19.

Middelboe, M., Holmfeldt, K., Riemann, L., Nybroe, O., & Haaber, J. (2009). Bacteriophages drive strain diversification in a marine Flavobacterium: implications for phage resistance and physiological properties. Environmental microbiology, 11(8), 1971-1982.

Miller, E.S., Heidelberg, J.F., Eisen, J.A., Nelson, W.C., Durkin, A.S., Ciecko, A., et al. (2003a). Complete genome sequence of the broad-host-range vibriophage KVP40: comparative genomics of a T4-related bacteriophage. J. Bacteriol. 185, 5220–5233.

Miller, E.S., Heidelberg, J.F., Eisen, J.A., Nelson, W.C., Durkin, A.S., Ciecko, A., Feldblyum, T.V., White, O., Paulsen, I.T., Nierman, W.C., Lee, J., Szczypinski, B., Fraser, C.M. (2003). Complete Genome Sequence of the Broad-Host-Range Vibriophage KVP40: Comparative Genomics of a T4-Related Bacteriophage. *J. Bacteriol.* 185, 5220–5233.

Miller, E.S., Kutter, E., Mosig, G., Kunisawa, T., Rüger, W., Arisaka, F., et al. (2003b). Bacteriophage T4 genome bacteriophage T4 genome. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67, 86–156.

Miller, E.S., Kutter, E., Mosig, G., Kunisawa, T., Rüger, W., Arisaka, F., Ru, W. (2003). Bacteriophage T4 Genome Bacteriophage T4 Genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 86–156.

Modi, S.R., Lee, H.H., Spina, C.S., Collins, J.J. (2013). Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature*. 499, 219–222.

Moroz, O.V., Murzin, A.G., Makarova, K.S., Koonin, E. V., Wilson, K.S., Galperin, M.Y. (2005). Dimeric dUTPases, HisE, and MazG belong to a new superfamily of all- α NTP pyrophosphohydrolases with potential "house-cleaning" functions. *J Mol Biol.* 347, 243–255.

Muniesa, M., García, A., Miró, E., Mirelis, B., Prats, G., Jofre, J., Navarro, F. (2004). Bacteriophages and diffusion of beta-lactamase genes. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1134– 1137.

Mojica, F.J.M., Dı´ez-Villasen or, C., Garcia-Martinez, J., and Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. J. Mol. Evol. 60, 174–182.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2017). Brock biology of microorganisms (Vol. 13). Pearson.

Martínez, J. M., Swan, B. K., & Wilson, W. H. (2014). Marine viruses, a genetic reservoir revealed by targeted viromics. The ISME journal, 8(5), 1079.

Mmolawa, P. T., Schmieger, H., & Heuzenroeder, M. W. (2003). Bacteriophage ST64B, a genetic mosaic of genes from diverse sources isolated from *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT 64. Journal of bacteriology, 185(21), 6481-6485. ISO 690.

Montague, T. G., Cruz, J. M., Gagnon, J. A., Church, G. M., & Valen, E. (2014). CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. Nucleic acids research, 42(W1), W401-W407.

Mosig, G. (1998). Recombination and recombination-dependent DNA replication in bacteriophage T4. Annual review of genetics, 32(1), 379-413.

Nakagawa, H., Arisaka, F., Ishii, S. (1985). Isolation and characterization of the bacteriophage T4 tail-associated lysozyme. *J. Virol.* 54, 460–466.

Nakai, T., Park, S.C. (2002). Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. Res Microbiol. 153:13–8.

Nakayasu, E. S., Burnet, M. C., Walukiewicz, H. E., Wilkins, C. S., Shukla, A. K., Brooks, S., et al. & Müller, S. (2017). Ancient Regulatory Role of Lysine Acetylation in Central Metabolism. mBio, 8(6), e01894-17.

Nechaev, S., Severinov, K. (2003). Bacteriophage-induced modifications of host RNA polymerase. Annu. Rev. Microbiol. 57, 301–322.

Nechaev, S., Severinov, K. (2016). The elusive object of desire–interactions of Transcriptional Scheme of Giant Phage KZ. 88, 18.

Newton, A., et al. (2012). Increasing rates of vibriosis in the United States, 1996–2010: review of surveillance data from 2 systems. Clinical Infectious Diseases 54. suppl 5, S391-S395.

Ni, L., Xu, W., Kumaraswami, M., and Schumacher, M.A. (2010). Plasmid protein TubR uses a distinct mode of HTH-DNA binding and recruits the prokaryotic tubulin homo-log TubZ to effect DNA partition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 11763–11768.

Ogata, H., Goto, S., Sato, K., Fujibuchi, W., Bono, H., Kanehisa, M. (1999). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 27, 29–34.

Oliveira, H., Azeredo, J., Lavigne, R., & Kluskens, L. D. (2012). Bacteriophage endolysins as a response to emerging foodborne pathogens. Trends in food science & technology, 28(2), 103-115.

Oliveira, H., Thiagarajan, V., Walmagh, M., Sillankorva, S., Lavigne, R., Neves-Petersen, M. T., et al, Azeredo, J. (2014). A thermostable Salmonella phage endolysin, Lys68, with broad bactericidal properties against gram-negative pathogens in presence of weak acids. PLoS One, 9(10), e108376.

Oliveira, H., Boas, D.V., Mesnage, S., Kluskens, L.D., Lavigne, R., Sillankorva, S., Secundo, F., Azeredo, J. (2016). Structural and enzymatic characterization of ABgp46, a novel phage endolysin with broad anti-Gram-negative bacterial activity. *Front. Microbiol*. 7, 1–9.

Petersen, M.T., Kluskens, L.D., Azeredo, J. (2014). A thermostable *Salmonella* phage endolysin, Lys68, with broad bactericidal properties against Gram-negative pathogens in presence of weak acids. *PLoS One*. 9:doi:10.1371/journal.pone.0108376.

Ouidir, T., Kentache, T., Hardouin, J. (2015). Protein lysine acetylation in bacteria: Current state of the art. *Proteomics*. 16, 301-309.

Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G.D., Olsen, G.J., Davis, J.J., Disz, T., Edwards, R.A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., Vonstein, V., Wattam, A.R., Xia, F., Stevens, R. (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res.* 42, 206–214.

Pal, C., Maciá, M. D., Oliver, A., Schachar, I., & Buckling, A. (2007). Coevolution with viruses drives the evolution of bacterial mutation rates. Nature, 450(7172), 1079-1081.

Paruchuri, D. K., & Harshey, R. M. (1987). Flagellar variation in Serratia marcescens is associated with color variation. Journal of bacteriology, 169(1), 61-65.

Pasharawipas, T., Thaikua, S., Sriurairatana, S., Ruangpan, L., Direkbusarakum, S., Manopvisetcharean, J., & Flegel, T. W. (2005). Partial characterization of a novel bacteriophage of Vibrio harveyi isolated from shrimp culture ponds in Thailand. Virus research, 114(1-2), 63-69.

Pedulla, M. L. et al. Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes. Cell 113,

171–182 (2003).

Perez, G.L., Huynh, B., Slater, M., and Maloy, S. (2009). Transport of phage P22 DNA across the cytoplasmic membrane. Journal of bacteriology, 191, 135-140.

Petrov, V.M., Nolan, J.M., Bertrand, C., Levy, D., Desplats, C., Krisch, H.M., Karam, J.D. (2006). Plasticity of the Gene Functions for DNA Replication in the T4-like Phages. J Mol Biol 361, 46-68.

Petrov, V.M., Ratnayaka, S., Nolan, J.M., Miller, E.S., Karam, J.D. (2010). Genomes of the T4-related bacteriophages as windows on microbial genome evolution. *Virol. J.* 7, 292-310.

Pietilä, M. K., Demina, T. A., Atanasova, N. S., Oksanen, H. M., & Bamford, D. H. (2014). Archaeal viruses and bacteriophages: comparisons and contrasts. Trends in microbiology, 22(6), 334-344.

Plaza, N., Castillo, D., Pérez-Reytor, D., Higuera, G., García, K., & Bastías, R. (2017). Bacteriophages in the control of pathogenic vibrios. Electronic Journal of Biotechnology.

Prescott, L.M., Hardy, M.P., and Klein, J.P. (2006). Microbiology 8TH Edition McGraw Hill New York.

Price, A.R., Frabotta, M. (1972). Resistance of bacteriophage PBS2 infection to rifampicin, an inhibitor of Bacillus subtilis RNA synthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 1578–1585. Parks, A. R., Court, C., Lubkowska, L., Jin, D. J., Kashlev, M., & Court, D. L. (2014). Bacteriophage ? N protein inhibits transcription slippage by Escherichia coli RNA polymerase. Nucleic acids research, 42(9), 5823-5829.

Petrov, A. S., Boz, M. B., & Harvey, S. C. (2007). The conformation of double-stranded DNA inside bacteriophages depends on capsid size and shape. Journal of structural biology, 160(2), 241-248.

Pflüger, K., & de Lorenzo, V. (2007). Growth-dependent phosphorylation of the PtsN (EIINtr) protein of Pseudomonas putida. Journal of Biological Chemistry, 282(25), 18206-18211.

Rakhuba, D., V., Kolomiets, E., I., Dey, E., S., & Novik, G., I. (2010). Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. Pol. J. Microbiol, 59(3), 145-155.

Reardon, S. (2014). Phage therapy gets revitalized: the rise of antibiotic resistance rekindles interest in a century-old virus treatment. Nature, 510(7503), 15-17.

Ricci, V., and Piddock, L. J. V. (2010). Exploiting the role of TolC in pathogenicity: identification of a bacteriophage for eradication of Salmonella serovars from poultry. Appl. Environ. Microbiol. 76, 1704–1706. doi: 10.1128/AEM.02681-09.

Rajagopala, S. V.; Casjens, S.; Uetz, P. (2011). "The protein interaction map of bacteriophage lambda". BMC Microbiology. 11: 213. Rajagopala, S. V.; Casjens, S.; Uetz, P. (2011). "The protein interaction map of bacteriophage lambda". BMC Microbiology. 11: 213.

Raoult D, Audic S, Robert C, Abergel C, Renesto P, Ogata H, La Scola B, Suzan M, Claverie JM. 2004. The 1.2-megabase genome sequence of mimivirus. Science 306:1344–1350.

Ramakers C, Ruijter JM, Lekanne Deprez RH, Moorman AFM. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neurosci. Lett. 339, 62–66.

Richards, R.H. (1980). Observations on Vibriosis in Cultured Flatfish. In "Fish Diseases" Ed. W. Ahne), pp.75-81. Springer-Verlag, Berlin.

Ringel, A.E., Roman, C., Wolberger, C. (2014). Alternate deacylating specificities of the archaeal sirtuins Sir2Af1 and Sir2Af2. *Protein Sci.* 23, 1686–1697.

Romero, J., Feijoo, C.G., Navarrete, P. (2012). Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives, Health and Environment in Aquaculture, Dr. Edmir Carvalho (Ed.), ISBN: 978-953-51-0497-1, InTech.

Samson, J. E., Magadán, A. H., Sabri, M., & Moineau, S. (2013). Revenge of the phages: defeating bacterial defences. Nature Reviews Microbiology, 11(10), 675-687.

Sandegren, L., Nord, D., Sjöberg, B.M. (2005). SegH and Hef: Two novel homing endonucleases whose genes replace the *mobC* and *mobE* genes in several T4-related phages. *Nucleic Acids Res.* 33, 6203–6213.

Savalia, D., Robins, W., Nechaev, S., Molineux, I., Severinov, K. (2010). The role of the T7 Gp2 inhibitor of host RNA polymerase in phage development. J. Mol. Biol. 402, 118–126.

Sano, E., Carlson, S., Wegley, L. & Rohwer, F. Movement of viruses between biomes. Appl. Environ. Microbiol. 70, 5842–5846 (2004).

Schiewe, M. (1983). Vibrio ordalii as a cause of vibriosis in salmonid fish In: Crosa J.H. (eds) Bacterial and Viral Diseases of Fish. Washington Sea Grant, Seattle: 31-40.

Sgaramella, V., Van de Sande, J.H., and Gobind Khorana, H. (1970). Studies on Polynucleotides, CA Novel Joining Reaction Catalyzed by the T4-Polynucleotide Ligase. Proceedings of the National Academy of Sciences 67.3, 1468-1475.

Shlomai, J., Kornberg, A. (1978). Deoxyuridine Triphosphatase of *Escherichia coli*. J. *Biological Chem.* 253, 3305–3312.

Sing, W. D., & Klaenhammer, T. R. (1990). Characteristics of phage abortion conferred in lactococci by the conjugal plasmid pTR2030. Microbiology, 136(9), 1807-1815. Sippl, M.J. (1993). Recognition of Errors in Three-Dimensional Structures of Proteins. *Proteins.* 17, 355-362.

Sitbon, E., Pietrokovski, S.. (2003). New types of conserved sequence domains in DNA-binding regions of homing endonucleases. Trends Biochem. Sci. 28, 473–477.

Smith, G.P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science 228, 1315-1318.

Sorek, R., Kunin, V., & Hugenholtz, P. (2008). CRISPR—a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. Nature Reviews Microbiology, 6, 181-186.

Sorek, R., Kunin, V., & Hugenholtz, P. (2008). CRISPR—a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea.

Sørum, H. (2000). Farming of Atlantic salmon – an experience from Norway. Acta Vet Scand Suppl 93, 129–134, and 149–157.

Sørum, H. (2006). Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. In Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. Aarestrup, F.M. (ed.). Washington, DC, USA: ASM Press, pp. 213–238.

Starai, V.J. (2002). Sir2-Dependent Activation of Acetyl-CoA Synthetase by Deacetylation of Active Lysine. *Science*. 298, 2390–2392.

Sanger F, Coulson AR, Hong GF, Hill DF, Petersen GB. Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. J. Mol. Biol. 1982;162:729–773.

Stern, A., & Sorek, R. (2011). The phage-host arms race: shaping the evolution of microbes. Bioessays, 33(1), 43-51.

Stoddard, B.L. (2014). Homing endonucleases from mobile group I introns: discovery to genome engineering. Mob. DNA 5, 7.

Stoddard, B.L. (2014). Homing endonucleases from mobile group I introns: discovery to genome engineering. *Mob. DNA*. 5, 21.

Stone, R. (2002). Stalin's Forgotten Cure. Science. 298, 63–66.

Sulakvelidze, A. (2011). The challenges of bacteriophage therapy. *Ind. Pharm.* 45, 14–18.

Sullivan, M.B., Coleman, M.L., Weigele, P., Rohwer, F., Chisholm, S.W. (2005). Three *Prochlorococcus cyanophage* genomes: Signature features and ecological interpretations. PLoS Biol 3, e144.

Summers WC (2001). "Bacteriophage therapy". Annu. Rev. Microbiol. 55: 437–51. doi:10.1146/annurev.micro.55.1.437. PMID 11544363.

Suttle, C. Marine viruses-major players in the global ecosystem. Nat. Rev. Microbiol. 5, 801–12 (2007).

Svendsen, Y.S., & Bøgwald, J. (1997). Influence of artificial wound and non-intact mucus layer on mortality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following a bath challenge with *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida*. Fish & Shellfish Immunology, 7, 317-325.

Swarts, D. C., Jore, M. M., Westra, E. R., Zhu, Y., Janssen, J. H., Snijders, A. P., et al. &

van der Oost, J. (2014). DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute. Nature, 507(7491), 258-261.

Spinelli, S., Veesler, D., Bebeacua, C., & Cambillau, C. (2014). Structures and hostadhesion mechanisms of lactococcal siphophages. Frontiers in microbiology, 5, 3.

Siebold, C., Flükiger, K., Beutler, R., & Erni, B. (2001). Carbohydrate transporters of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS). FEBS letters, 504(3), 104-111.

Sullivan, M. B. et al. 2010. Genomic analysis of oceanic cyanobacterial myoviruses compared with T4-like myoviruses from diverse hosts and environments. Environ. Microbiol. 12, 3035–3056.

São-José C., De Frutos M., Raspaud E., Santos M. A., Tavares P. 2007. Pressure built by DNA packing inside virions: enough to drive DNA ejection in vitro, largely insufficient for delivery into the bacterial cytoplasm. J. Mol. Biol. 374:346–355.

Shin, H., Lee, J., Kim, H., Choi, Y., Heu, S., and Ryu, S. (2012). Receptor diversity and host interaction of bacteriophages infecting Salmonella enterica serovar Typhimurium. PLoS ONE 7:e43392. doi: 10.1371/journal.pone.0043392.

Siebold, C., Flükiger, K., Beutler, R., & Erni, B. (2001). Carbohydrate transporters of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS). FEBS letters, 504(3), 104-111.

Shao, Y., & Wang, N. (2009). Effect of late promoter activity on bacteriophage λ

fitness. Genetics, 181(4), 1467-1475.

Sime-Ngando, T., & Colombet, J. (2009). Virus and prophages in aquatic ecosystems. Canadian journal of microbiology, 55(2), 95-109.

Sharon, I. et al. Comparative metagenomics of microbial traits within oceanic viral communities. ISME J. 5, 1178–1190 (2011).

Tabor, S., and Richardson, C.C. (1985). A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. Proceedings of the National Academy of Sciences 82.4, 1074-1078.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30, 2725-2729.

Tarahovsky, Y.S., Khusainov, A.A., Deev, A.A., Kim, Y.V. (1991). Membrane fusion during infection of *Escherichia coli* cells by phage T4. FEBS Letters. 289, 8-22.

Tarahovsky, Y.S., xKhusainov, S.T., Daugelavichus, R., Bakene, E. (1995). Structural changes in *Escherichia coli* membranes induced by bacteriophage T4 at different temperatures. Biophysical Journal. 68, 157-173.

Taylor, Nicholas MI, et al. "Structure of the T4 baseplate and its function in triggering sheath contraction." Nature 533.7603 (2016): 346.

Thompson, C.C., Vicente, A.C.P,. Souza, R.C., Vasconcelos, A.T.R., Vesth, T., AlvesJr, N., Ussery, D.W., Iida, T., Thompson, F.L. (2009). Genomic taxonomy of Vibrios. BMC Evol Biol.

Thompson, F.L., Iida, T., & Swings, J. (2004). Biodiversity of Vibrios. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 68, 403-431.

Thompson, L. R. et al. Phage auxiliary metabolic genes and the redirection of cyanobacterial host carbon metabolism. Proc. Natl Acad. Sci. USA 108, E757–E764 (2011).

Toranzo, A.E., Barja, J.L. (1993). Virulence factors of bacteria pathogenic for coldwater fish. Annual Review of Fish Diseases 3, 5-36.

Toranzo, A.E., Magariños, B., and Romalde, J.L. (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. Aquaculture 246, 37–61.

Torrents, E. (2014). Ribonucleotide reductases: essential enzymes for bacterial life. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 4:doi:10.3389/fcimb.2014.00052.

Tschitschko, B., Williams, T. J., Allen, M. A., Páez-Espino, D., Kyrpides, N., Zhong, L., et al., Cavicchioli, R. (2015). Antarctic archaea–virus interactions: metaproteome-led analysis of invasion, evasion and adaptation. The ISME journal. 1(4), 300.

Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P.W. and Palmer, J.D. (1999). Investigating Deep Phylogenetic Relationships among Cyanobacteria and Plastids by Small Subunit rRNA Sequence Analysis. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46, 327–338.

Turner, D., Ackermann, H. W., Kropinski, A. M., Lavigne, R., Sutton, J. M., & Reynolds, D. M. (2017). Comparative analysis of 37 Acinetobacter bacteriophages. Viruses, 10(1), 5.

Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P.W. and Palmer, J.D. (1999). Investigating Deep Phylogenetic Relationships among Cyanobacteria and Plastids by Small Subunit rRNA Sequence Analysis. J. Eukaryot. Microbiol. 46, 327–338.

Tye, B.K., Lehman, I.R. (1977). Excision repair of uracil incorporated in DNA as a result of a defect in dUTPase. *J. Mol. Biol.* 117, 293–306.

Uchiyama, J., Rashel, M., Takemura, I., Wakiguchi, H., Matsuzaki, S. (2008). *In silico* and in vivo evaluation of bacteriophage φ EF24C, a candidate for treatment of *Enterococcus faecalis* infections. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4149–4163.

Ueno, H., Yonesaki, T. (2004). Phage-induced change in the stability of mRNAs. Virology 329, 134–141.

Uzan, M. (2009). RNA processing and decay in bacteriophage T4. Prog Mol Biol Transl Sci 85, 43–89.

Van Asselt, E.J., Dijkstra, A.J., Kalk, K.H., Takacs, B., Keck, W., Dijkstra, B.W. (1999). Crystal structure of *Escherichia coli* lytic transglycosylase Slt35 reveals a lysozyme-like catalytic domain with an EF-hand. *Structure* 7, 1167–1180.

Voegtli, W. C., White, D. J., Reiter, N. J., Rusnak, F., & Rosenzweig, A. C. (2000). Structure of the bacteriophage λ Ser/Thr protein phosphatase with sulfate ion bound

in two coordination modes. Biochemistry, 39(50), 15365-15374.

Von Borries, B., Ruska, E., & Ruska, H. (1938). Bakterien und Virus in übermikroskopischer Aufnahme. Klinische Wochenschrift, 17(27), 921-925.

Vlcek C, Paces V (1986). Nucleotide sequence of the late region of Bacillus phage F29 completes the 19,285-bp sequence of F29 genome. Comparison with the homologous sequence of phage PZA. Gene. 46 (2-3): 215–25.

Werts, C; Michel, V; Hofnung, M; Charbit, A (February 1994). "Adsorption of bacteriophage lambda on the LamB protein of Escherichia coli K-12: point mutations in gene J of lambda responsible for extended host range". Journal of Bacteriology. 176 (4): 941–7.

Wang, J., Jiang, Y., Vincent, M., Sun, Y., Yu, H., Wang, J., Bao, Q., Kong, H., Hu, S. (2005). Complete genome sequence of bacteriophage T5. *Virology* 332, 45–65.

Webster, L.C., Zhang, K., Chance, B., Ayene, I., Culp, J.S., Huang, W.J., Wu, F.Y., Ricciardi, R.P. (1991). Conversion of the E1A Cys4 zinc finger to a nonfunctional His2,Cys2 zinc finger by a single point mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 88,

Wheeler, L.J., Rajagopal, I., Mathews, C.K. (2005). Stimulation of mutagenesis by proportional deoxyribonucleoside triphosphate accumulation in *Escherichia coli*. *DNA Repair*. 4, 1450–1456.

Wickstead, B., and Gull, K. (2011). The evolution of the cytoskeleton. J. Cell Biol. 194, 513–525.

Wiederstein, M., Sippl, M.J. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*. 35, 407-410.

Wilson, J.H. (1973). Function of the bacteriophage T4 transfer RNA's. J. Mol. Biol. 74, 753–757.

Wilson HR, Yu D, Peters HK 3rd, Zhou JG, Court DL. 2002. The global regulator RNase III modulates translation repression by the transcription elongation factor N. EMBO J. 21:4154–61

Wittmann, J., Dreiseikelmann, B., Rohde, M., Meier-Kolthoff, J.P., Bunk, B., Rohde, C. (2014). First genome sequences of *Achromobacter* phages reveal new members of the N4 family. Virol. J. 11, 28.

Wong-Staal, F., Yu, M., Yamada, O., Ojwang, J. O., Leavitt, M. C., & Ho, A. (2000). U.S. Patent No. 6,132,962. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Yamano, T., Nishimasu, H., Zetsche, B., Hirano, H., Slaymaker, I.M., Li, Y., et al. & Ishitani, R. (2016). Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA. Cell, 165, 949-962.

Yano, S., T., and Rothman-Denes, L., B. (2011). A phage-encoded inhibitor of Escherichia coli DNA replication targets the DNA polymerase clamp loader. Mol. Microbiol. 79, 1325–1338 (2011). Yahara, K, Fukuyo, M, Sasaki, A, Kobayashi, I., (2009). Evolutionary maintenance of selfish homing endonuclease genes in the absence of horizontal transfer. Proc Natl Acad Sci USA, 106(1):8861-18866.

Yildiz, F.H., Visick, K.L. (2009). Vibrio biofilms: so much the same yet so different. Trends in microbiology. 17, 109-118.

Zafar, N., Mazumder, R., Seto, D. (2002). CoreGenes: a computational tool for identifying and cataloging "core" genes in a set of small genomes. *BMC Bioinformatics.* 3, 12-19.

Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Gutiérrez-De Frías, C., Cortés A. (2006). Ontogeny of the immune system of fish. Fish Shellfish Immunol. 20:126–36.

Zeng, Q., Bonocora, R.P., and Shub, D.A. (2009). A free-standing homing endonuclease targets an intron insertion site in the psbA gene of cyanophages. Curr. Biol. 19, 218–222.

Zeng, Q., Bonocora, R.P., Shub, D.A. (2009). A Free-Standing Homing Endonuclease Targets an Intron Insertion Site in the psbA Gene of Cyanophages. *Curr. Biol.* 19, 218–222.

Zerbino, D.R., Birney, E. (2008). Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 18, 821–829.

Zhao, K., Chai, X., Marmorstein, R. (2004). Structure and Substrate Binding Properties of cobB, a Sir2 Homolog Protein Deacetylase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 337, 731–741.

Zhuhua, L., Dezan, Y., Yanping, Y. (2014). Vibrio Harveyi Giant VP4B and Application Thereof. Patent CN103555671A. Washington, DC: Patent Trademark Office.