

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar

HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Biokémiai Intézet

**Profág régiók szisztematikus vizsgálata
genomszerkesztési módszerekkel**

Sipos Levente
Molekuláris Biológia MSc
II. Évfolyam

Témavezető: **Dr. Csörgő Bálint**, tudományos főmunkatárs
HUN-REN SZBK, Lendület Gensebészeti Módszertan kutatócsoport,
Biokémiai Intézet

Belső konzulens: **Dr. Bodai László**, tanszékvezető, Biokémiai
és molekuláris Biológiai Tanszék, SZTE TTIK Biológia Intézet

37. OTDK Biológia Szekció

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés és irodalmi áttekintés	4
1.1	Kórokozó baktériumok és profágok	4
1.2	Fágterápia és profág-mentes baktériumtörzsek létrehozása	6
1.3	CRISPR-Cas3 rendszer	8
2.	Célkitűzés.....	10
3.	Anyagok és módszerek	11
3.1	Baktérium törzsek és bakteriofágok	11
3.2	Antibiotikumok	11
3.3	Táptalajok/Tápoldatok	11
3.4	Enzimek.....	11
3.5	MIC mérések	12
3.6	Konstruktok létrehozása	13
3.6.1	Plazmid izolálás.....	13
3.6.2	PCR amplifikáció	14
3.6.3	Gibson assembly.....	15
3.6.4	Elektroporálás és kompetens sejtek készítése	15
3.6.5	<i>Spacer</i> tervezés.....	17
3.6.6	Oligonukleotidok hibridizálása és foszforilálása.....	18
3.6.7	<i>Spacer</i> ligálás	18
3.7	Transzformálás és indukálás	19
3.8	Kolónia PCR	19
3.9	Spot assay (18)	20
4.	Eredmények	21
4.1	MIC mérések.....	21
4.2	Fág rezisztencia felmérése.....	22
4.3	Új konstruktt létrehozása.....	23
4.4	Profágok azonosítása.....	24
4.5	Deléciók ellenőrzése	25
5.	Diszkusszió	27
6.	Összefoglalás	29
7.	Köszönetnyilvánítás	30
8.	Irodalomjegyzék	31

Rövidítések jegyzéke:

MDR – multidrog rezisztens

CRISPR - *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats*

Cas – *CRISPR associated*

PAM – *Protospacer Adjacent Motif*

GEN – Gentamicin-szulfát

ZEO - Zeocin

APS – Apramycin-szulfát

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

OD – *Optical Density*

AciXXX – Klinikai *Acinetobacter baumannii* izolátumok, nem publikált eredményekből, Dr. Kintses Bálint hozzájárulásával

F1-F16 – Dr. Kintses Bálint csoportja által izolált bakteriofágok, nem publikált eredményekből

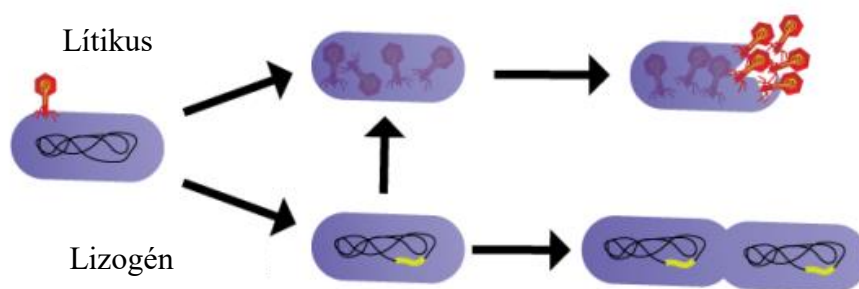
gDNS – genomi DNS

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

1.1 Kórokozó baktériumok és profágok

A patogén - vagy másnéven kórokozó - baktériumok és főleg azok antibiotikum rezisztens változatai, egyre nagyobb egészségügyi problémát jelentenek világszerte. A tudományos közösség a 6 legveszélyesebb patogén baktériumtörzset „ESKAPE” baktériumokként tartja számon (1). Az ide tartozó kórokozók a következők: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Enterobacter spp.* Ezek a baktériumok igen magas fertőzőképességgel és antibiotikum rezisztenciával rendelkeznek, így fokozottan veszélyesek az immunhiányos állapotban lévő kórházi betegekre. Így például 2019-ben több mint 1,2 millió halálesetért voltak felelősek (2). Egyes becslések szerint a multidrogrezisztens baktériumok 2050-re a világ vezető halálozási okává nőhetik ki magukat (3), amennyiben nem sikerül hatékony módszert találnunk a megállításukra. E célból kulcsfontosságú, hogy jobban megértsük, hogyan alakul ki az antibiotikum rezisztencia és miért annyira fertőzők ezek a baktériumok.

A bakteriofágok, vagy röviden fágok, a Földön legelterjedtebb biológiai entitások, számuk a bioszférában egy becslés szerint 10^{31} (4). A fágok a baktériumok vírusai, a gazdasejtbe építik be saját örökítőanyagukat, nem képesek önálló replikációra, fehérje és nukleinsav szintézisre.



1. ábra - A bakteriofágok életciklusai (Saját ábra)

Életciklus alapján megkülönböztetünk lítikus, illetve lizogén fágokat. A lítikus ciklus során, a bakteriofág replikációját a gazdasejt azonnali pusztulása követi, aminek következtében az összeszerelődött új fágok kijutnak a sejt környezetébe, ahol új gazdákat képesek megfertőzni. A baktériumokba beépülő fág eredetű DNS szakaszokat profágoknak nevezzük. A lizogén bakteriofágok a beépült DNS-szakaszuk által a gazda genomjával együtt replikálódnak, többnyire ártalmatlanul a sejt nézve-, ugyanis a beépült profág egy citoplazmatikus represszort

termel, amely gátolja a lítikus ciklust (**1. ábra**). Csupán akkor aktiválódnak a nyugvó profágok, amikor a gazdaszervezet körülményei számukra kedvezőtlené válnak, (pl. tápanyagok hiánya/környezeti stressz) ekkor indul be a bakteriofág reprodukív ciklusa, illetve a gazdasejt emésztése.

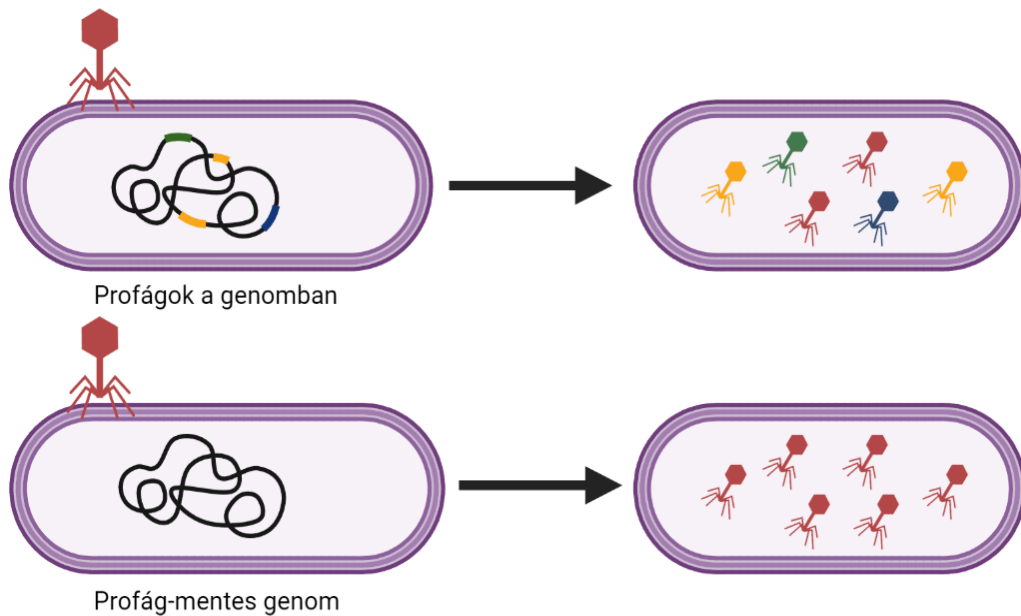
A profág szekvenciák jól elkülöníthető régiókat, ún. genomi szigeteket hoznak létre. Ezek a genom olyan részei, amelyek bizonyítottan horizontális géntranszfer (idegen, nem öröklődött) eredetűek. Ezekbe a genomi szigetekbe szerveződött szekvenciák hordozhatnak antibiotikum rezisztencia géneket, virulencia faktorokat vagy olyan egyéb géneket, amelyek segítik az alkalmazkodást új környezethez. A profágokban található gének rendelkezhetnek ún. “moron” funkciókkal (5) (a fágok rendelkezhetnek több ilyen génnel, “*more on*”), melyek közvetlen nem maga a fág életciklusát szolgálják, hanem a gazda sejt számára nyújtanak valamilyen előnyös funkciót. A moron gének általában egymástól független promóter és terminátor szekvenciával rendelkeznek, ami lehetővé teszi a gének független expresszióját, és minimalizálják a különböző gének interferenciáját. Ugyanez a szerveződés teszi lehetővé, hogy a lizogén fágok nyugvó állapotban csak bizonyos, pl. virulencia géneket expresszálnak (5), míg más fág-gének teljesen inaktívak maradnak. A profág-régiók felkutatására különböző bioinformatikai szoftvereket használhatunk (6), amennyiben ismert a vizsgált baktérium teljes genomszekvenciája.

1.2 Fágterápia és profág-mentes baktériumtörzsek létrehozása

A bakteriofágok használata és kutatása több mint 100 éves múlttal rendelkezik (7), azonban az 1940-es évekre ez a terület háttérbe szorult a Penicillin és a többi antibiotikum sikerének köszönhetően. Mint sok minden más, az antibiotikumok aranykorszaka sem tarthatott örökké, az 1980-as évekre lelassult ezeknek a szereknek a fejlesztése (8). Egyre kevesebb új, rezisztencia-mentes és hatásos antibiotikum került piacra, egyre több gyógyszer cég hagyott fel ezekkel a projektekkel. A fágterápiának számos előnye van a hagyományos antimikrobiális szerekkel szemben: sokkal specifikusabbak, mint az antibiotikumok, csak a káros baktériumokkal szemben hatnak, ezáltal nem jelentenek veszélyt az emberi szervezet hasznos mikrobiomjára nézve. A bakteriofágok a legtöbb esetben hatásosak maradnak MDR (multidrog-rezisztens) baktériumokkal szemben is, hiszen a fágok is képesek evolválódni. Egyfajta “fegyverkezési verseny” folyik a baktériumok és vírusaik között, ezért a baktériumok sokkal nehezebben válnak fágrezisztenssé. Egyes kutatások azt is bizonyították (9), hogy a bakteriofágok a biofilmet termelő kórokozókkal is képesek felvenni a harcot.

Ugyanakkor a gazdaspecifitásnak hátránya is van: ahhoz, hogy egy fertőzött beteget hatásosan kezelhessünk, először olyan fágokat kell „vadásznunk”, amelyek laboratóriumi körülmények között képesek elpusztítani a beteg szervezetéből izolált kórokozókat. Ez a folyamat igen hosszú lehet, esetenként akár hónapokba is telhet, ezért érdemes egy ún. „fág-koktél” adni a páciensnek, amely többféle bakteriofág keveréke. Ezáltal növelhető a hatásspektrum, a kezelés hatékonysága, illetve ugyanakkor csökkenthető annak az esélye, hogy az adott baktériumban rezisztencia fejlődjön ki egy specifikus bakteriofággal szemben. Másfelől, a fágterápiával kapcsolatban igazán kevés klinikai teszt eredménye áll rendelkezésre, nincsenek egyértelmű irányelvek és útmutatások a fágokkal szemben. Az FDA és EMA (Federal Drug Administration; European Medicinal Agency) csak olyan esetben engedélyezi a kezelést, amennyiben minden más (pl. antibiotikumos) kezelés eredménytelennek bizonyul (10). Az első európai, bakteriofágokkal foglalkozó, projekt („PhagoBurn” 2013-2017) elég hamar lezárult, de azóta több új próbálkozás is előtérbe került, ilyen például, a német „Phage4Cure” (2017-) projekt is. Ezeknek az átfogó kutatásoknak és klinikai teszteknek köszönhetően, először izoláltak olyan *Pseudomonas* törzsekkel szemben hatásos bakteriofágokat, amelyek megfeleltek a GMP (*Good Manufacturing Practice*) specifikációinak és minőségi elvárásainak (11), így ez egy jelentős lépés volt afelé, hogy a fágterápia törvényes és elismert kezeléssé válhasson.

A bakteriofág terápiára kizárólag lítikus fágok alkalmasak. Efféle bakteriofágok előállításához szükséges, hogy az adott fág specifikus gazdasejtjét megfertőzzük, majd a sejtlyízist követően elkülönítsük és tisztítsuk az összeszerelődött bakteriofágokat.

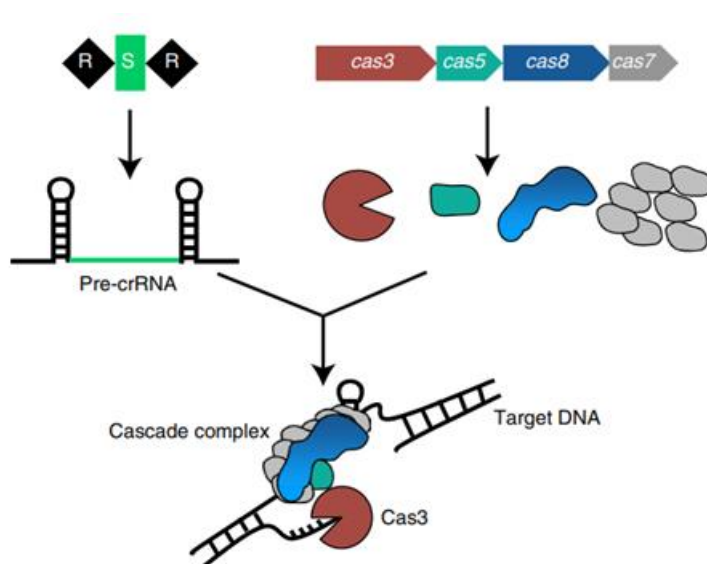


4. ábra – A profágok indukálódása heterogén bakteriofágok képződéséhez vezet

Azonban ez a folyamat több szempontból is nehézséget jelent: profágokat tartalmazó gazdasejt esetén, a lizogén profágok indukálódhatnak és átléphetnek lítikus ciklusba, ami egy heterogén fágokat tartalmazó szuszpenziót eredményez. Ez a kimenetel nem elfogadható sem minőségi, sem farmakokinetikai szempontokból, illetve így nem vizsgálható megfelelőképpen a kezelés hatékonysága.

1.3 CRISPR-Cas3 rendszer

Ahhoz, hogy megismerhessük a profág régiók funkcióját, szükséges, hogy szisztematikusan, nagy hatékonysággal és pontossággal távolítsuk el őket, miáltal megfigyelhetővé válnak a hiányuk okozta fenotípus változások. Erre a feladatra a CRISPR-Cas3 rendszer I-C típusú változatát használtam (12), amely egy *Pseudomonas aeruginosa* eredetű, egyfajta bakteriális immunrendszerként működő enzimrendszer. Ezt az „immunrendszert” egy olyan genomszerkesztési módszerként alkalmazhatjuk, amely képes előre meghatározott genomi DNS szakaszok eltávolítására, ezáltal hatékonyan hozhatunk létre pontos, nagyméretű deléciókat (13).

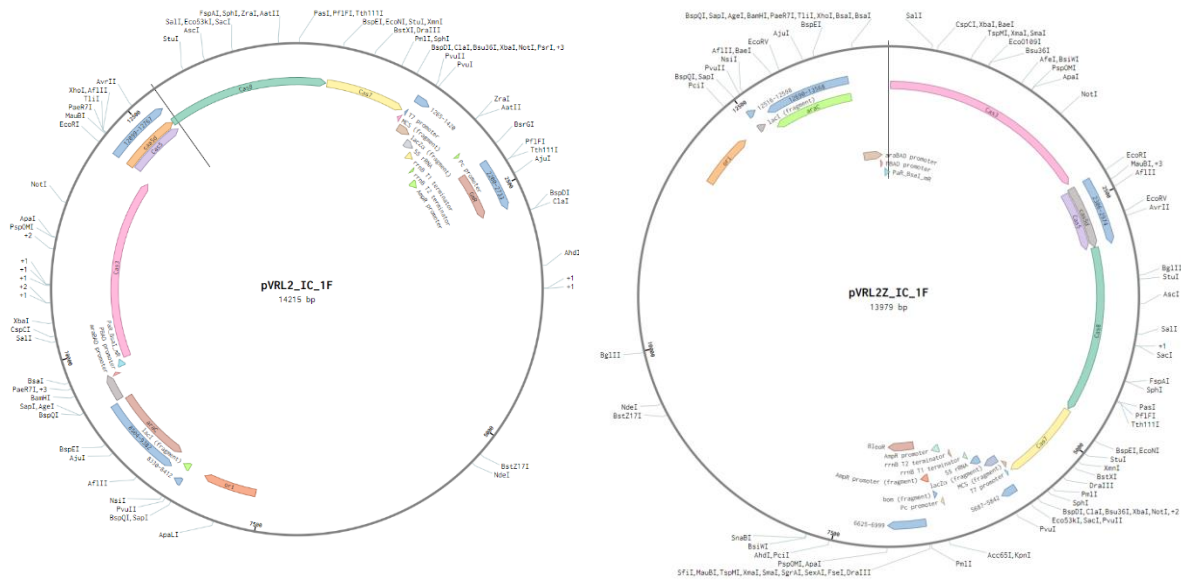


2. Ábra – A CRISPR-Cas3 rendszer felépítése és működése (12)

A CRISPR-Cas3 rendszerben a Cas3 enzimen kívül három másik, CRISPR-asszociált fehérjét kódoló gén is található, amelyek az ún. „surveillance cascade-complex” kialakításáért felelősek (2. ábra). A CRISPR-array-ben szabályosan ismétlődő palindrom szekvenciák és „spacer” DNS szakaszok váltakoznak. A spacer DNS szekvenciákról transzkripció révén olyan „guide” RNS képződik, amely segítségével a kaszkád-komplex képes felismerni a cél szekvenciát és a Cas3 lebontja a kijelölt szakaszt. A Cas3 rendszer egyesszálú DNS szakaszokat céloz, a Cas9 kettősszálú DNS töréseivel szemben, illetve a Cas3 rendszer helikáz aktivitással is bír. Ezek a szempontok mind hozzájárulnak ahhoz, hogy hatékonyabban illetve szignifikánsan kisebb off-target hatással hozzunk létre nagyméretű genomi deléciókat (14). A felismerés fontos eleme a

PAM-szekvencia, amely egy rövid, közvetlenül a *spacer* mellett található, pár nukleotidból álló szakasz, aminek a segítségével ismeri fel az enzimszisztéma a célzott régiót.

Ahhoz, hogy a fent említett génszerkesztő módszert alkalmazni tudjuk a gyakorlatban, szükség van egy ún. „shuttle vector”-ra. Ez egy olyan vektor, általában plazmid, amely képes két különböző gazda organizmusban (jelen esetben *Escherichia coli* és *Acinetobacter baumannii*) is replikálódni, így maga a klónozási és konstrukciós készítmény előkészítési lépéseket laboratóriumi munkákra optimalizált törzsben végezhetjük, majd később átvihetjük a módosítandó organizmusba. Egy ilyen konstrukciós segítségével tetszőleges szerkesztést végezhetjük a célszervezetünk genomján. Az általam használt vektor tartalmazza a Cas3 enzim kódoló gént, illetve 3 másik (*cas5*, *cas7*, *cas8*) gént is, amelyek a kaskád komplex fehérjéit kódolják. Ez a pVRL2 vektor egy ColE1 eredetű replikációs origót, illetve egy arabinóz által indukálható *araC* promótert is tartalmaz (15), amely lehetővé teszi a klónozott gének magas szintű expresszióját (3. ábra).



3. ábra – pVRL2 és pVRL2Z shuttle vektorok
(Dr. Joseph Bondy-Denomy, UCSF San Francisco, Egyesült Államok)

A pVRL2 plazmidokon található egy ún. „modified repeat”, ami struktúráisan a CRISPR-array-ben található ismétlődő szakaszoknak felel meg, azonban eltérő szekvenciával rendelkezik. Így megakadályozható a rekombinációkor történő elvesztése az ismétlődő szakaszok közötti, ún. “spacer” szekvenciának, mely szakasz meghatározza a génszerkesztés pontos helyét a genomban

2. Célkitűzés

A 21. század egyik legnagyobb kihívása az antibiotikum rezisztens kórokozókkal szembeni harc, amire egyelőre nem sikerült megoldást találni, az új fejlesztésű antibiotikumok ellen is képes rezisztencia kialakulni (16). A fágterápia egy olyan alternatív megoldást jelenthet, amely jelentősen visszaszoríthatja az MDR kórokozók által jelentett fenyegetést. Azonban ehhez jobban meg kell ismernünk a gazdasejtek genomját, illetve a bennük megtalálható profág régiókat is. Ebből a célból kiindulva az alábbi részcélokat tűztük ki:

- A CRISPR-Cas3 rendszer működőképességének vizsgálata *A. baumannii*-ban
- Profág régiók előfordulásának vizsgálata *A. baumannii*-ban
- Nagyméretű és pontos genomi deléciók létrehozása (~20 kb-400 kb)
- Profág-csökkentett illetve teljesen profágmentes baktériumtörzsek létrehozása a későbbiekben, amelyek alkalmasak lehetnek terapeutikus bakteriofágok termelésére
- Belátást nyerni a profágok pontos szerepébe

3. Anyagok és módszerek

3.1 Baktérium törzsek és bakteriofágok

Acinetobacter baumannii törzsek – HUN-REN SZBK Biokémia Intézet, Transzlációs

Mikrobiológiai csoport (csoportvezető: Dr. Kintsés Bálint) – nem publikált, klinikai izolátumok:

Aci4, Aci72, Aci166, Aci191, Aci222, Aci223

Escherichia coli K12 BW25113 (ATCC törzsgyűjteményből)

Bakteriofágok: A Kintsés csoport által izolált, nem publikált eredményekből származó bakteriofágok. Rövidítésük: F1-F16

3.2 Antibiotikumok

Gentamicin (gyártó: Sigma Aldrich) rövidítés: GEN

Zeocin (gyártó: InvivoGen) rövidítés: ZEO

Apramycin-Szulfát (gyártó: Sigma Aldrich) rövidítés: APS

3.3 Táptalajok/Tápoldatok

LB (Luria-Bertani) 1 w% tripton, 0,5 w% élesztőkivonat, 1 w% NaCl.

Táptalajhoz: + 1,5 w% bacto-agar

LB-LS (Luria-Bertani Low Salt): 1 w% tripton, 0,5 w% élesztőkivonat, 0,1 w% NaCl.

Táptalajhoz: + 1,5 w% bacto-agar

TB (Terrific Broth): 1,2 w% tripton, 2,4 w% élesztőkivonat, 0,4 w% glicerin, monobázikus

Nátrium-foszfát 0.17M, dibázikus Nátrium-foszfát 0,72M

3.4 Enzimek

Restrikciós enzimek:

NotI – gyártó: Thermo Fisher Scientific

BsaI-HFv2 – gyártó: New England Biolabs

EcoNI - gyártó: New England Biolabs

Egyéb enzimek:

T4 Polinukleotid kináz – gyártó: New England Biolabs

T4 Ligáz – gyártó: New England Biolabs

Polimeráz Master Mixek:

Hot Start Green DreamTaq Master Mix – gyártó: Thermo Fisher Scientific

Hot Start Green Phusion Master Mix – gyártó: Thermo Fisher Scientific

3.5 MIC mérések

Az adott törzsnek megfelelő táptalajt és Gentamicint, Zeocint vagy Apramycint (Gentamicin és Apramycin esetén: LB + agar; Zeocin esetén LB-LS + agar) tartalmazó lemezre, 100 µl overnight kultúrából származó, 10^5 sejtből álló szuszpenziót szélesztettem üveggyöngyök segítségével. A lemezeket 37 °C-on inkubáltam *overnight*. Az MIC méréseket két körben végeztem, a következőképpen:

1. Antibiotikum koncentrációk [µg/ml]: 25, 50, 100, 150, 200
2. Antibiotikum koncentrációk [µg/ml]: 250, 300, 350, 400

A mérések során három biológiai replikátummal dolgoztam törzsenként, az MIC értékek ennek a három értéknek az átlagából származnak. Minden különböző koncentrációjú antibiotikumos lemez közül egyre nem szélesztettem kultúrát, hanem steril, negatív kontrollként inkubáltam.

3.6 Konstruktok létrehozása

3.6.1 Plazmid izolálás

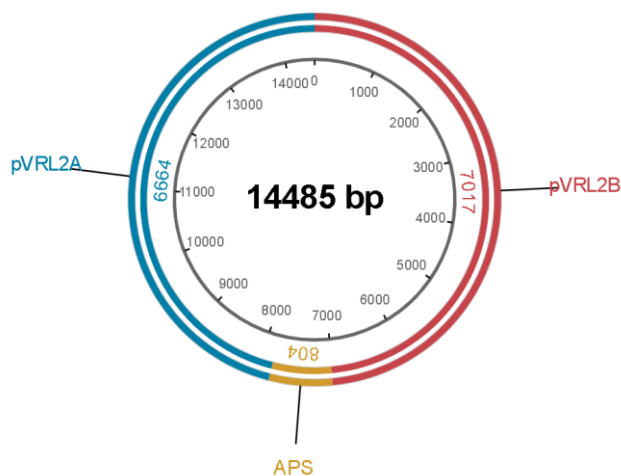
A kiindulási pontként szolgáló plazmidokat (pVRL2, pVRL2Z, Dr. Joseph Bondy-Denomy laboratóriuma, University of California, San Francisco) DH5- α *E. Coli* törzsbe elektroporáltam, majd antibiotikumos lemezeken szelektált (Zeocin 50 μ g/ml, Gentamicin 50 μ g/ml) telepekből, 1-1 különálló telepet oltottam le antibiotikummal kiegészített LB tápoldatba. Az így kapott kultúrát 18 órán keresztül 37 °C-n inkubáltam. Az izolálást kittel végeztem, a gyártó utasításainak megfelelően. (Thermo Fisher Scientific – GeneJET Plasmid Miniprep kit). A plazmidok mennyiségét és minőségét NanoDrop 1000 (gyártó: Thermo Fisher Scientific) spektrofotométer műszer segítségével ellenőriztem. Szükség esetén, az izolált plazmidokat tovább tisztítottam és koncentráltam (Zymo Research: Clean & Concentrator kit). A plazmidokat próbamésztéssel (EcoNI restrikciós endonukleáz, gyártó: New England Biolabs) és Illumina szekvenálással ellenőriztem.

3.6.2 PCR amplifikáció

Az új, APS rezisztencia markert hordozó vektor elkészítéséhez, a pVRL2 vektort két részben (A és B), amplifikáltam (5. ábra), illetve az Apramycin inszertet egy másik, pSGAb-Apr, vektorról szaporítottam fel. A reakciókhoz Phusion Master Mix-et használtam. A reakciók összeméréséhez és a *Thermocycler* program megtervezéséhez a gyártó által mellékelt protokoll utasításait követtem. A primerek tervezéséhez a New England Biolabs által fejlesztett, NEBuilder alkalmazást használtam.

Primerek listája:

pVRL2A_fwd	GATTGGCTGACAATTCGTTCAAGCCGAG
pVRL2A_rev	TCTGAATGGCGGGAGTATGAAAAGTATGGC
pVRL2B_fwd	TCATACTCCCGCCATTCAGAGAAGAAACC
pVRL2B_rev	CTGATGACATCGTTGCTGCTCCATAACATC
APS_fwd	AGCAGCAACGATGTCATCAGCGGTGGAG
APS_rev	GAACGAATTGTCAGCCAATCGACTGGCG



5. ábra – pVRL2APS konstrukt összeillesztése
fragmensekből

Thermocycler programok:

pVRL2A – 98°C 30s, 30 ciklus: | 98 °C 30s; 70,7 °C 30s; 72 °C 3 perc | 72°C 5 perc, 4°C ∞

pVRL2B – 98°C 30s, 30 ciklus: | 98 °C 30s; 70 °C 30s; 72°C 3 perc | 72°C 5 perc, 4°C ∞

APS inszert – 98°C 30s, 30 ciklus: | 98 °C 30s; 70 °C 30s; 72°C 30s | 72°C 5 perc, 4°C ∞

3.6.3 Gibson assembly

A pVRL2APS vektort Gibson Assembly reakció keretében (GeneArt Gibson Assembly HiFi Master Mix - gyártó: Thermo Fisher Scientific) kit segítségével illesztettem össze. A konstruktot az előző pontban látható séma alapján, 3 fragmensből állítottam össze.

Gibson assembly reakció:

Fragmens "A" (0,08 pmol)	x µl
Fragmens "B" (0,08 pmol)	y µl
APS inszert (0,08 pmol)	z µl
Master Mix 2x	5 µl
Víz (RNáz, DNáz mentes)	10 µl-ig
	10 µl

Thermocycler program: 50 °C 15 perc, 4 °C ∞

A fragmensek és az inszert mennyiségét a gyártó által mellékelt protokollban található összefüggéssel számoltam ki:

$$c [pmol] \approx \frac{tömeg [ng] * 1000}{fragmens\ hossza [bp] * 660}$$

3.6.4 Elektroporálás és kompetens sejtek készítése

(Elektro)Kompetens sejtek készítése (17):

A kompetens sejtek elkészítéséhez az első napon glicerines, fagyasztott kultúrából oltottam le LB tápoldatba, 37 °C-on overnight inkubáltam. Másnap ebből a kultúrából 1 ml-t oltottam le 100 ml LB tápoldatba. Ezt követően a sejteket 37 °C-n növesztettem addig, amíg el nemérték el a kívánt OD₆₀₀ értéket.

(*E. coli* esetén OD₆₀₀ = 0,5-0,7; *A. baumannii* esetén OD₆₀₀ = 0,8-1,0)

A sejt kultúrát OD mérés után 15 percre jégre helyeztem, ezt követően centrifugáltam őket (5000 rpm, 5 perc, 4 °C), majd steril, desztillált vízben reszuspendáltam őket. Újabb centrifugálás után 10 %-os glicerinnel oldatban reszuspendáltam a sejteket, majd egy végső centrifugálás után 1 ml 10 %-os glicerinnel reszuspendáltam őket. Az így nyert sejteket 50 µl-ként alikvótoltam előre hűtött, steril Eppendorf csövekbe. A kompetens sejteket felhasználásig -80 °C-on tároltam. A folyamat alatt végig jégen tároltam a sejteket és a használt oldatokat.

Elektroporálás (17)

A kompetens sejteket és 100 ng plazmid DNS-t (Gibson assembly termék elektroporálása esetén legfeljebb 1 µl terméket elektroporáltam) 1 mm-es elektroporáló küvettákba mértem. Az elektroporálást MicroPulse (gyártó: BIO-RAD) elektroporáló készülékkel végeztem és a gyártó által ajánlott, EC1 programot használtam. Elektroporálás után a sejteket TB tápoldatban reszuszpendáltam és 1 órát inkubáltam 37 °C-on, 220 rpm-en. Ezt követően a sejszuszpenzióból 100 µl-t megfelelő antibiotikumot és LB táptalajt tartalmazó agaros lemezre szélesztettem, steril üveggyöngyök segítségével. A lemezeket 37 °C-on inkubáltam overnight.

3.6.5 Spacer tervezés

Az Acil66 törzsben, az 5 azonosított profág régiót céloztam meg: ezekre a régiókra 2-2, 34 bázispár hosszúságú oligonukleotidot terveztem, az alábbi séma alapján:

#1 Célt profág szekvencia:

5'- TGCATATTTTTTTT TTC TTTAAAAACATTAAGTGCCATTTTTTAAAAACCAT
TAAATATAAAAAATGCTAAGATTAGATACCATACCTTAAAGAAAAATTAAAAAAGA
ACCTTTGTAATATTCTTTATTTATATGACGATGGCTCCTTGAGCTAAAAAATCAG TTC
ATTATTTGAACACATTTTATAAATAAAAAATTTT GAACTTTATAA -3'

Forward szálát célzó spacer:

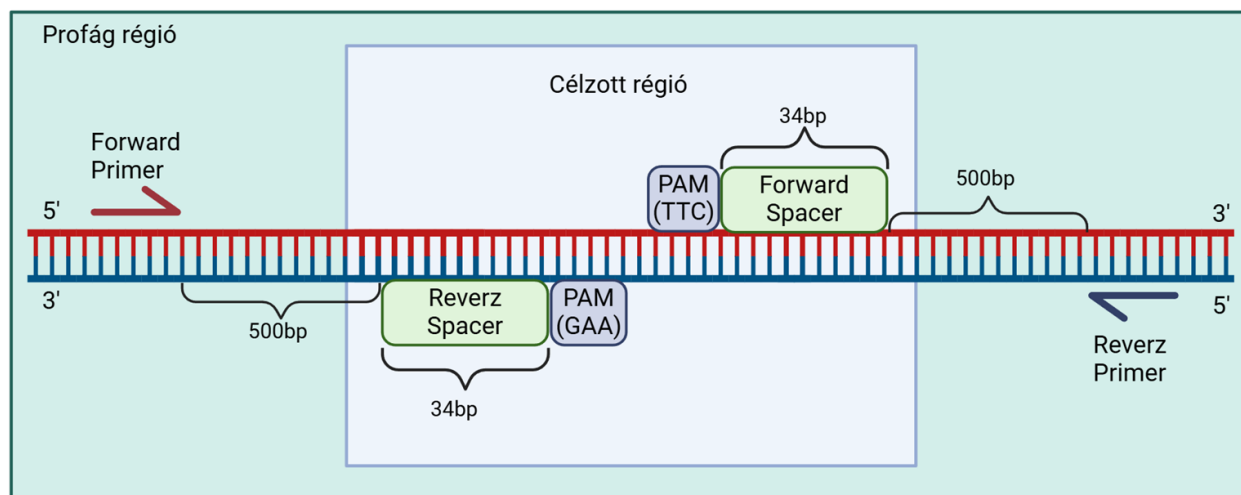
Spacer_1_FWD: 5'-gaaac TTTAAAAACATTAAGTGCCATTTTTTAAAAACCATg

Spacer_1_REV: 5'-gcgac ATGGTTTTTAAAAATGGCACTTAATGTTTTTTAAAg

Reverz szálát célzó spacer:

Spacer_2_FWD: 5'-gaaac AAAATTTTTTATTTTATAAAATGTGTTCAAATAATg

Spacer_2_REV: 5'-gcgac ATTATTTGAACACATTTTATAAATAAAAAATTTTg



6. ábra – Spacer tervezés vizuális sémája - A spacerektől 500 bázispárnyira, upstream illetve downstream, PCR primereket tervezünk, a deléciók létrejöttének megerősítése céljából.

3.6.6 Oligonukleotidok hibridizálása és foszforilálása

A plazmidok BsaI-el történő emésztése után, a tervezett forward és reverz oligonukleotidok hibridizációja és a jobb ligálási hatékonyság érdekében, azok foszforilálása, szükséges. Ezt a két folyamatot egy közös reakció keretein belül, a következőképpen mértem össze:

PNK (Polinukleotid-kináz) Puffer:	2,5µl
ATP (10mM):	2,5 µl
T4 Polinukleotid-kináz enzim:	1,0 µl
Oligo 1:	2,0 µl
Oligo 2:	2,0 µl
Víz (Rnáz-Dnáz mentes dH ₂ O)	<u>15,0 µl</u>
	25 µl

Thermocycler program: 37 °C 2 óra, 65 °C 10 perc, 95 °C 5 perc, fokozatos hűtés 22 °C-ra. A reakció végeztével a hibridizált oligonukleotidokat (*spacer*eket) 1:20 arányban hígítottam (Rnáz-Dnáz mentes) desztillált vízben a ligálási reakciókban való használatra.

3.6.7 *Spacer* ligálás

A pVRL2APS plazmidot (50ng reakciónként) és a hígított, foszforilált *spacer*eket T4 ligáz enzim segítségével illesztettem össze:

“Golden Gate Assembly” (17) ligálási reakció:

<i>Spacer</i> DNS (Hibridizált oligok)	1 µl
BsaI-el emésztett plazmid	2 µl
10x T4 DNS ligáz puffer (NEB)	1 µl
T4 ligáz enzim	0,5 µl
BsaI-HFv2 (NEB)	0,5 µl
Víz (Rnáz-Dnáz mentes dH ₂ O)	<u>5,0 µl</u>
	10 µl

Thermocycler PCR program:

25 ciklus: 37 °C 3 perc, 16 °C 4 perc ; 50 °C 5 perc, 80 °C 10 perc, 16 °C ∞

3.7 Transzformálás és indukálás

A ligálási reakció után az így nyert konstruktokat DH5- α *E. Coli*-ba elektroporáltam, majd a megfelelő szelekciót követően 3-3 különálló baktérium telepet oltottam le, 100 μ g/ml APS-os LB tápoldatba, majd másnap kit segítségével (lásd 3.6.1 – Plazmid izolálás) plazmid DNS-t izoláltam belőlük. Az így nyert plazmidokat kapilláris Sanger szekvenálásnak vettem alá, így győződtem meg a ligálás sikerességéről. A szekvenáláshoz használt szekvenáló primer specifikus a régióra, ahol a ligálás történt (BsaI hasítóhely).

Indukálás:

A kapilláris szekvenálás eredménye után a kiválasztott konstruktot elektroporáltam Aci166-ba, majd a szelekció után a baktériumsejtet leoltottam 1-1ml LB+0,1%-os arabinózt tartalmazó tápoldatba. Ezt a kultúrát, illetve egy kontrol kultúrát, amely nem tartalmazza a *spacer* szekvenciát, 37 °C-on *overnight* indukáltam, majd ezt követően 0,1% arabinózt és 100 μ g/ml APS-t tartalmazó agaros lemezekre szélesztettem a kultúrákat. Az indukált kultúrákat tartalmazó lemezeket 37 °C-on *overnight* inkubáltam.

3.8 Kolónia PCR

A deléciók ellenőrzésére specifikus PCR primer part terveztem (3.6.2 – Primerek listája), amelyek a *spacerektől* 500bp-nyira helyezkednek el upstream illetve downstream. Így egy ~1100bp méretű terméket kapunk, amennyiben nem keletkezett deléció és a primerek kötődni tudnak a megfelelő genomi DNS szekvenciákhoz.

Az indukált sejteket tartalmazó lemezekről, 1mm átmérőjű kolóniákat szedtem le steril fogpiszkálókkal, majd 40 μ l steril desztillált vízbe mostam őket. Az így nyert sejtsuszpenziók feltárásához 99 °C-on 10 percig melegítettem őket *Thermocycler*-ben. A PCR reakcióhoz DreamTaq Master Mix-et (gyártó: Thermo Fisher Scientific) használtam és a gyártó utasításait követtem.

Kolónia PCR reakció:

Templát DNS	0,5 µl
Forward primer (10µM)	0,75 µl
Reverz primer (10µM)	0,75 µl
Master Mix 2x	7,5 µl
Víz (RNase-DNase free)	<u>5,5 µl</u>
	15 µl

Thermocycler PCR program:

95°C 2 perc, 30 ciklus: | 95 °C 30s ; 63,6°C 30s ; 72°C 1 perc | 72°C 5 perc, 4°C ∞

Szekvenáló primerek kolónia PCR-hez:

Amp_1_fwd CACTTACTTACGAATGCCGGTCCAAATAGT

Amp_1_rev CGGTTTAAAACATACTTACTGCCAAAATCTGCC

3.9 Spot assay (18)

A spot assay-t a bakteriofágok fertőző-képességének megállapítására alkalmaztam. 200 µl, *overnight* 37 °C-on inkubált baktérium-kultúrát szélesztettem LB+agar lemezekre, ezt követően 30 °C-on inkubáltam a lemezeket. Az így felnőtt baktériumpázsitra 10 µl, 10⁹ bakteriofágot tartalmazú fág-szuszenziót csepegtettem, a lemezeket száradás után 30 °C-on inkubáltam *overnight*. A következő napon feltisztulási zónákat, ún. plakkokat, kerestem.

4. Eredmények

4.1 MIC mérések

Első lépésként MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) méréseket végeztem, klinikailag izolált *Acinetobacter* törzseken, ami azt a legkisebb az antibiotikum koncentrációt jelenti, amely még gátolja a baktériumok növekedését.

Törzs	Gentamicin-szulfát [µg/ml]	Zeocin [µg/ml]	Apramycin-szulfát [µg/ml]
Aci4	200	>400	50
Aci72	>400	>400	50
Aci166	>400	>400	50
Aci191	>200	250	50
Aci222	>200	>250	50
Aci223	>200	>250	50

1. táblázat - Klinikailag izolált, patogén *Acinetobacter Baumannii* törzsek MIC értékei

Bizonyos izolátumok olyan magas szintű, rezisztenciát mutattak Gentamicinre illetve Zeocinra, hogy új szelekciós markert kellett keresnem (**1. táblázat**) - így esett a választás az Apramycin-Szulfátra, amely sokkal hatékonyabbnak bizonyult az *Acinetobacter* izolátumokkal szemben. Ezzel a szerrel általában nem kezelnek *Acinetobacter* fertőzött betegeket a klinikumban, ez megmagyarázza a viszonylag alacsony MIC értékeket.

4.2 Fág rezisztencia felmérése

A másik szempont, aminek meg kell felelnie a kiválasztott baktériumtörzseknek, hogy ne rendelkezzenek széleskörű fágrezisztenciával, így valószínűleg a profág-mentes törzs képes lesz terapeutikus bakteriofágok termelésére is.

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16
Aci4																
Aci72																
Aci166																
Aci191																
Aci222																
Aci223																

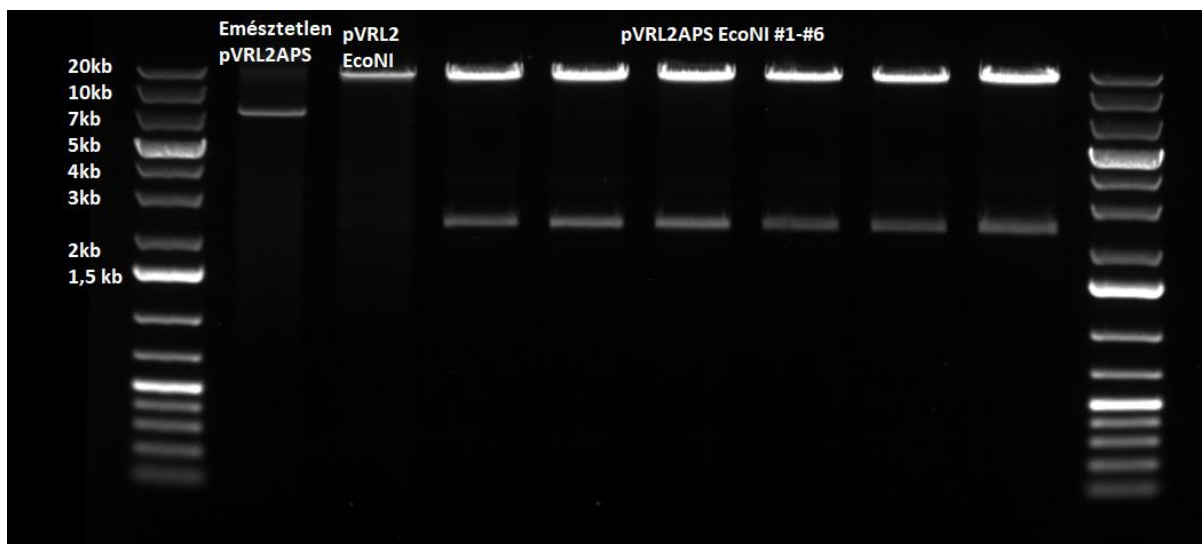
2. táblázat - az *Acinetobacter* törzsek fág-rezisztenciájának felmérése *Spot Assay*-vel

piros = rezisztens, zöld = érzékeny, Eszenyi Bálint (HUN-REN SZBK Biokémia intézet) eredményei

A *Spot Assay* során, agar-lemezen lévő baktériumpázsitra csepegtetünk fág szuszpenziót, majd plakkokat, feltisztulási zónákat keresünk. A kísérlet során 16 különböző bakteriofág szuszpenziót teszteltünk 6 baktériumtörzssel szemben (**2. táblázat**). A fenti eredmények alapján az Aci166 törzset választottuk ki, mivel szenzitívnek bizonyult több bakteriofággal szemben is, illetve ez a törzs mutatott egyedüli szenzitivitást az F1 fággal szemben. Ezáltal az Aci166 remélhetőleg képes lesz felszaporítani a vizsgálatra használt bakteriofágokat.

4.3 Új konstrukt létrehozása

A könnyebb szelekció érdekében indokolttá vált, hogy létrehozzak egy új konstruktot, amely APS rezisztencia gént hordoz magában. A kész konstrukt felszorzósításához, illetve teszteléséhez, elektroporálással juttattam be DH5- α *E. coli* kompetens sejtekbe, majd plazmidot izoláltam a baktérium kultúrából (3.6 – Plazmid izolálás és konstruktok létrehozása).



7. ábra - Próbaemésztés EcoNI restrikciós endonukleázzal

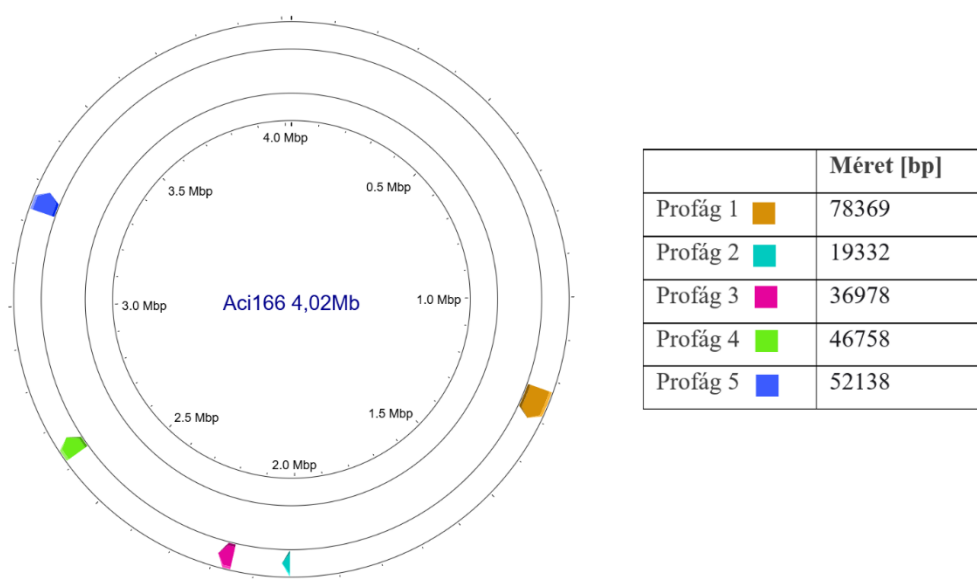
1. Minta: emésztetlen pVRL2APS plazmid
2. Minta : linearizált pVRL2 vektor (EcoNI emésztés)
- 3.-8. Minta: EcoNI-el emésztett pVRL2APS plazmid-izolátumok

EcoNI restrikciós enzimmal végeztem próbaemésztést; az enzim az Apramycines konstruktot (14,4 kb) 2 helyen hasítja, ami egy 12,1 kb-os és egy 2,3 kb-os fragmenst eredményez. Az emésztést 2 órán keresztül végeztem 37 °C-on *Thermocycler*ben. Az így nyert DNS-lizátumokat, illetve ellenőrzésként egy emésztetlen pVRL2APS konstruktot és egy EcoNI-el emésztett pVRL2 vektort, 0,8%-os agaróz gélen futtattam meg. Az első, emésztetlen mintánál megfigyelhetjük, hogy sokkal kisebbnek tűnik a kompakt szerkezete miatt, illetve halványabban megjelenik a plazmid relaxált formája is. Az emésztett pVRL2 vektort az enzim 1 helyen hasítja, így az linearizált formát vesz fel, egyetlen sávban jelenik meg, mérete 13,9 kb. Az emésztett pVRL2APS minták esetén megfigyelhető 2 sáv: ~12 kb, ~2,5 kb - tükrözi a várakozásaimnak megfelelő eredményt, így biztos, hogy a kívánt plazmidot izoláltam (7. ábra). A megfelelő mennyiségről és minőségről spektrofotometriás méréssel győződtem meg. A pVRL2APS izolátumok közül a 2-es számút Illumina szekvenálásra küldtük. A szekvenálásból kapott adatok

alapján összeszerelt plazmid szekvenciát BLASTn szekvenciaillesztéssel hasonlítottam össze a tervezett plazmidtérkép szekvenciájával szemben, ami 100%-os egyezést mutatott, tehát sikeresen előállítottam a kívánt konstruktot. A további munka során ezzel (pVRL2APS#2) a plazmiddal dolgoztam.

4.4 Profágok azonosítása

A kiválasztott Aci166 törzs *nanopore* szekvenálása után, a NMDC (National Microbiome Data Collaborative) geNomad szoftverének (6) segítségével 5 profágot azonosítottam az Aci166 genomjában (8. ábra). Az 1-es profág megcélzására 2 *spacer* (3.6.3. – *Spacer* tervezés) terveztem, amelyek a célzott genomi régió forward és reverz szálainak degradálására szolgálnak, ezáltal deléciót előidézve.



8. ábra – Aci 166 genom térképe és a benne található profágok

A *spacer* szekvenciával ligált konstruktot kompetens Aci 166 sejtekbe elektroporáltam, a transzformánsokat tartalmazó lemezekről 4 egyéni telepet oltottam le. A kultúrákat *overnight* indukáltam 0,1% arabinóz és 100 µg/ml APS jelenlétében. A kultúrákat másnap arabinóz és APS tartalmú LB+agar lemezekre szélesztettem, amelyekről 2-2 egyéni telepet teszteltem kolónia PCR reakció keretében.

4.5 Deléciók ellenőrzése

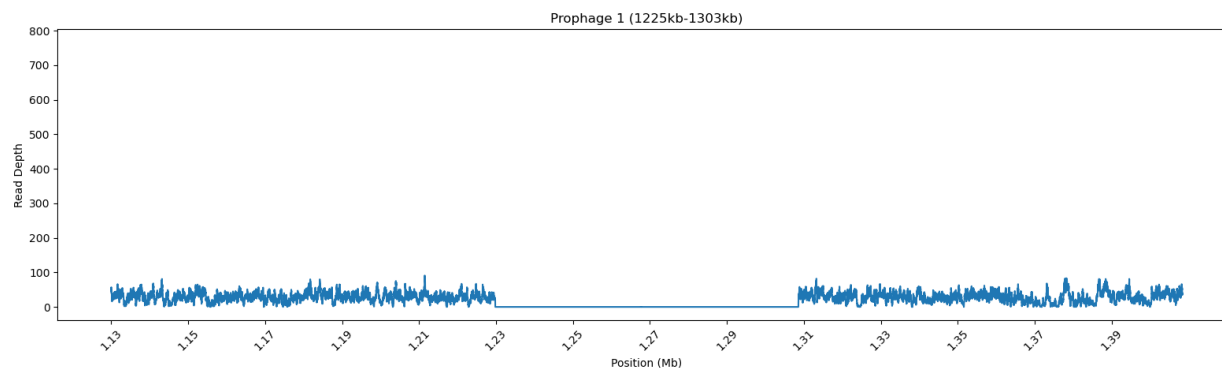
A kolónia PCR reakció keretében azokat a kolóniákat teszteltem, amelyekben az 1-es profágot céloztam meg, 1 *spacer* szekvenciával. A PCR reakció akkor ad terméket, ha feltehetőleg nem történt deléció, a célzott szekvencia érintetlen maradt, így a primerek képesek hibridizálni a templáthoz. Ilyenkor egy ~1100 bp méretű terméket láthatunk a gélen, amely magában foglalja a célszekvenciát (**9. ábra**). Az 1-es és 2-es telepből nyert templát esetében, nem látunk terméket, ez utal arra, hogy sikeresen hoztunk létre deléciót. Ellenőrzésként kétféle baktérium telepet használtam, az egyikbe olyan konstruktot elektroporáltam, (Kontroll#1) amelyet nem indukáltam, de tartalmazott *spacer* szekvenciát, a másikba (Kontroll#2) pedig egy olyan vektort, amiben nem volt ligált *spacer* szekvencia.



9. ábra – Kolónia PCR Aci166 sejteken, a CRISPR-Cas3 rendszer indukciója után

Minta#1-8 – egyedi, indukált baktérium kultúrából származó telepek, amelyek tartalmazzák az 1. Profágot célzó *spacer* szekvenciát, így feltehetőleg potenciális deléciókat tartalmaznak.

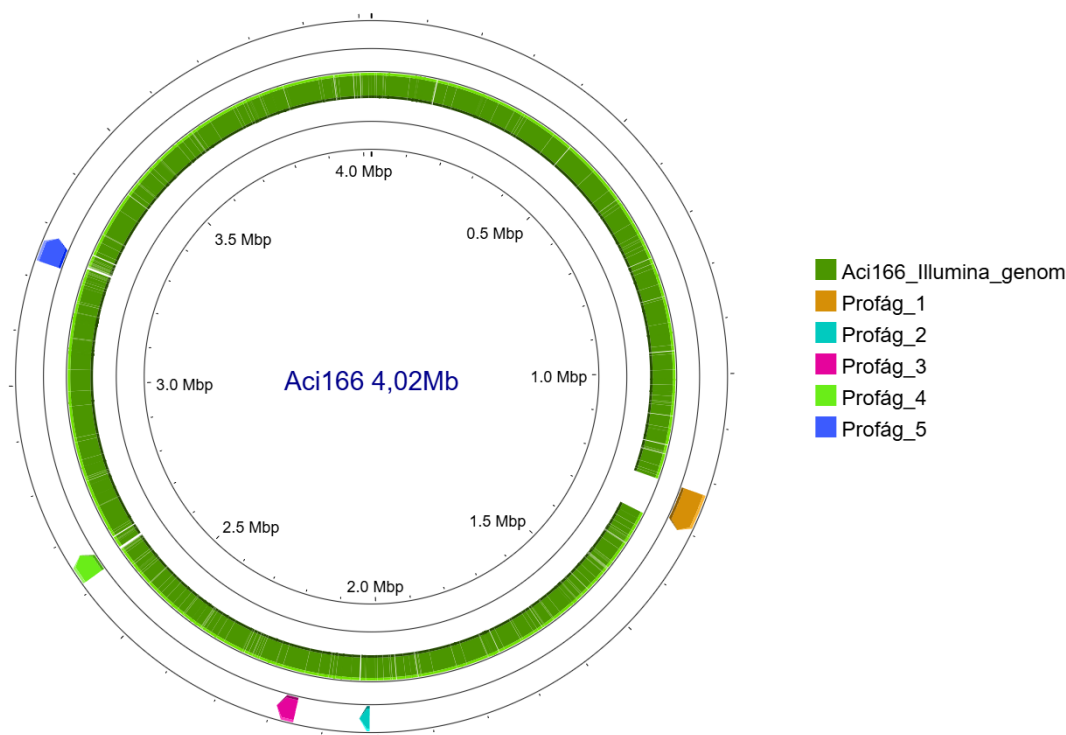
A potenciális deléciókat tartalmazó baktériumokból genomi DNS-t izoláltam (Norgen Biotek Corp – Genomic DNA Isolation Kit) és teljes genom szekvenálásra küldtem. Ezáltal meggyőződhetünk a deléciók létrejöttéről, megállapíthatjuk a pontos méretüket, illetve, hogy milyen géneket érintenek. A szekvenálásból származó adatokat az eredeti nanopore szekvenciára illesztettük (**10. ábra**). Az 1-es profág genomi pozíciójára nem térképeződtek *read*-ek, így biztosak lehetünk a kívánt szakasz sikeres deléciójában.



10. ábra – Az 1-es profág deléciója Aci166 genomjában (Minta#1)

5. Diszkusszió

Az MDR baktériumokkal szemben folyó küzdelem egyre nehezebbé válik. Az egyik módszer, amivel felvehetjük a harcot az ellenálló kórokozókkal szemben, a bakteriofág terápia lehet (19). Azonban a fágterápia útjában jelenleg több akadály is áll: a profágok potenciális indukciója a gazdasejtekben olyan heterogén fág-keveréket eredményezhet amely összetétele nem teljesen ismert és éppen ezért nem ideális terapeutikus célokra. Másrészt nem áll rendelkezésre elég adat és klinikai teszt a bakteriofágokkal kapcsolatban, hogy a gyógyászati használatuk legitim és elismert kezeléssé váljon. E célból meg kell értenünk a profág régiók alkalmazkodásban és evolúcióban betöltött szerepét, illetve olyan bakteriofágokat kell létrehoznunk, amelyek, miközben hatékonyan pusztítják el a baktériumokat, megfelelnek minőségi és biztonsági elvárásoknak is. A közelmúltban, a CRISPR-Cas3 genomszerkesztési módszerrel sikeresen hoztak létre genom-redukált baktériumtörzseket (20), amelyek azt bizonyítják, hogy képesek vagyunk nagyméretű szakaszok hatékony eltávolítására, ezáltal kiüthetünk nagyméretű profág régiókat is. A profágok ilyen módon történő eltávolításával fény derülhet a pontos szerepükre.



11. ábra – Aci 166 genomja, és az erre térképezett deléció hordozó, profág-redukált Aci166 genomja

A kísérleteink során sikeresen létrehoztunk egy 78 kb méretű genomi deléciót, amely demonstrálja a CRISPR-Cas3 rendszer hatékony működését; egyetlen *spacer* szekvencia segítségével a vizsgált esetek 25 %-ában (2/8) sikeresen eltávolítottuk a célzott profágot. Az *off-target* hatások vizsgálatára a deléciót tartalmazó gDNS minták szekvenciáját az érintetlen Ac166 genomra (*nanopore* szekvenálásból származó szekvencia) illesztettük (**11. ábra**). Az 1-es profágban található inszerciós elemeket illetve egyéb kis méretű ismétlődő szekvenciákat, melyek mérete 30-1100bp közöttiek voltak és az érintett profág szakasz 2,1 %-t tették ki, eltávolítottuk. Ez a lépés azért szükséges, mert ezek a szakaszok a genom más részeiben is jelen vannak, és a térképezéskor ezek a kontigok a deléció helyére is térképeződnek, ezáltal nem valóságos eredményt kapunk.

A profágok eltávolításának hatékonyabb és gyorsabb módját jelentené az összes profág egyidejűleg történő megcélzása és eltávolítása, azonban az általunk használt pVRL2APS vektor csupán egyetlen *spacer* szekvencia befogadására, ezáltal egyidejűleg csak egy régió megcélzására alkalmas. A közelmúltban több másik CRISPR rendszerrel is elérték az egyidejűleg történő multiplex genomszerkesztést (21), így a jövőbeli céljaink közé tartozik az is, hogy az általunk használt eszköz is képes legyen erre a feladatra. Ezt a célt a jelenlegi ismereteink szerint kétféle módon érhetnénk el: a konstruktban található *CRISPR-array* módosításával, vagy egy független dsDNS alapú CRISPR-*array*-vel, amelyről egyszerre több *guide* RNS-t expresszálnak.

A jövőben folytatni fogjuk a fennmaradó profágok eltávolítását, illetve a profágok funkciójának karakterizálását, ezáltal egy teljesen profágmentes gazdasejtet létrehozva, amely alkalmas lehet majd homogén, terapeutikus bakteriofágok termelésére is.

6. Összefoglalás

Munkánk során sikeresen létrehoztunk egy olyan konstruktot, amely segítségével genomi deléciókat generáltunk egy MDR *Acinetobacter baumannii* törzsben, eltávolítva az azonosított profágok egyikét. Ezzel a módszerrel létrehozott, teljesen profág-mentes baktériumok alkalmas gazdasejtek lehetnek, terapeutikus bakteriofágok termelésére. Ezen túl a profág-mentes baktériumok révén jobban megérthetjük a baktériumok evolúcióját és adaptációját, illetve új utakat nyithatunk meg az antibiotikum rezisztencia leküzdésére. A fágrezisztencia terén történt változások felmérésére, illetve a fennmaradó profágok karakterizálására további kísérletek szükségesek. A jövőben ezt az eljárást kiterjeszthetjük más patogén baktériumokra is, amelyek genomjának szintén részét képezik a genomi szigetek (22), így jobban megismerhetjük őket és hatékonyabb kezeléseket fejleszthetünk ki. Reményeink szerint a munkánk hozzájárul majd ahhoz, hogy a bakteriofág-terápia a jövő ígéretes gyógymódja lehessen, amellyel milliók életét menthetjük meg.

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet nyilvánítani a témavezetőmnek: **Dr. Csörgő Bálintnak** (HUN-REN SZBK Biokémia Intézet), illetve a belső témavezetőmnek: **Dr. Bodai Lászlónak** (SZTE TTIK Biológia Intézet, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék)

Továbbá köszönöm a segítségét és hozzájárulását:

Dr. Kintses Bálintnak (HUN-REN SZBK Biokémiai intézet, Transzlációs Mikrobiológiai csoport)

Dr. Balogh Dávidnak (HUN-REN SZBK Biokémiai Intézet, Lendület Gésebészeti Módszertan csoport)

Eszenyi Bálintnak (HUN-REN SZBK Biokémiai Intézet, Lendület Gésebészeti Módszertan csoport)

Kovács Nándornak (HUN-REN SZBK Biokémiai Intézet, Lendület Gésebészeti Módszertan csoport)

Dr. Apjok Gábornak (HUN-REN SZBK Biokémiai Intézet, Transzlációs Mikrobiológiai csoport)

illetve **Dr. Sipos László Attilának** (HUN-REN SZBK Genetika Intézet)

8. Irodalomjegyzék

1. Mulani MS. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: a Review. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10(539).
2. C. J. Murray. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. *The Lancet*. 2022;399(10325):629-655.
3. de Kraker MEA. Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? *PLOS Medicine*. 2016;13(11): e1002184.
doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002184>
4. Comeau AM. Exploring the prokaryotic virosphere. *Research in Microbiology*. 2008;159(5):306-313.
5. Fortier LC. Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence*. 2013;4(5):354-365.
6. Camargo AP. Identification of mobile genetic elements with geNomad. *Nature Biotechnology*. 2023;42(1303–1312):1-10.
7. Summers WC. The strange history of phage therapy. *Bacteriophage*. 2012;2(2):130-133.
8. Mohr JF. Past, Present, and Future of Antibacterial Economics: Increasing Bacterial Resistance, Limited Antibiotic Pipeline, and Societal Implications. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2016;37(1):71-84.
9. Liu S. Phages against Pathogenic Bacterial Biofilms and Biofilm-Based Infections: A Review. *Pharmaceutics*. 2022;14(2):427.
10. Naureen Z. Comparison between American and European legislation in the therapeutical and alimentary bacteriophage usage. *Acta Bio Medica: Atenei Parmensis*. 2020;91(Suppl 13): e2020023.
11. Bretaudeau L. Good Manufacturing Practice (GMP) Compliance for Phage Therapy Medicinal Products. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11.
12. Makarova KS. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*. 2019;18(2):67-83.
13. Csörgő B. A compact Cascade–Cas3 system for targeted genome engineering. *Nature Methods*. 2020;17(1183-1190):1-8.
14. Morisaka H. CRISPR-Cas3 induces broad and unidirectional genome editing in human

- cells. *Nature Communications*. 2019;10(1):5302.
15. Lucidi M. New Shuttle Vectors for Gene Cloning and Expression in Multidrug-Resistant *Acinetobacter* Species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2018;62(4).
 16. Daruka L. ESKAPE pathogens rapidly develop resistance against antibiotics in development in vitro. *Nature Microbiology*. Published online January 13, 2025.
 17. Wang Y. A Highly Efficient CRISPR-Cas9-Based Genome Engineering Platform in *Acinetobacter baumannii* to Understand the H₂O₂-Sensing Mechanism of OxyR. *Cell Chemical Biology*. 2019;26(12):1732-1742.e5.
 18. Khan Mirzaei M. Isolation of Phages for Phage Therapy: A Comparison of Spot Tests and Efficiency of Plating Analyses for Determination of Host Range and Efficacy. *PLOS ONE*. 2015;10(3): e0118557.
 19. Liu K. Bacteriophage therapy for drug-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2024;14.
doi:<https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1336821>
 20. Ma S. Bacterial genome reduction for optimal chassis of synthetic biology: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2024;44(4):660-673.
 21. McCarty NS. Multiplexed CRISPR technologies for gene editing and transcriptional regulation. *Nature Communications*. 2020;11(1).
 22. Levesque RC. Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the Liverpool Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Research*. 2008;19(1):12-23.