



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



***E. coli*'de Shigatoksin üretiminden sorumlu STX genlerinin ve CRISPR
dizilerinin analizi**

Yüksek Lisans Tezi

Doğukan GÜL

Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2019

TC. EGE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***E. coli*'de Shigatoksin üretiminden sorumlu STX genlerinin ve CRISPR
dizilerinin analizi**

Doğukan GÜL

Danışman: Prof. Dr. İhsan YAŞA

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Yüksek Lisans Programı

İZMİR
2019

Doğukan Gül tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “*E. coli*’de Shigatoksin üretiminden sorumlu STX genlerinin ve CRISPR dizilerinin analizi” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 12.09.2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı

: Prof. Dr. İhsan Yaşa

Raportör Üye

: Doç. Dr. Hüsnügül Yılmaz Atay

Üye

: Doç. Dr. Esra Ersoy Ömeroğlu

İmza



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*E. coli*’de Shigatoksin üretiminden sorumlu STX genlerinin ve CRISPR dizilerinin analizi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

12 / 09 / 2019



Doğukan GÜL

ÖZET

***E. coli*'de Shigatoksin üretiminden sorumlu STX genlerinin ve CRISPR dizilerinin analizi**

GÜL, Doğukan

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. İhsan YAŞA

Eylül, 2019, 68 Sayfa

Shiga toksin, *E. coli* O157:H7 enfeksiyonlarının patojenitesinde önemli bir faktördür. *E. coli* O157:H7 insan ve hayvanlarda gıda kaynaklı hastalıklara neden olan önemli bir bakteriyel patojendir. Shigatoksin üreten *E. coli* (STEC) grubunda bulunan *E. coli*'lerin çoğu *Stx* geni tarafından kodlanan shiga benzeri toksin üreticisidir. Sığırlar ve tavuklar bu grup bakterilerin ana yayılım rezervuarıdır. Shigatoksin üreten *E. coli* O157:H7 insanlarda, hemorajik kolitis (HC), trombotik trombositopenik purpura (TTP) ve hemolitik üremik sendrom (HUS) olarak adlandırılan ve ölümle sonuçlanabilen hastalıklara neden olur. Shiga toksinler AB5 proteinlerdir. Bu proteinler 5 B alt birimine bağlı bir aktif A alt biriminden oluşmuşlardır. Bu alt birimlerin temel görevi hedef hücrelerin özel glikolipid bölgelerine bağlanmaktır. Shiga toksinlerin RNA-N glikosidaz aktivitesi 60S ribozomal alt birimlerin inaktivasyonuna neden olduğu için protein sentezinin de durmasına yol açar.

CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat–CRISPR associated) sistemi bakterilerde ve arkealarda virüs plazmid gibi genetik elementlere karşı direnç sağlayan RNA temelli adaptif immün sistem olarak tanımlanmıştır. 1987 yılında CRISPR repeat ve spacer dizileri ilk keşfedildiğinde bakterideki rolü tam olarak bilinememekteydi. Yapılan çalışmaların artmasıyla 2007 yılında CRISPR-Cas sisteminin virüs ve plazmidlere karşı direnç mekanizması

olduğu çözümlenmiştir. CRISPR sisteminde bakterilerde farklılık gösteren yaklaşık 45 nükleaz (cas) enzimini tanımlanmıştır. Bu cas enzimleri yaklaşık 25-30 bp'lik spesifik DNA bölgesini tanımlayarak nükleaz aktivitesi göstermekte ve hedef DNAyı tanımlayarak kesmektedir. Bakterilerin fajlara karşı savunma mekanizması olan restriksiyon enzimleri genetik mühendisliğinin önünü açmıştır. 2013 yılında çalışmalar insan ve ökaryot genomunda cas9-RNA aracılı spesifik genom mühendisliğine yönelmiştir. Bu çalışmada gıda kaynaklı *E coli* O157:H7'ler tespit edilmiş ve *stx* genlerinin çeşitliliğine bakılarak ve savunmada rol alan CRISPR1 ve CRISPR 2 bölgeleri tespit edilerek shigatoksin üretiminin regülasyonu için hedef genlerin incelenmesini içermektedir.

Anahtar kelimeler: *E coli* O157:H7, CRISPR, Shigatoksin, Virüs, İmmün sistem

ABSTRACT**Analysis of CRISPR sequences and STX genes responsible for Shigatoxin production in *E. coli***

GÜL, Doğukan

Msc in Biology Department

Supervisor: Prof. Dr. İhsan YAŞA

September, 2019, 68 Paper

Shiga toxin is an important factor in the pathogenicity of *E. coli* O157: H7 diseases. *E. coli* O157:H7 is an important bacterial pathogen in humans and animals causing disease in the food sector. It is a producer of shiga-like toxins encoded in the Stx gene with *E. coli* found in STEC. Cattle and chickens are the main propagation reservoirs of this group of bacteria. Shigatoxin-producing *E. coli* O157: H7 causes diseases in humans called hemorrhagic colitis (HC), thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) and hemolytic uremic syndrome (HUS). Shiga toxins are AB5 proteins. These proteins are composed of an active A subunit linked to the 5 B subunit. These subunits are directed to specific glycolipid regions of the basic targeting targets. The RNA-N glycosidase activity of Shiga toxins leads to inactivation of 60S ribosomal subunits, leading to a halt in protein synthesis.

CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat-CRISPR associated) system is defined as an RNA-based adaptive immune system that provides resistance to genetic elements such as virüs and plasmids in bacteria and archaea. When CRISPR repeat and spacer sequences were first discovered in 1987, their role in bacteria was not fully understood. In 2007, CRISPR-Cas system was found to be a resistance mechanism against viruses and plasmids. Approximately 45 nuclease (cas) enzymes have been identified in the CRISPR system. These cas enzymes show nuclease activity by identifying a specific DNA region of about 25-30 bp and identifying and truncating the target DNA. Restriction enzymes, the defense mechanism of bacteria against phages, have paved the way for genetic engineering. In 2013, studies focused on cas9-RNA-mediated specific genome engineering in the human and eukaryotic genome. In this study, food-borne *E. coli* O157: H7s were

identified and examined by looking at the diversity of stx genes and identifying the CRISPR1 and CRISPR 2 regions involved in the defense and examining target genes for the regulation of shiga toxin production.

Key words: *E coli* O157:H7, CRISPR, Shiga toxin, Virus, Immune system



ÖNSÖZ

Bakteriler hayatımızın her anında ve tüm çevremizde oldukça yoğun olarak bulunmaktadır. Bazı bakteriler insanlar için yararlı olurken bazılarında insanlar için ölümcül olabilecek kadar tehlikeli olmaktadır. Hayatımızı bir çok yönüyle etkileyen bu gözle görülmeyen organizmaları tespit etmek yakından tanımak bende büyük bir merak uyandırmıştı. Lisans öğrenimim boyunca bu bakterileri yakından tanımak için çaba sarfetmemin yanında değişik özelliklere sahip ve hayatımızı daha çok etkileyen etkileyen bakteriler ilgimi daha çok çekmişti. Örnek olarak legümen bitkilerin kökünde simbiyotik olarak yaşayan ve toprağa fosfat kazandıran *Rhizobium* bakterisi ve insanlara genellikle gıda kaynaklı yollarla bulaşan ve ölümlere yol açabilen *E. Coli* O157:H7 gibi. Her bir bakterinin kendine has olan özellikleri kullanılarak insanlar için yararlı olan bileşenlerin üretilmesi günümüzdeki hastalıklara tedavi yönteminin ana kaynağıdır. Bu doğanın eşsiz çeşitliliği bizlere birçok yeni yöntem ve yeni buluşları her zaman sağlayacağına inanarak yeni araştırmalar yapmaya başladım. Yüksek lisansa yine mikrobiyoloji alanında Prof. Dr. İhsan YAŞA hocam ile başladığım zaman antibiyotiklerin etki tepki mekanizmaları ile ilgili araştırmalar yapıyordum. Hocamın bana tavsiyesi üzerine hiç duymadığım bir sistem olan CRISPR-Cas savunma sistemini araştırmaya başladım.

Doğada tüm canlılar arasında büyük bir rekabet ve savaş vardır. Bu savaşa gözle göremediğimiz varlıklar da dahildir. Bu bakterilerin arasında savaş ayrıca virüslere yabancı genetik elementlere karşı da gerçekleşmektedir. Bu ikili arasındaki rekabetin bakteriler için en büyük silahı CRISPR-Cas sistemidir. Bu sistem son yıllarda bulunmuş olup rekabette ne kadar önemli olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Ben bu savunma sistemini ilk araştırdığımda tıpkı insanlardaki savunma mekanizmasına benzetmiştim. İnsanlarda vücuda zararlı bakteriler girdiğinde savunmada rol olan hücreler tarafından tanımlanarak yine hücreler tarafından etkisiz hale getirilmektedir. CRISPR- Cas sistemide aynı mantıkla çalışarak mikroorganizma içine girdiğinde çeşitli enzimler tarafında yabancı DNA ve ya viral DNA tanımlanarak yine çeşitli enzimler vasıtasıyla bu hedef DNA'lar etkisiz hale getirilmektedir.

Gıda kaynaklı enfeksiyonların en tehlikelisi olan *E coli* O157:H7 enfeksiyonu en tehlikeli bileşenin shigatoksin olduğunu araştırmalar ile öğrendiğimde büyük bir merak sarmıştı ve Yüksek lisan Tez Danışman hocam Sayın Prof. Dr. İhsan YAŞA'nın tavsiyesi ile *E coli* O157:H7 bakterisi ve ürettiği shigatoksin ile çalışmalar yapmaya başladım ve İçerdiği CRISPR-Cas sistemi ile ilgili çalışmalar gerçekleştirdik. Umuyorum ki bu yeni nesil CRISPR-cas aracılı genom düzenleme için yapılacak altyapı araştırmaları ileride *E coli* O157:H7 enfeksiyonları için önleyici bir yöntem sağlar.



İÇİNDEKİLERSayfa

| | |
|---|------|
| ÖZET | vii |
| ABSTRACT | ix |
| ÖNSÖZ | xi |
| İÇİNDEKİLER | xiii |
| TABLOLAR DİZİNİ..... | xv |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | xvi |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. LİTERATÜR ÖZETİ..... | 2 |
| 2.1 <i>Escherichia coli</i> ve Tarihçesi..... | 2 |
| 2.2. <i>E. coli</i> Nerede Görülür? | 4 |
| 2.3. <i>E.coli</i> O157 H7'nin Neden Olduğu Hastalıklar | 5 |
| 2.4 Shigatoksin Üreten <i>E. coli</i> | 6 |
| 2.4.1 Shigatoksin Tipleri | 7 |
| 2.4.2 STX Etki mekanizması..... | 8 |
| 2.4.3 <i>E. Coli</i> O157:H7 ve Gıdalar | 9 |
| 2.5 CRISPR sistemi | 10 |
| 2.5.1. CRISPR'ın Tarihçesi..... | 12 |
| 2.5.2 CRISPR Sistemlerin Temel Bileşenleri | 14 |
| 2.5.3 CRISPR-Cas sisteminin sınıflandırılması | 20 |
| 2.5.3 Cas Protein Aileleri | 21 |
| 2.5.4 CRISPR-Cas Çeşitliliği | 26 |
| 3. MATERYAL VE METOD..... | 42 |
| 3.1 MATERYAL | 42 |

| | |
|---|----|
| 3.1.1 Besiyerler ve Biyokimyasal Testler..... | 42 |
| 3.1.2 Kullanılan Cihazlar..... | 45 |
| 3.2 METOT..... | 46 |
| 3.2.1. Gıdalardan <i>E.coli</i> O157:H7 aranması..... | 46 |
| 3.2.2. DNA İzolasyon Aşaması..... | 48 |
| 3.2.3 PCR aşaması..... | 48 |
| 3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi..... | 50 |
| 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA..... | 51 |
| 4.1 Gıdalardan <i>E. coli</i> O157:H7 İzolasyonu..... | 51 |
| 4.2. DNA İzolasyonu:..... | 53 |
| 4.3. PCR..... | 53 |
| 4.3.1 Stx1 ve Stx2 Gen Bölgelerinin Araştırılması..... | 53 |
| 4.3.2. CRSPR1, CRISPR2a ve CRISPR2b bölgeleri için PCR..... | 56 |
| 4.4. Dizi Analizi:..... | 57 |
| 4.5. Tartışma..... | 58 |
| KAYNAKLAR..... | 64 |
| TEŞEKKÜR..... | 73 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 74 |

TABLolar DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Tablo 1 2009/6 Tebliğ Nolu Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğine Limitler..... | 10 |
| Tablo 2 hedef gen bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılan primer çiftleri | 44 |
| Tablo 3 <i>Stx1</i> ve <i>stx2</i> gen bölgeleri için PCR koşulları Scheutz et al., 2012..... | 49 |
| Tablo 4 Elde edilen İzolatlar ve gıda kaynağı | 52 |
| Tablo 5 Elde edilen PCR sonuçlarına Göre <i>Stx</i> çeşitliliği | 54 |
| Tablo 6 STX1, STX2, CRSPR1, CRISPR2a ve CRISPR2b bölgeleri için pcr reaksiyon karışımı..... | 54 |
| Tablo 7 CRSPR1, CRISPR2a ve CRISPR2b genleri için PCR sonuçları | 56 |
| Tablo 8 <i>Stx1</i> ve <i>Stx2</i> hedef oluşturulabilecek bölgeler | 61 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Şekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| Şekil 1 Bir CRISPR lokusu..... | 15 |
| Şekil 2 Yeni bir spaceR'ın CRISPR lokusuna katıldığı bölge..... | 28 |
| Şekil 3 CRISPR-Cas tip I-E sistemlerinin girişim aşamalarının şematik gösterimi ... | 38 |
| Şekil 4 B1 izolatından izole edilen E coli O157:H7'nin CT-Smac agar üzerindeki görüntüsü..... | 52 |
| Şekil 5 A1-A6 Stx 1 pozitif bant görüntüleri..... | 55 |
| Şekil 6 A1-A6 Stx 2 pozitif bant görüntüleri..... | 55 |
| Şekil 7 Sırasıyla Stx1 B1-B7, Stx2 B1-B7 oluşan bantlar..... | 55 |
| Şekil 8 Sırasıyla B1-B7 izolatların CRISPR1, CRISPR2a ve CRISPR2b gen bölgelerin agaroz jel görüntüsü..... | 57 |
| Şekil 9 Stx1 blast sonucu | 58 |
| Şekil 10 Stx2 blast sonucu | 58 |
| Şekil 11 CRISPR1 bölgesi R ve S analizi..... | 62 |
| Şekil 12 CRISPR1 bölgesi cas protein analizi..... | 63 |
| Şekil 13 CRISPR1 Spacer bölgesi bakımından benzerlik | 63 |
| Şekil 14 CRISPR2b R ve S blast sonucu | 63 |

KISALTMALARKısaltmalarAçıklama

DNA

Deoksiribonükleik Asit

RNA

Ribonükleik Asit

CAS

Crispr İlişkili Genler

PCR

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

cRNA

Crispr RNA

NCBI

National Center for Biotechnology Information

CRISPR

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic
Repeats



1. GİRİŞ

Shiga toksin üreticisi *E. coli* (STEC) insan ve hayvanlarda gıda kaynaklı hastalıklara neden olan önemli bir bakteriyel patojendir. EHEC ve STEC grubunda bulunan *E. coli*' lerin çoğu *Stx* geni tarafından kodlanan shiga benzeri toksin üreticisidir. Sığırlar ve tavuklar bu grup bakterilerin ana yayılım kaynaklarıdır. Çevreye dışkıyla yayılıp insanlara ise bu dışkıyla kontamine olmuş su ve gıdalar yoluyla geçerler. Gıdalarla bulaşma sığır ve tavuk gaitasının karkaslara, su yoluyla bulaşma ise işletmelerde hijyenik koşulların yetersizliğinden kaynaklanmaktadır.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 *Escherichia coli* ve Tarihçesi

E. coli 1885 yılında Alman bakteriyolog Theodor Escherich tarafından insan bağırsağında keşfedilmiştir. 1950 yılından beri bilimsel araştırmalarda sıklıkla kullanılan bakterilerden biridir. Kısa sürede ve kompleks olmayan besiyerlerinde kolay üreyebilmesinden dolayı moleküler çalışmalarda bir model organizma olarak kullanılmıştır. Normalde insan ve hayvan bağırsaklarının doğal florasında yer alan bir bakteri olmasına karşın daha sonralarda insanlarda ishallere, septisemilere, üriner sistem enfeksiyonlarına, hemolitik üremik sendromu hastalığı (HUS) ve menenjit gibi hastalıklara yol açtığı ortaya çıkmıştır.

Escherichia genusunda 1985'te Farmer ve arkadaşları ilk yeni türü *E. fergusonii*' yi açıklamıştır (Farmer et al., 1985). 2003' te Huys ve koleji arkadaşları ikinci yeni türü *E. albertii*' yi açıklamıştır (Huys et al.,2003). Hyma ve arkadaşları *E. albertii* ve *E. coli* arasındaki evrimsel ilişkiyi açıklamış ve onların ishal patojeni olduklarını tanımlamıştır. İsimlendirilmiş diğer tipler *Shigella*' nın diğer isimlendirilmiş türleri ve serotiplerinin tümünün *E. coli*' nin üyeleri olduğunu açıklamıştır.(Simms and Kim, 2011). Örnek olarak *E. coli* türleri: *E. blattae*, *E. vulneri* and *E. hermannii* verilebilir. Ama bu türlerin strainleri sadece diğer *Escherichia* ve geçersiz genus üyeleriyle uzaktan ilişkilidir (Walk et al., 2009).

Salmonella, *E. coli*, *Shigella* en iyi bilinen bağırsak kökenli fakültatif bakterilerdir. 1898 yılında *Shigella dysenteriae*' nin bakteriyel dizanteri etkeni olduğunun bulunmasıyla birlikte *E. coli* O157:H7 üzerine yapılan ilk bilimsel çalışmaların temeli atılmıştır. , *E. coli*'nin neden olduğu HUS 1955 yılında mikroangiopatik hemolitik anemi, akut renal yetmezlik ve thrombocytopenia olarak tanımlanmıştır. 1972 yılında Keusch ve arkadaşları shiga toksinlerin kanlı ishale neden olduğunu bulmuşlardır. 1982 yılında fast food servisi yapılan işletmelerde hamburger kaynaklı ciddi hemorajik kolitis olgularına rastlanmıştır ve böylelikle *E. coli*' nin insanlar için patojen olduğu tam anlamıyla onaylanmıştır.

Günümüzde yaklaşık 160 serotipi bulunan *E. coli* O, H ve K antijenlerine sahiptir. O antijeni DNA bakımından *Shigella*' ya çok benzemektedir. Patojenite ve virülensin belirlenmesinde serotipler yerine daha çok serotiplerde bulunan adhezin ve toksin genlerinin varlığına bakılır. Bu genlerin görevleri genelde hücreye tutunma, toksin üretimi, ve hücreyi infekte etmektir ve bu genler bir *E. coli* türünden diğerine geçebilen genelde, plazmidler, fajlar, ve büyük kromozomlarda bulunan genlerdir. Bu genler dikkate alınarak *E. coli* kendi içinde patojenik tiplere ayrılır ve bunlara virotip denir.

Bu zamana kadar belirlenmiş toplamda 7 virotip bulunmaktadır.

1. Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC)
2. Enteroagregatif *E. coli* (EaggEC)
3. Enteropatojenik *E. coli* (EPEC)
4. Enterohemorajik *E. coli* (EHEC)
5. Enteroinvazif *E. coli* (EIEC)
6. Diffuz adherent *E. coli* (DAEC)
7. Hücreler için lethal toksin üreten *E. coli* (CDT)

ETEC konakçı spesifik bazı adhezyon faktörleri sayesinde ince bağırsakta bulunup ishale neden olmaktadır. Bu tip *E. coli*' ler ısıya dayanıklı (heat stable=HL) ve ısıya dayanıksız (heat lable=HL) olmak üzere iki tip toksin üretmektedirler. Genelde insanlarda hastalık etkeni olarak rastlanmalarına karşın sığırlarda da etken olarak bulunmuştur.

EaggEC çocuklarda ishale neden olan toksin salgılayan tipidir. ETEC' e benzerler ancak mukozal hücrelerden olan villusları değiştirmeleriyle yapısal farklılığa neden olurlar ve bu yanıyla ETEC' den ayrılırlar. Bu duruma attaching-effacing=A-E denir. Hücreleri istila etmesi sonucu yangı oluşmaktadır.

EHEC insanlarda *Shigella* dizanterisine benzer bir hastalığa neden olur. EHEC, EPEC ve ETEC' e göre daha çok gelişmiş ülkelerde görülmektedir. EHEC grubunda yer alan *E. coli* serotipleri başlıca; O157:H7, O48:H21, O11:H-, O26:H1, O104:H21, O111H ve O48:H1. EHEC' ler *Shigella* benzer bir şekilde shigatoksin oluşturmalarına karşın bu toksin invaziv değildir. EHEC tarafından üretilen bu toksinle Shiga toksin 1=Stx (verotoksin 1=VT1) ve shiga toksin 2=Stx 2 (verotoksin 2=VT1). *E. coli* O157:H7 EHEC grubuna dahil olan ve shiga toksin üreten *E. coli*' nin bir serotipidir. Shigatoksin üreticisi *E. coli*' ler SLTEC, STEC veya VTEC olarak da adlandırılmaktadır. O157:H7 dışındaki diğer STEC serotipleri O26:H11, O103:H2, O145:H28, ve O111:H8' dir. 1982 yılında HUS etkeni olarak bulunan ilk serotip O26:H11' dir ve Avrupa' da EHEC serotipli bulgular arasında ikinci en sık görülen tipidir.

STEC türleri ya Stx1 yada Stx2 taşıyabileceği gibi aynı zamanda her ikisini de bulundurabilmektedir. Ancak Stx2' nin var olduğu durumlarda daha fazla patojeniteye sahip oldukları ortaya çıkartılmıştır. Stx1 ve Stx2 üretimi için gerekli olan genetik bilgi esas olarak lambdoid profajların genomlarında bulunmaktadır. *E. coli*' nin enfeksiyon ortaya çıkarmak için patojenik olma durumunda ise Stx fajları DNA' larını bakterinin spesifik kromozomal bölgelerine entegre ederler. Böyle durumda bakteri yaşamına devam eder, faj ise lizogenik olarak çoğalır. Bu lambdoid fajların *E. coli* kromozomuna katıldığı bu spesifik bölgeler, triptofan baskılayıcı-bağlanan proteini kodlayan *wrbA*, bir transkripsiyonel düzenleyiciyi kodlayan *yehV*, fonksiyonu tam olarak bilinmeyen *yecE*, bir ekzonükleaz kodlayan *sbcB*, bir oksidoredüktaz kodlayan *Z2577*, tmRNA kodlayan *ssrA*, bir peptit zinciri serbest bırakan faktör 3, ve tRNA-Arg' ı kodlayan *argW* ve torS-torT olarak bilinen intergenik bölgelerdir.

2.2. *E. coli* Nerede Görülür?

E. coli bitkilerden ve geniş çeşitlilikteki hayvanlardan izole edilebilmektedir. *E. coli* soğukkanlı omurgalılarda bulunabilirken, sıcakkanlılarda daha sık karşılaşılmaktadır. Kuşların ve memelilerin çoğunda vücut boyutu ve bağırsak morfolojisi gibi faktörler özel bir konaktan izole edilen *E. coli*' lerin belirleyicileri olarak önemlidir (Gordon and Cowling 2003). Kuşlarda ve etçil memelilerde *E. coli*'

nin saptanma olasılığı konağın boyutunun artmasıyla birlikte artış göstermektedir. Bu fikir vücut ağırlığı ve bağırsak taşınım süresi arasındaki ilişkidir ortaya çıkmaktadır. Ayrıca bağırsa morfolojisi de önemli bir rol oynamaktadır. *E. coli* yarasalardan benzer boyuttaki kemirgenlere göre daha az sıklıkta izole edilir. Bu deneyler taşınım süresinin azalmasıyla *E. coli* hücrelerinin yoğunluğunun azaldığını göstermiştir (O'Brien and Gordon., 2011). Bir hücrede *E. coli*' nin yoğunluğunu etkileyen diğer faktörler de vardır. Örneğin hamilelik ile kilo kazanımı yada çocuklardaki açlık *E. coli* hücre yoğunluğunu etkileyebilir. Ayrıca çoğu farklı antibiyotikler *E. coli* hücre yoğunluğundaki belirgin artışın sebebi olduğunu göstermiştir (Looft and Allen, 2012).

2.3. *E.coli* O157 H7'nin Neden Olduğu Hastalıklar

E. coli O157: H7'nin enfektif dozu 100 hücreden daha azdır. İnsanlarda, hemorajik kolitis (HC), trombotik trombositopenik purpura (TTP) ve hemolitik üremik sendrom (HUS) olarak adlandırılan ve ölümlü sonuçlanabilen hastalıklara neden olur. HC, kramplı karın ağrıları ile başlar, diyare sırasında kan görülür. Hastaların çoğunda kusma görülürken ateş pek görülmez. Hastalık 3 ile 9 gün arası sürer. HUS *E. coli* O157: H7'nin neden olduğu enfeksiyonların içinde en tehlikeli olanıdır. Böbrek yetmezliğine yol açar bu nedenle hastalara diyaliz ve kan nakli gerekebilir. Bu hastalıkta merkezi sinir sistemi etkilenir. Sarılık, yüksek tansiyon veya kalp yetmezliğine yol açabilir. HUS'a Stx1 toksini neden olur ve hastalık ölümlü sonuçlanabilir. TTP ise beyinde kan pıhtısına neden olur ve genellikle ölümlü sonuçlanır ancak HUS ve HC'e göre daha az görülür. HUS gelişen vakaların %5'i ölümlü sonuçlanmaktadır. Bu oran okul öncesi çocuklarda veya 65 yaşın üzerindeki yaşlılarda % 50'ye kadar yükselmektedir.

E. coli O157:H7'nin başlıca kaynağı sığırlar olmakla birlikte koyun, geyik, domuz, kuşlar kedi ve köpek gibi diğer sıcak kanlı hayvanlarda da bulunabilmektedir. İnsanlara, taşıyıcı veya hasta hayvanla temas sonucu, kişiden kişiye bulaşma veya kontamine olmuş gıdanın tüketilmesi sonucu bulaşır. Suyun veya toprağın fekal yollarla kirlenmesi ise ekili alanlarda ürünlere taşınmasına neden olur. Geçmiş

yıllarda meydana gelen *E. coli* O157:H7'nin neden olduğu hastalıklarda, yetersiz ısıl işlem görmüş et ürünleri, çiğ süt, taze sıkılmış meyve suları, mayonez elma cideri, yoğurt, peynir, sosis ve beyaz turp filizi gibi gıdaların rol oynadığı belirlenmiştir

2.4 Shigatoksin Üreten *E. coli*

E. coli izolatlarında bir lambdoid faj tarafından üretilen shigatoksin (Campbell et al., 1992) *Shigella dysenteriae*' nin neden olduğu dizanterinin epidemik etkisinde ilk kez keşfedilmiştir (Trofa et al., 1999). Shiga toksin üreten *E. coli*' nin insan konaklarında ishalden şiddetli hemorajik kolite neden olduğu açıklanmıştır. STEC geliştirmekte olan ülkelerde farklı olarak çocukları etkileyen hemolitik üremik sendromu (HUS) ile ilişkilidir. 2011 yazında Avrupa' da görülen *E. coli* salgınına daha önceden genetik elementinde bulunmayan Shiga-toksin fajına sahip izolatlar sebep olmuştur (Frank et al., 2011 ; Rasko et al., 2011). Eğer tam moleküler tanımı açıklanabilseydi, bu salgın izolatı bir STEC olarak sınıflandırılabilirdi, fakat EHEC olarak sınıflandırılmadı. Çünkü ana genomu enteroagregatif *E. coli*' ye çok benzemektedir.

STEC izolatları enterosit gideren patojenite adaları lokusu içeren veya içermeyen olmak üzere kendi içinde gruplara ayrılır. Enterosit giderme lokusu bir tip III salgı sistemi kodlamaktadır. Bu salgı sistemi infektörleri konak hücre içine enfekte eder ve sonucunda tutunma gerçekleşir (Donnenberg and Kaper, 1992; McDaniel et al., 1995). Enterosit giderme lokusu bakımından pozitif olan STEC' ler sıklıkla infekte ettikleri konaklarda hemorajik kolite neden olurlar.

Genom sekanslaması yapılmış ilk EHEC genomu O157:H7 suş EDL933' tür ve Michigan' daki bir salgında izole edilmiştir (Perna et al., 2011). Bu genomun K12 ile karıştırılması sonucu virulus faktörü ve profajlarla ilişkili yaklaşık 1400 yeni gen tanımlanmıştır. Bu yayın Japonya' da meydana gelen bir salgın sonucu (Watanabe et al., 1996) izole edilen O157:H7 Sakai straininden bulunmuştur.

2.4.1 Shigatoksin Tipleri

Shigatoksin STEC' in birinci virulans faktörü olan shiga toksin bir AB5 proteinidir. B pentameri hücrelerin glikoliğid globotriasil seramit (GB3) ekspresyonunu hedefler ve A alt biriminin stoplazmaya taşınmasından sorumludur. Enzimatik olarak aktif A birimi 28s rRNA' dan 4324' teki adeninin N-glikosidik bağını keserek protein sentezini inhibe eder, t-RNA' nın bağlanmasını engeller (O' Brien at al., 1992).

Bütün Shigatoksin toksinler benzer yapıda ve enzimatik özellikte olmalarına karşın, sekanslarına bağlı olarak biyolojik aktiviteleri ve serolojik reaktiviteleri farklılık göstermektedir. *E. coli*'den elde edilen Shiga toksinler *Stx1* ve *Stx2* olmak üzere iki ana grupta incelenirken her grup birçok alttipe ayrılmaktadır. Stx alttiplerini belirlemek için birçok farklı metod ve kriter uygulanmıştır.

Shigatoksin nomenclatürünü standardize edebilmek için Scheutz ve arkadaşları proteinler arası ilişkiyi belirleyen filogenetik sekans temelli bir sistem geliştirilmiştir. *E. coli*'den elde edilen Shiga toksin alttipleri *Stx1a*, *Stx1c*, *Stx1d*, *Stx2a*, *Stx2b*, *Stx2c*, *Stx2d*, *Stx2e*, *Stx2f* ve *Stx2g* olarak sınıflandırılmıştır. (Scheutz et al., 2012) Bakteriler tarafından üretilen Shiga toksin *Shigella dysenteriae* tip I ve STEC suşları tarafından üretilirler. Önceki yıllarda ise bu toksinlere Shiga toksin veya verositotoksinler denilmekteydi. Stx' in bir virülens faktörü olduğu çoğu çalışmada özellikle de HUS olgularından ortaya çıkmıştır. Virülens bakımından EHEC' e benzeyen fakat *Stx* üretmeyen EPEC suşları da HUS oluşumuna neden olmaktadır (Sjogren et al., 1994; Park et al., 1999).

Shiga toksin üreticisi olan *E. coli* suşları *Stx1*, *Stx2* veya da her ikisini birden üretirler. Bu suşlar serolojik bakımdan *Stx/Stx1* ve *Stx2* olarak ikiye ayrılırlar. EHEC' ler tarafından salgılanan *Stx/Stx1 Shigella dysenteriae* tip I tarafından üretilen Shiga toksin benzemektedir ve sadece 1 aminoasitlik fark gözlenmiştir (Strockbine et al., 1988). İki toksin de aynı serumla nötralize olup *Stx2* ile *Stx/Stx1* arasında %55 benzerlik vardır ve nötralizasyon oluşmaz.

2.4.2 STX Etki mekanizması

Stx aracılı zehirlenmedeki ilk adım, B alt biriminin konakçı hücre yüzeyindeki bir glikolipid reseptörüne bağlanmasıdır (Adım 1). En iyi çalışılmış Stx reseptörü globotriaosylceramide (Gb3) 'dir (Hoffmann et al., 2010). Gb3'e bağlı toksin endositozlanır (Adım 2). Bu işlem sırasında, A alt birimi, muhtemelen endozomda ve / veya trans-Golgi ağında bulunan furin tarafından proteolitik olarak ayrılır. Bununla birlikte, A-alt biriminin, sitosolik kalpain tarafından bölünmeye karşı da duyarlı olduğu belirtilmelidir. Elde edilen A1 fragmanı, bir A alt-alt ünite disülfür bağı yoluyla A2 fragmanına bağlı kalır ve Stx1'e yapılan araştırmalar, Holotoksinin ER'ye translokasyon sırasında bozulmadan kaldığını gösterir. (Garred et al., 1997) Disülfid bağının, risin ve kolera toksin gibi toksinlerin bu bölmede disülfid bağ azalmasına maruz kaldığı görülmesine dayanarak azaldığı varsayılmaktadır (Adım 3). Ayrıca, Stx1'in floresan etiketli A ve B alt birimleri ER'ye retrograd translokasyon sırasında ayrılmaz, bu da Stx disülfid bağ azalmasının bu bölmeye taşınma sırasında meydana gelmediğini gösterir (Tam and Lingwood, 2007). N-glikosidaz aktivitesine sahip olan serbest A1 fragmanı daha sonra N-glikosidaz aktivitesinin sonuçlandığı, sitozole (Aşama 4; LaPointe et al., 2005) aktarılır. 28S ribozomal RNA'sının a-sarsin / ricin halkası üzerinde bulunan tek bir adenin tortusundan (A4324) N-glikosidaz aktivitesi ile kesilir.(Obrig et al., 1987; Endo et al., 1988). Ribozomun yok edilmesi, protein sentezinin durmasıyla sonuçlanır (Aşama 5);(Endo et al., 1988; Saxena et al., 1989).

STEC enterik patojenler olduğundan ve genellikle non-invaziv olduğundan, HUS gibi sistemik bir hastalığa neden olmak için Shiga toksinlerinin üretildikleri bağırsak lümeninden, toksinin böbrek ve merkezi sinir sistemine etki edebilmesi için erişebileceği sistemik dolaşıma geçmesi gerekir. Farelerin, genetik olarak işlenmiş Stx üreten bir *C. rodentium* ile bağırsak enfeksiyonu, EHEC gibi, bağırsak epitel hücrelerinde AE lezyonları oluşturur. Mukozal yüzeyin kolonizasyonu sistemik zehirlenmeyi teşvik edebilir.

2.4.3 *E. Coli* O157:H7 ve Gıdalar

E. coli O157:H7'nin başlıca kaynağı sığırlar olmakla birlikte koyun, geyik, domuz, kuşlar kedi ve köpek gibi diğer sıcak kanlı hayvanlarda da bulunabilmektedir. İnsanlara, taşıyıcı veya hasta hayvanla temas sonucu, kişiden kişiye bulaşma veya kontamine olmuş gıdanın tüketilmesi sonucu bulaşır. Suyun veya toprağın fekal yollarla kirlenmesi ise ekili alanlarda ürünlere taşınmasına neden olur. Geçmiş yıllarda meydana gelen *E. coli* O157:H7'nin neden olduğu hastalıklarda, yetersiz ısıl işlem görmüş et ürünleri, çiğ süt, taze sıkılmış meyve suları, mayonez elma cideri, yoğurt, peynir, sosis ve beyaz turp filizi gibi gıdaların rol oynadığı belirlenmiştir.

06.02.2009-27133 tarihinde resmi gazetede yayımlanan 2009/6 tebliğ nolu Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği Mikrobiyolojik kriterler tebliği'ne göre patojen *E. coli* O157:H7 'nin tüm gıda ürünlerinde 25gr/L'de hiç bulunmaması gerektiği açıklanmıştır. Bazı gıda ürünleri tablo 1'de belirtilmiştir.

Tablo 1 2009/6 Tebliğ Nolu Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğine Limitler

| Gıda | Numune planı | | limitler | |
|--|--------------|---|-----------|---|
| | n | c | m | M |
| Süt, süt ürünleri ve süt bazlı ürünler, İçme sütü, Fermente süt ürünleri | 5 | 0 | 0/25 g-mL | |
| Karkas, parça etler, kıyım ve sakatat Hazırlanmış et karışımları | 5 | 0 | 0/25 g-mL | |
| Isıl işlem görmemiş et ürünleri Et suyu tabletleri, tozları, kuru formdaki çorbalar, | 5 | 0 | 0/25 g-mL | |
| Yıkanmış, doğrama ve paketleme işleminden geçmiş, ayrı ayrı veya karıştırılmış çiğ sebzeler ile dondurulmuş veya kurutulmuş sebzeler | 5 | 0 | 0/25 g-mL | |
| Doğrudan sıkılmış, pastörize edilmemiş, soğukta muhafaza edilmesi gereken, tüketime hazır meyve ve sebze suları | 5 | 0 | 0/25 g-mL | |
| Meyve şarapları, diğer içecekler, içme suları | 5 | 0 | 0/25 g-mL | |

2.5 CRISPR sistemi

Arkea ve bakteriyayı enfekte eden (bakteriyofaj olarak bilinir) virüsler gezegenimizde en çok bulunan biyolojik ajanlardır. Viral yırtıcılığa karşı cevap olarak restriksiyon-modifikasyon sistemleri (R-M sistemleri) , virüs reseptörlerinin modifikasyonu ve başarısız enfeksiyonu gibi geniş ölçekli savunma mekanizması geliştirmiştir ve bunların çoğu koruyucu sistemdir. Bütün arkeaların genomlarında

olmasına rağmen bakterilerin çeyreğinde adaptif immüniteden sorumlu CRISPR-Cas sistemi bulunur. CRISPR sekanslarının tümü alternatif tekrarların ve spacer sekanslarının bir karakteristik modeline sahiptir.

Mikroorganizmalar, viral saldırılarla ve istilacı nükleik asitlerle başa çıkabilmek için çeşitli savunma mekanizmaları kullanırlar. Çoğu Bacteria ve Archaea üyesinde CRISPR'ler özel genetik lokuslar (loci) oluşturarak virüs ve plasmidlere karşı kazanılmış bağışıklık sağlarlar. Bu bağışıklık nükleik asitlerin diziyeye özgü bir şekilde hedeflenmesine dayanır. Bu hiper-değişken lokuslar istilacı elemanlardan genetik materyali alarak zamanla kalıtsal ve DNA tarafından kodlanan bağışıklığı oluştururlar. Buna karşın virüsler mutasyona dayalı kaçış stratejileri kullanarak en azından bir derece CRISPR/Cas sisteminden kurtulabilirler. CRISPR'lerin özelliklerinden tiplendirme araştırmalarında, epidemiyolojik çalışmalarda, konakçı-virüs arasındaki ekolojik incelemelerde, istenmeyen genetik elemanlara karşı özel bağışıklık oluşturulmasında ve kültürü yapılan mikroorganizmalar viral dirençlerinin artırılmasında faydalanılabilir.

CRISPR çoğunlukla arkaeal (~90%) ve bakteriyal (~40%) genomlarda bulunan DNA tekrarları ailesini temsil etmektedir. Bir CRISPR yapısının ilk olarak keşfedilmesi *Escherichia coli*'de 1987 yılında tesadüfen olsa da, akronimi çeşitli Bacteria ve Archaea genomlarında da benzer yapılara rastlandıktan sonra 2002 yılında oluşturulmuştur. CRISPR lokusları tipik olarak çeşitli "noncontiguous" direkt tekrarlardan ve bunları ayıran "spacer" dizilerinden (çoğu zaman alınan viral ve plazmid dizileri parçalarına karşılık gelen) oluşmaktadır ve çoğu zaman cas genlerine (CRISPR-associated) bitişiklerdir. Cas genleri, nükleazlar, helikazlar, polimerazlar ve polinükleotid bağlanma proteinlerine özgü fonksiyonel domain'leri kapsayan büyük ve heterojen bir protein ailesini kodlar. CRISPR ve Cas proteinleri birlikte CRISPR/Cas sistemlerini oluştururlar. Altı temel cas geni tanımlanmıştır. Bunların arasında CRISPR/Cas sistemleri *cas1* (COG1518) ve *cas2* (COG1343, COG3512, nadiren diğer cas genleriyle birleşmiş şekilde) evrensel marker'ları da bulunmaktadır. *cas1* - *cas6* temel genlerinin yanında, alttıpe özgü genler ve repeat-associated mysterious proteins, yani RAMP'ları kodlayan genler belirlenmiş ve fonksiyonel

olarak özel CRISPR tekrar dizileriyle eşleşmelerine göre gruplara ayrılmışlardır. CRISPR tekrarları ve spacer'larının büyüklükleri sırasıyla 23 - 47 bp ve 21 - 72 bp arasında değişmektedir. Genel olarak CRISPR tekrar dizileri belirli bir lokus için yüksek derecede korunmuştur, bununla beraber mikrobiyal türler arasında büyük bir tekrar dizisi çeşitliliği görülmektedir. Çoğu tekrar dizisi kısmen palindromiktir, yani kararlı ve yüksek derecede korunmuş sekonder yapılar oluşturma potansiyeline sahiptirler. Tekrar-spacer birimlerinin sayısının *Chloroflexus* sp. Y-400-fl suşunda 375'e kadar ulaşmaktadır, bununla beraber laktik asit bakterisi genomlarında gösterildiği gibi çoğu lokus 50 birimden daha az birim içerir. Mikroorganizmalar tek bir CRISPR lokusundan daha fazlasına sahip olabilir, örneğin *Methanocaldococcus jannaschii*'de 18 adet böyle lokus vardır ve toplam genomlarının % 1'ine karşılık gelmektedir. CRISPR'ler tipik olarak kromozomda konumlanırsa da, plazmidlerde bulunanları görülmektedir.

Arkea ve bakterilerde CRISPR-Cas sistemi; CRISPR tekrar kasetleri ve bunlarla ilişkili çeşitli Cas genleri kümeleri içeren kompleks bir genom tarafından kodlanan sistem ile virüs ve ya diğer yabancı DNA formlarına karşı adaptif immün sistem sağlamaktadır.

2.5.1. CRISPR'm Tarihçesi

CRISPR tekrarlayan diziler için ilk rapor, alkalın fosfat izoenzim konversiyon aminopeptidazları şifreleyen iap geni içeren *Escherichia coli* K12 sekansından ortaya çıkmıştır. Nakata ve arkadaşları “ aralık olarak 32 nükleotid ile doğrudan tekrar yapacak şekilde düzenlenen 29 nükleotidin son derece homolog beş sekansını” bulmuşlardır. (Ishino et al., 1987)

1991 yılında, insersiyon sekans (IS) öğelerinin entegrasyonu için sıcak bölge çeşitli *Mycobacterium* tüberküloz kompleksinin (MTC) çeşitli suş genomlarında 35-41 bp DNA aralıklı, 36 bp direkt tekrar (DRs) barındıran bölge tanımlanmıştır. DR bölgesi *M.tüberküloz* suşları arasında polimorfizm göstermiştir, özellikle tekrar-aralık ünitelerinin olması veya olmaması sebebiyle (ayrıca Direkt Değişken

Tekrarlar-DVRs olarak isimlendirilmiştir), ama aralıkların görece sırası sabit kalmıştır. (Hermans at al., 1991)

1993 yılında Haloarkeada 35-39 bp uzunluğunda benzersiz boşluklara sahip 30-34bp uzunluğunda kısa tandem tekrarlar keşfedilmiştir ve isimless tekrarlar TREPs olarak adlandırılmıştır.(Mojica et al., 1993)

90 yılların sonunda genom sekanslama teknolojinin gelişmesiyle düzenli aralıklı tekrarların yeni dizileri açığa çıkarılmıştır. Tekrarlayan dizilerin tam genomu ilk olarak *Methanocaldococcus jannaschi*'de açığa çıkarılmıştır. (Bult et al 1996)

Cyanobacteria için tanımlanan uzun tandemli yinelemeli tekrar sekansları (LTRR), bean *Vicia fabanın* mitokondriyel plazmidinde bulunan DNA tekrarlarına hem sekans hem de yapı olarak çok benzerlik gösterdiği kanıtlanmıştır.(Flamand et al., 1992; Mojica et al., 2000). Bu kloroplastların önerilen siyanobakteri atası ile son derece tutarlı bir bulguydu ve bitki organelleri arasında meydana gelen yaygın yatay gen transferini önermektedir.

Tekrar dizilerinin bakteriyel ve çeşitli filogenetik taksondan arkeal genomlarda tanımlanan tekrarlarla karşılaştırılması, yeni bir tür DNA familyası oluşturdukları hipotezinin oluşmasına ve Düzenli Kısa Aralıklı Tekrarlar veya SRSR olarak anılmasına yol açmıştır. SRSR'ler kısa sekanslar olarak tanımlanmıştır, özellikle ters tekrarları içeren ve genel olarak, benzersiz sekanslara sahip düzenli aralıklı tekrarlayan ünitelerin kümeleri olarak düzenlemiştir.

İlk olarak *M.jannaschii* genomunda gözlemlenen lider sekanslar pek çok tekrar dizileri ile ilgilidir. Daha sonra, Jansen ve Mojica SRSR'nin yerine daha açık, düzenli ve şu anda yaygın şekilde CRISPR akronimi olarak kullanılan ve literatürde pek fazla olan DR, TREP, LTRR, SR, ŞCTR VE SPIDR gibi farklı akronimlerle karışmasını önlemek amacıyla Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrar Kümeleri(CRISPR)'nin kullanılmasını önermişlerdir. (Mojica et al., 2000)

2002 yılında Jansen ve ark. bu tekrarlayan lokusların her zaman, nükleaz veya helikaz proteinleri dahil olmak üzere nükleik asit işleme enzimlerini kodlayan konsere edilmiş gen setlerine eşlik ettiğini keşfetti. Son yazarlar, şu anda CRISPR-Cas olarak adlandırılan, düzenli olarak kümelenmiş isimleri kısa aralıklı kısa palindromik tekrarlar (CRISPR) ve CRISPR ile ilişkili (Cas) gen / protein olarak isimlendirdi(Jansen et al., 2002).

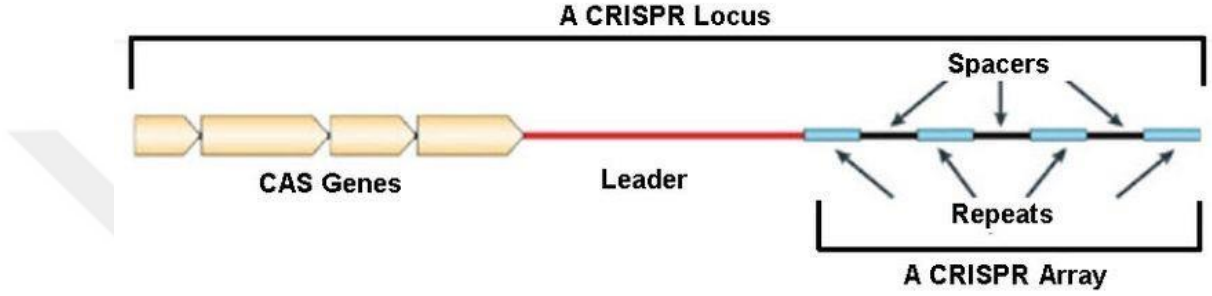
2005'te, üç grup bağımsız olarak, boşluklar arası dizilerin bazılarının virüslerden ve plazmitlerden gelen DNA dizileriyle % 100 aynı olduğunu gözlemledi; CRISPR-Cas'ın yeni bir savunma sistemi olabileceği ileri sürüldü. Karşılaştırmalı genomik analizler, CRISPR'lerin ve bunlarla ilişkili (cas) genlerin, çeşitli bakteriyel filogenetik gruplarda bulunduğunu ve bu genlerin birkaç protein familyasında sınıflandırılmasını sağladığını ortaya koydu. 2007 yılında Barrangou ve arkadaşları CRISPR-Cas sisteminin ev sahibini istilacı virüslere karşı koruyan uyarlamalı bir bağışıklık sistemi olduğuna dair ilk deneysel kanıtı sağlamıştır. (Barrangou et al., 2007)

CRISPR-Cas'ın savunmada rolü, viral transfeksiyonlar ve plazmid dönüşümleri üzerine bir dizi sonraki çalışmada da belirlenmiştir. 2011 yılında Makarova ve ark. farklı CRISPR-Cas sistemlerinin 3 ana sınıflandırılmasını önermiştir; aşağıdaki üç ana tip: cas3 geninin varlığına dayalı tip I CRISPR-Cas sistemleri; cas9 geninin varlığına dayalı tip II CRISPR-Cas sistemleri; ve cas10 geninin varlığına dayanan tip III CRISPR-Cas sistemleri. TipI CRISPR-Cas sistemleri kendi içinde 6 alt tip(A,B,C,D,E ve F), Tip II CRISPR-Cas sistemleri kendi içinde 3 alt tip (A,B ve C) ve Tip III CRISPR-Cas sistemlerikendi içinde 2 alt tipe (Ave B) ayrılmaktadır.

2.5.2 CRISPR Sistemlerin Temel Bileşenleri

CRISPR-Cas sistemleri, düzenli olarak değişen tekrar ve aralıkların bir veya iki kasetinden oluşmaktadır; dizinin bir ucunda bir lider sekans ve bir dizi cas geni bulunmaktadır. Bu komponentler CRISPR-cas yolunun farklı evrelerine katılırlar ve

CRISPR-RNA'lar cr(RNAs) ve Cas proteinleri oluştururlar. (Şekil 1) Cas proteinleri yeni CRISPR aralıklarının (ele geçirme olarak adlandırılan ancak adaptasyon olarak ta bahsedilen) alınmasına, CRISPR transkriplerinden (crRNA ifadesi ve proses) küçük crRNA'ların oluşturulmasına ve istilacı nükleik asitlerin, tamamlayıcı photospacers sekanslarına çift oluşturan protein-crRNA kompleksleri ile hedeflenmesi ve bölünmesine yol açarlar.



Şekil 1 Bir CRISPR lokusu

2.5.2.1 CRISPR İlişkili Proteinler (*Cas*)

Salmonella 'nın iyi korunan Cas1 ve Cas 2 proteinleri kazanım (acquisition) basamağına dahil edilmiştir, muhtemelen genellikle cas1 ile birlikte aktarılan Cas4 ile (ya da geni CAS1 geni ile yapışan). Bu yüksek seviyeli protein koruması bu prosesin bütün CRISPR-Cas sistemleri için üniversal olduğunu önermektedir. Bu çıkarım, genetik olarak manipüle edilen koşullar altında *E.coli* tip I-E sistemlerinde ve *S.solfataricus*'un tip I-A (ve tür III-B) sistemlerinde, spacer kazanım düzenlenmesi, PAM motifinin rolü ve insersiyonun meydana geldiği CRISPR tekrarının yeri ile ilgili bu sistemler arasındaki çeşitli mekanik farklılıklar bulunmaktadır (Hatoum-Aslan et al. 2011).

Cas6 bütün tip I ve III sistemleri için temel RNA enzimidir, tekrarlarla kesilir ve bu fonksiyon tracrRNA tarafından ve tip II sistemlerindeki konak kodlanmış bakteriye özel RNase III tarafından gerçekleştirilir. crRNA'nın matürasyonu tip III-A ve III-B sistemleri için meydana gelir ve büyük bir olasılıkla tip III-A için Csm2, Csm3 ve/veya Csm 5 içerir. Etkileşim proteini crRNA modülleri en farklı olanlardır

ve tip I, II ve III-A ve tip III-B sistemlerinin her biri için farklı core Cas proteinleri gerekir (Hatoum-Aslan et al. 2011).

En yağın tür I kompleksleri cas5-7 ve Cas 3 proteinlerini taşırlarken, tip III-A ve III-B modülleri sırasıyla Csm1-5 ve Cmr1-6 (veya 7)'yi taşırlar. Ayrıca, pek çok temel olmayan Cas proteini, olasılıkla fonksiyonel farklılıklarını ve/veya değişkenliklerini artıran etkileşim modülleri ile ilişkilidirler. Bunun yanı sıra, birkaç proteininin, Csa3 ve Csm6 dahil, potansiyel transkripsiyonel düzenleyici alanları taşıdığı ancak diğer fonksiyonları da yapıp yapmadıklarının belirsiz kaldığı gösterilmiştir

Cas1 , cas 2, cas 4 kazanım aşamasında tüm tiplerde bulunurken ,cas6 (tip I-A, tip III-A ve III-B) ve Csm2 ile csm5 tip III-A'da ekspresyon aşamasında rol almaktadır ve müdale savunma aşamasında tip I'de cas 3 cas 5 cas 6 cas 7 ve cas8, tip II'de cas9 tip III-A'da Csm1-5, Tip II-B'de Cmr1-7 rol almaktadır.

2.5.2.2 CRISPR Dizisi

Çoğu CRISPR dizinleri ara sıra daha büyük dizinler bulunmakla birlikte yaklaşık 2 ile 100 tekrar taşırlar. Bugüne kadar bulunan en büyük tekli dizin 588 tekrar içermektedir ve halofilic bacterium *Haliangium ochraceum* DSM 14365 'de meydana gelmektedir (CRISPRdb veri tabanı). Ayrıca, entegrasyon veya transpozisyon ile ilgili üç non-cas gen seti tarafından aynı tekrar sekansı ile ayrılan iki ilave dizin ile ayrılmaktadır. Hepsi birlikte, üç CRISPR dizini 815 tekrar taşır ve yaklaşık 66kpb alana yayılırlar.

Bazı organizmalar, özellikle ekstremofilik arkealar, çoklu CRISPR lokusları taşırlar. Bunun uç örneği 23 genomik dizini olan *Methanocaldococcus* sp. FS406-22'dir (CRISPI ve CRISPRdb veri tabanı). Çoğu CRISPR kromozomal alanlarla yerleşik olmakla birlikte, bazen proviral benzeri öğeler içindeki, yatay gen transferinin önemli araçlarından olan, en azından bazı bakteriler için önemli olan plazmidler üzerinde tekrar dizinleri de bulunur (Sebeia et al; 2006)

2.5.2.3 Lider Dizi

Çoğu CRISPR dizinleri lider sekanslar taşırlar. Bunlar yaklaşık 100-500 bp arasında sıralanırlar. Liderler özellikle bitişik CRISPR lokusunun tekrar sekansına doğru yönelirler ve dejenerat terminal tekrarı var olduğunda, devamlı olarak lokusun distal ucunda meydana gelirler. Liderler protein olmayan kodlardır ve genellikle bazı düşük kompleks yapıda sekans bölgelerini taşırlar. CRISPR-Cas sistemleri ile yakından ilişkili liderler kısmen korunmuş sekans motifleri taşırlar ki bu da önemli bir fonksiyondur. Liderler en az iki önemli role sahiptirler; bir tanesi deneysel olarak gösterilmiştir ve diğeri de önerilmektedir. Öncelikle, liderler bitişikteki CRISPR lokusunun transkripsiyonu için temel promotör alanı taşırlar. Ayrıca, eğer lider yoksa aralıklardan rastgele alınan, ya da ara sıra bir tekrar içinden alınan promotör motiflerden çoğunlukla yalnızca düşük transkripsiyon seviyeleri gözlemlenir. İkinci olarak, yeni aralıkların temel olarak ilk tekrara yakın olduğu alanda birleşirler. Ayrıca Cas proteinleri için düzenek alanına katkı sağlayarak yeni tekrar-aralık ünitesin yerleştirilmesini kolaylaştırarak liderlerin kazanım basamağında önemli bir fonksiyonel rol oynadığını önermektedirler. Bu görüşle tutarlı olarak, bazı lidersiz CRISPR lokusları hücreler içerisinde muhafaza edilirler ve ele geçirme basamağında inaktif görünürler, ancak lidersiz uca yakın bir başlatıcıdan kopyalanırsa yapılırsa ya da CRISPR dizininden, yinede etkileşim aktivitesini sürdürebilirler. Liderdeki DNA öğelerinin ele geçirme için gerekli olduğu deneysel bulgusu yakın zamanda bildirilmiştir (Marrafini and Sontheimer; 2008; Lillestol et al. 2009; Shah et al. 2009).

2.5.2.4 Tekrarlar (Repeats)

Sıralı genomlardaki CRISPR tekrarlar, genellikle 24-25, 29-30 ve 36-37 bp uzunluğundadır. CRISPR tekrarların çok azı 38 bp den uzundur ve şüana kadar sadece *Desulfobacca acetoxidans* DSM 11109'un 50 bp den uzun olduğu bilinmektedir.

23bp gibi daha düşük limit archaeon *Ferroglobus placidus* DSM 10642 (6 dizin, csa ve cmr genleri ile ilişkili 10-27 ünite) 'da görülmüştür ve diğer daha küçük dizinler uzaktan akraba olan izolatlarda bulunmaktadır. Çoğu CRISPR dizisi yaklaşık 100 tekrar dizisi taşıyabilir. Bir organizmanın CRISPR lokuslarında bulunan tekrarlar son derece ıraksak olabilir ve diğer taraftan uzaktan akraba organizmalarda benzer tekrar türleri bulunur. Bu gözlemler CRISPR temelli sistemlerin ara sıra yatay gen transferine uğradıkları hipotezini desteklemektedir. Bu görüş kısa süre önce yapılan, tür I CRISPR-Cas sistemlerinin ve aynı zamanda tür III CRISPR-Csm ve CRISPRCmr sistemlerinin değiş tokuşu için güçlü kanıt sağlayan 12 *S. islandicus* genomları çalışmasıyla sağlanmıştır (Godde and Bickerton 2006; Portillo and Gonzales. 2009).

2.5.2.5 Boşluklar (Spacers)

Tekrar dizilerinde bulunan bu spacer bölgeleri boyut olarak birbirlerine yakındır ve birkaç nükleotide çeşitlenerek benzersiz sekanslar içermektedir. Mevcut veriler CRISPRdaki spacer boyutunun 26 ile 51 bp arasında olduğunu desteklemektedir. CRISPR dizin içeriğinin spacer sekansı son derece değişkendir ve söz konusu türlerin farklı suşları kendi dizinleri içinde benzer aralıklar taşıma eğilimindedir. Ayrıca, bu değişken aralıklar, ilgili sırasını koruyarak dizinin kuyruk ucuna doğru yoğunlaşma eğilimindedir. Mikroorganizmalar liderin yakınlarında yeni benzersiz aralıklar oluşturur ve yeni aralıkların bu birikimi (akümülyasyon) istilacı yabancı genetik öğelerin kronolojik olarak kaydedilmesini sağlar.

2.5.2.5 Protospacer Adjent Motif (PAM)

CRISPR-Cas sistemlerinin önemli sekans öğesi protospacers'a bitişik durumdadır. Protospacera bitişik veya iki konum yakınında 2-5 nt sekansında kısa bir tanıma bölgesi oluşturur ve CRISPR ve organizma türüne bağlı olarak bir dizi temel sekans sergiler. Sekans öğesi protospacer bitişik motif (PAM) olarak adlandırılır ve protospacer'ın bir ucunda yer alır. Ayrıca, tip I sistemine ait çoğu PAM CRISPR dizinleri (aralık ucu, PAM-bitişik protospacer ucuna karşılık gelir) lidere doğru

yönlenirken bakteriye özel tip II CRISPR-Cas sistemlerinin karşıt yönde bir oryantasyonu vardır. Buna ilaveten, PAM'ın bulunmasının hem tip I CRISPR-Cas sistemlerinde hem de tip II sistemlerinde etkileşim için gerekli olduğu gösterilmiştir. Özellikle de, PAM, *E.coli* tip I-E sisteminde hedef tanımlama için gösterilmiş olmakla beraber tahmin edilen PAM'dan farklılık gösteren protospacera bitişik sekanslar da etkileşim gösterebilmektedir. Aksine, deneysel bulgular PAM motiflerinin tip III sistemlerinde etkileşim için gerekli olmadığını önermektedir.

2.5.2.6 CRISPR RNAs

CRISPR lokuslarının genellikle, muhtemelen CRISPR lokusun downstreamını sona erdiren daha uzun kopyalar (pre-crRNAs) meydana getirmesi için lider içinde kopyalanmaktadır. Ayrıca cas proteinleri tarafından alınan sinyaller sonucu transkripsiyonun başlamasını veya durdurulması sağlamaktadır. Öncü RNA'lar tekrarlarla birlikte ara crRNA'ları oluşturmaktadır. Tip I sistemlerinde hairpin-loop yapısı oluşturduğu ya da tip III CRISPR sistemlerinde helix-loop yapısı oluşturduğu deneysel olarak kanıtlanmıştır. Ayrıca *S.epidermis* tip III-A sistemlerinde, hair-loop oluşturma kapasitesinin erişkin crRNA'ların oluşumunu artırdığı gösterilmiştir (Hatoum-Aslam et al. 2011).

Araştırmalardan yirmi yıl sonra, CRISPR savunma sistemlerinin sır ve gizemlerinin pek çoğu şu anda açığa çıkartılmıştır. crRNA'ların üç temel mekanik basamağı, ele geçirme, ifade ve proses ve etkileşim açıklanmış olmakla birlikte, çeşitli sistemlerde açıkça ve detaylı olarak açıklanması gerekmektedir. CRISPR dizinlerinin farklı CRISPR immun sistemlerin fonksiyonel core'larını oluşturduğu gösterilmiştir. Her basamak, ele geçirme, pre-crRNA prosesi ve etkileşim temel Cas proteinleri olarak tanımlanan bir grupta ilişkilidir. En korunmuş basamak, CRISPR dizinin lider ucunda veya buraya yakın alanda yeni aralık olarak yabancı DNA'ların alımından oluşan ve yaygın Cas1 ve Cas2 ve sıklıkla Cas4 proteinlerinin içeren ele geçirmedir.

2.5.3 CRISPR-Cas sisteminin sınıflandırılması

Yakın zamanda geliştirilen CRISPR-Cas sistemlerinin sınıflandırılması, onları üç farklı tipe ayırır (I, II ve III) (Bhaya et al., 2011; Makarova et al. 2011; Wiedenheft et al. 2012). Tüm bu sistemler iki evrensel gen içermektedir: yabancı DNA'nın (spacer) CRISPR kasetlerine entegre edilmesinde rol oynayabilecek belirgin bir sekans spesifikliğı olmayan metale bağımlı bir DNaz kodlayan cas1 (Marraffini and Sontheimer 2009; Wiedenheft et al., 2009), ve spacer toplama aşamasında da rol oynayan metal bağımlı bir endoribonükleaz kodlayan cas2 proteindir. (Beloglazova et al., 2008; Yosef et al., 2012). Bununla birlikte, diğer taraftan, üç tip CRISPR-Cas sistemi kurucu gen kümelerinde büyük ölçüde farklıdır ve her biri benzersiz bir imza geni ile karakterize edilir. Bu üç tür için imza genleri sırasıyla, cas3 (N-terminal HD süper-aile nükleaz domainini içeren bir superfamily 2 helikaz) (Sinkunas et al., 2011), cas9 (öngörülen bir RuvC-benzeri ve HNH nükleaz alanlarını içeren büyük bir protein) ve nükleik asit polimeraz ile nükleotid siklazlarının domainine homolog olan cas10'dur. (Makarova et al., 2011). Bu üç tip içinde, CRISPR-Cas sistemleri, evrensel cas1 geninin filojeni ile birlikte, farklı imza genleri içeren çeşitli düşünceler temelinde, alt tiplere daha da sınıflandırılmıştır. RAMP'ler (Tekrarlarla İlişkilendirilen Gizemli Proteinler) olarak bilinen Cas proteinleri hem tip I hem de III sistemlerinde çeşitli kopyalarda bulunur. RAMP'lerden bazılarının, crRNA ön transkriptlerinin işlenmesinde yer alan sekans veya yapıya özgü RNase aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Çeşitli RAMP'lerin kristal yapıları çözülmüş ve bunların ferredoksin katı olarak da bilinen RNA tanıma motifinin (RRM) farklı versiyonlarını gösteren bir veya iki alan içerdiklerini göstermektedir. Tip 1 ve tip 3 CRISPR-Cas sistemleri filogenetik olarak farklı arkea ve bakteryanın çeşitli kombinasyonlarında bulunmasına karşın farklı tip 2 sistemleri (Bazen diğer CRISPR-Cas tipleriyle kombine olur) bakteriler için sınırlıdır. İlginç olarak CRISPR-Cas sistemleri viral genomlarda ve plazmidlerde de bulunmuştur. Filogenetik çalışmalar bu sistemlerin horizontal gen transferi yoluyla sıkça değiştiğine örnektir. Onların çeşitliliğine rağmen bütün Cas proteinleri kendi içinde 4 fonksiyonel kategoride gruplandırılır; 1) spacer kazanımı ile ilişkili nükleazlar ve ya rekombinazlar, 2) crRNA kılavuzunun

katalizi, ribonükleaz, 3) RNA ile kılavuzluk yapan crRNP kompleksi 4) DNA ve ya RNA'yı degrades eden nükleaz

2.5.3 Cas Protein Aileleri

2.5.3.1 Cas1 ve Cas2: Spacer Kazanımında Rol Alan İmza Cas Proteinleri

İki Cas proteini, Cas1 ve Cas2, fonksiyonel olarak aktif olduğu tahmin edilen tüm CRISPR / Cas sistemlerinde temsil edilir. Bu proteinlerin, aralayıcı entegrasyonunda yer alan “uyarlama aşaması” olan “bilgi işlem” CRISPR-Cas modülü olarak işlev gördüğü düşünülmektedir. Cas1 ve Cas2'nin spacer kazanımında rol aldığından mekanizmanın antiviral savunma aşamasında yer almaktadır (Brouns et al., 2008; Hale et al., 2009). Cas1 ve cas2 genleri, üç ayrı CRISPR-Cas sisteminin çekirdeğini içerir (Makarova et al. 2011). Varsayılan nükleaz / integras Cas1, tüm Cas proteinleri arasında en fazla bulunanıdır. Bu protein, bakteriyel ve arkeal genomlarda CRISPR-Cas sistemlerinin tespiti için ve yaygın olarak kullanılır. Birkaç asidik residünün ve bir histidin evrimsel korunmasına dayanarak, Cas1'in nükleaz aktivitesine sahip olduğu tahmin edilmiştir (Makarova et al. 2006). Şimdiye kadar iki Cas1 proteini deneysel olarak karakterize edilmiş ve ilgili yapıları çözülmüştür (Wiedenheft et al., 2009; Babu et al., 2011). *Pseudomonas aeruginosa*'dan gelen Cas1 proteini, yaklaşık 80 bp DNA fragmanı üreten, ssDNA veya dsDNA'yı bölen metal bağımlı bir nükleazdır. Cas1'in korunmuş amino asit kalıntıları, yeni bir katlamının heliksel alanında bir metal bağlama cebini hizalar. Katalitik alan, N-terminaline, çoğunlukla beta iplikli bölgeye esnek bir bağlayıcı ile bağlanır ve Cas1 proteini homodimerleri oluşturur (Wiedenheft et al., 2009). Cas1'in metal iyon bağlayıcı amino asit kalıntılarının mutasyonu, Cas1 katalizörlü DNA bozulmasını önler. N-terminal alanının fonksiyonu net değildir. *E. coli*'den Cas1 proteini (YgbT) için benzer özellikler bildirilmiştir. Ayrıca, genom genişliğindeki ekranlar YgbT'nin fiziksel ve genetik olarak DNA onarımının temel bileşenleri ile etkileşime girdiğini göstermiştir recB, recC ve ruvB gibi sistemler Cas1 proteininin bakteriyel antivirüs başlıklık ve DNA onarımında ikili bir rol oynadığını göstermektedir (Babu et al., 2011). Cas1'in diğer protein alanları ile korunmuş

füzyonları tespit edilmiştir; Cas1 füzyon proteinlerini kodlayan tüm genler, cas operonlarına aittir. En yaygın olanı, Cas 1'in, bir C-terminal üç-sistein kümesi içeren bir RecB benzeri nükleaz olan Cas4 proteini ile füzyonudur. Bu füzyon, Cas4'ün spacer edinimindeki rolünü gösterebilir (Van der Oost et al., 2009).

Cas2 geni tipik olarak cas1 geninin hemen aşağısında bulunur ve yaklaşık 100 amino asitlik küçük bir proteini kodlar. Cas2 ve deneysel olarak karakterize edilmiş toksin-antitoksin (TA) sistemlerinden birinin VapD toksin alt birimi arasında yapı ve dizi benzerliği vardır (Daines et al., 2004; Makarova et al., 2006; Kwon et al., 2012). Bu, CRISPR-Cas ve TA sistemleri arasında fonksiyonel bir bağlantı olduğunu ileri sürmektedir; Cas2'nin interferazlara benzer bir aktiviteye sahip olan bir endoribonükleaz olması muhtemel olduğu ileri sürülmektedir. Bu proteinler bir RRM (ferredoxin) katını benimser ve homodimerleri oluşturur. *Sulfolobus solfataricus*'tan (Sso1404) Cas2 proteini için ribonükleaz aktivitesi deneysel olarak gösterilmiştir. İn vitro olarak, bu proteinin, 30- tarafındaki fosfodiester bağlantısını ayırdığı ve U-zengin dizileri tercihiyle 50-fosfat ve 30-hidroksil-sonlandırılmış oligonükleotitleri ürettiği gösterilmiştir. Alanin taraması, öngörülen N-terminal katalitik aspartat dahil olmak üzere ribonükleaz aktivitesini etkileyen bir dizi tortu ortaya çıkarılmıştır. (Beloglazova et al., 2008). Bununla birlikte, *Desulfovibrio vulgaris* kaynaklı Cas2 için, N-terminal aspartatın korunmasına rağmen, ne nükleaz aktivitesi ne de ssRNA veya ssDNA bağlanması gösterilememiştir (Samai et al., 2010). Halen, farklı organizmalardan Cas2 proteinlerinin gerçekten işlevsel olarak ayrı olup olmadığı veya Cas2 proteinlerinin biyokimyasal özelliklerinde farklılıkların izolasyon prosedürleri ve tahlil koşullarında tanınmayan farklılıklar nedeniyle ortaya çıktığı hala belirsizliğini koruyor

2.5.3.2 Müdahale için gerekli DNaz: HD domaini

CRISPR ile ilişkili HD nükleaz, tüm Tip I ve Tip III sistemlerinin bir bileşenidir. Çoğu Tip I sistemde, HD domeini Cas3 helikaz ile bir N-terminal füzyonu oluşturur, ancak bazı Tip I-A sistemlerinde tek başına bir gen olarak görünür (cas300). Birkaç Tip I – C sistemi (örneğin GSU0051), HD alanını Cas3 ile C-

terminal füzyonu olarak içerir. Sınırlı sayıda Tip I-E sisteminde Cas3 proteini (HD ve helikaz alanları) bir Cascade alt ünitesine füzyon oluşturmaktadır.(Cse1) (Westra et al., 2012). Çeşitli Tip III CRISPR-Cas sistemlerinde HD alanı, Cas10 proteinine kaynaşmıştır. Bu Cas10-HD füzyonlarının bazılarında HD alanı, N-terminali metal bağlayıcı histidinin aşırı C-terminaline yer değiştirmesi için dairesel bir permütasyon gösterir. Bununla birlikte, Cas10'd'nin (Alt Tip I-D) HD alanı, Cas3'te bulunan HD etki alanına benzer yapan dairesel permütasyon göstermez.

Farklı CRISPR-Cas sistemlerinden birçok HD alanı deneysel olarak incelenmiştir ve iki kristal yapı çözülmüştür (phanb: *Methanocaldococcus jannaschii*'den pdb: 3S4D ve *Thermus thermophilus* HB8'den 3SKD. Özel olarak, ATP'ye bağlı helikaz aktivitesine ek olarak, Cas3'ün HD alanına eşlenen ATP-bağımsız nükleaz aktivitesini de gösterdiği gösterilmiştir (Sinkunas et al., 2011); ek olarak, HD alanının kendisinin metal bağımlı tek iplikli DNA endonükleaz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu analizler yakın zamanda *E. coli* Cas3 kullanılarak doğrulanmıştır (Westra et al., 2012). Genel olarak, HD alanının bildirilen özellikleri, Cas3'ün, CrRNA-güdümlü hedef DNA bağlanması üzerine Cascade tarafından maruz bırakılan DNA bölgesini parçalayarak çalıştığı hipotezi ile uyumludur.

2.5.3.3 Cascade-İlişkili Proteinler

Ekspresyon ve transkript işleme, CRISPR-Cas aracılı immünitinin en iyi karakterize edilen aşamasıdır. Bir CRISPR lokusunun uzun primer transkriptinin (crRNA öncesi) kısa crRNA'larda işlendiği gösterilmiştir. Ön-crRNA'nın işlenmesi, bir Cascade alt ünitesini (antiviral savunma için CRISPR ile ilişkili kompleks olarak işlev gören cas genleri tarafından kodlanan endoribonükleazlar tarafından katalize edilir, örneğin birkaç Casprotein'den oluşan kompleksin veya tek başına enzimler olarak, Archaeon *Pyrococcus furiosus*'un Cas6'sı (Carte et al., 2008; Hale et al., 2009) İkinci durumda, çok-birimli bir kompleks (Tip III-B sisteminin Cmr kompleksi olarak

adlandırılır) oluşumu da gözlenmiştir (Hale et al., 2009; Zhang et al., 2012) Son zamanlarda, iki ek Cas protein kompleksi tanımlanmıştır: Birincisi, *P. aeruginosa*'daki Tip I-F sistemiyle ilişkili Csy kompleksidir. CRISPR transkripsiyon işleme endoribonükleaz, Cas6'nın bir homologu olan Cas6f (Csy4)'dır. İkinci kompleks, *S. solfataricus*'a ait bir (arkeal) Cascade'dir. Cascade komplekslerinin Tip I CRISPR-Cas sistemlerindeki genel özellikleri şunlardır: (1) görünüşte crRNA bağlanmasıyla ilgili olan Cas7'nin çoklu alt birimleri; (2) Cas7 ve Cas5 proteinleri arasında güçlü ilişki; (3) Cas6'nın Cascade ile gevşek birleşimi; Cas6 bazı organizmalarda eksik; (4) eğer varsa büyük (Cse1 / CasA) ve küçük alt üniteler (Cse2 / CasB) arasında gevşek bir ilişki. *E. coli* Cascade alt birimlerinin etkileşimlerinin ve düzeninin detayları yakın zamanda kriyo-elektron mikroskobu kullanılarak açıklanmıştır. Aynı zamanda, hedef DNA'da kısmi veya mükemmel bir eşleşme bulduktan sonra, Cascade'nin DNA molekülü boyunca hareket ettiği, zaman zaman CRISPR lokusuna dahil edilecek parçaları seçtiği de gösterilmiştir (Dat-senko et al., 2012).

Birkaç Cas6 homologunun kristal yapıları çözülmüş ve Cascade kompleksi tarafından üretilen bölünme ürünlerinin yapıları karakterize edilmiştir. Tüm Cas6 homologları, bir çift RRM katmanı benimsemelerine rağmen (mevcut Cas6f yapıları durumunda, ikinci RRM katının ağır şekilde çarpık olmasına rağmen) ve nükleaz için çok önemli olan N-terminal RRM alanının ilk beta dizisinden sonra bulunan korunmuş bir histidine sahiptir. Katalizde yer alan diğer tüm amino asitlerin Cas6 familyaları arasında farklılık gösterdiği görülmektedir. Ön-crRNA'nın ayrılması, bir fosil-diester bağının 50 tarafında, bir 50 uçlu hidroksil grubu ve bir 30 fosfat (Cas6f) veya bir 20, 30 uç siklik fosfat grubu (Cas6e) üreten bir CRISPR tekrarı içinde meydana gelir ve yaklaşık 60 nt büyüklüğünde crRNA'yı verir (Jore et al., 2011a; Wiedenheft et al., 2011). Ön-crRNA'nın işlenmesindeki rolüne ek olarak, olgun bir crRNA'ya bağlanan Cascade kompleksi, crRNA içindeki bir aralayıcıyı hedef ssDNA ile eşleştirmek için R-loop oluşumunu teşvik ederek girişim aşamasında yer alıyor gibi görünmektedir (Jore et al. 2011b).

2.5.3.4 RAMP'lerin Üç Büyük Ailesi

Cas proteinlerinin ilk sistematik sekans karşılaştırması, glisin bakımından zengin bir ilmeğe odaklanarak , birbirine sınırlı benzerlik gösteren geniş (süper) bir çeşit protein ailesinin tanımlanmasına yol açmıştır. Bu proteinler, Cas proteinlerinin başlangıçta farklı bir onarım sistemini temsil ettiği düşünüldüğünden RAMP (Onarımla İlişkili Gizemli Proteinler) olarak işaretlenmiştir. (Makarova et al. 2002). Daha sonra, Cas proteinlerinin CRISPR ile ilişkisi gerçekleştiğinde, bu süper ailenin adı, RAMP kısaltması hayatta kalarak Tekrar İlişkili Gizemli Proteinler olarak değiştirildi. RAMP'lerin mevcut birkaç kristal yapısının karşılaştırılması, hepsinin, RNA Tanıma Motifi (RRM) alanının (ayrıca bir ferredoksin benzeri kat olarak da tarif edilir) farklı formları içerdiğinin farkına varılmasını sağlamıştır(Barrangou et al. 2007).

Cas7'nin (Csa2) Crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*'tan (sistem Tip I-A) kristal yapısı hakkındaki rapor, RAMP'lerin kapsamlı bir şekilde sınıflandırılması için önemli bir atılımdı. Bu yapı, Cas6 proteinlerinin N-terminali RRM alanına yapısal olarak benzer olan tek bir RRM alanını kapsar. Ek olarak, Cas7 RRM çekirdeği ve bir C-terminal uzantısı içinde dört kesici uç içermektedir (Lintner et al., 2011). Bağımsız dizi analizi, Cas7 ailesi ile Tip III CRISPR-Cas sistemlerinden olanlar dahil olmak üzere diğer RAMP aileleri arasında açık bir benzerlik göstermiştir. Tüm RAMP ailelerinde korunan birkaç dizi bloğu, RRM bölgesinin çekirdek elemanlarını ve RRM katının ikinci beta zincirinden hemen önce bulunan korunmuş bir glisin içeren bir ek içerir (Makarova et al. 2011).

Cas7 ailesinin RAMP süper ailesine ait olduğunun gösterilmesi, RAMP'ler arasındaki ilişkilerin detaylı analizine yol açtı. Mevcut tüm RAMP yapılarının, ikincil yapı kestirimi ve dizi profili aramalarının karşılaştırılması sonuçlarını birleştirerek, RAMP üst ailesi üç ana aileye sınıflandırılabilir: Cas5, Cas6 ve Cas7 .

Cas5 familyası RAMP'ler (Cas5 / COG1688, Cmr3 / COG1769, Csm4 / COG1567, Csy2, Csc1), çoğu durumda profil araştırması ile tanımlanabilecek olan

sekans benzerliği temelinde birleştirildi ve çoğu durumda G-zengin döngü Cas5 ailesi, biri iki RRM alanı içeren, diğeri ise tek bir RRM alanı içeren iki ayrı alt aileden oluşur.

Cas6 ailesi, uygun Cas6 proteinlerini (COG1853 / COG5551) ve ayrıca I-E (Cas6e) ve I-F (Cas6f) CRISPR-Cas alt tiplerinden yüksek oranda ayrıştırılmış homologları içerir. Bu grup mevcut yapılar tarafından desteklenir ve her ailenin temsilcileri için bildirilen işlevlerle uyumludur. Cas6 proteinlerinin çoğu, genişletilmiş yapıdaki bir "flanş" ile bağlanan ve ikinci RRM alanının son ipinin yukarısındaki glisin bakımından zengin bir ilmek içeren, iyi tanımlanmış iki RRM alanını kapsar. Dolayısıyla, Cas6 familyasının atası, iki RRM alanına sahip olduğu için güvenle çıkar. Cas7 ailesi, Tip I sistemlerin çoğunda (COG1857) bulunan Cas7 proteinlerini ve çoğunlukla Tip III CRISPR-Cas sistemleriyle ilişkili olan çeşitli RAMP'leri içerir. Tüm bu proteinler, yakın zamanda rapor edilen Cas7 yapısının incelenmesi, sekans karşılaştırması ve ikincil yapı tahmini ile gösterildiği gibi ek ayrıntılara sahip tek bir RRM alanı içerir. RAMP'lerin dizilerinin ve yapılarının çeşitliliği ve zayıf korunması, üç ana grup arasındaki evrimsel ilişkilerin açıklanmasını engellemektedir. Sadece RAMP'lerin alan mimarileri arasındaki ilişki göz önüne alındığında, en basit evrimsel senaryo, Cas7'ye benzeyen tek bir enzimatik olarak aktif RRM alanı ve Cas7'ye benzeyen tek bir çoğaltmaya sahip olan atalara ait bir RAMP'yi içerecektir. Cas5 ve Cas6'nın varsayılan ortak atası, daha sonra birkaç Cas5 ve Cas6 soyunda C-terminali RRM alanlarının bozulması veya yer değiştirmesi ile birlikte (Makarova et al. 2011).

2.5.4 CRISPR-Cas Çeşitliliği

CRISPR-Cas sistemleri immün sistemin hızlı evolüsyonundan dolayı oldukça farklıdır. CRISPR lokus analizleri sonucunda CRISPR repeat sekanslarında, Cas gen sekanslarında ve Cas-operon yapılarında 3 temel farklılık ortaya çıkmıştır. CRISPR-Cas sistemi kendi içinde 3 ana tipe ve daha çeşitli alttiplere ayrılmıştır. Herbir tip bir spesifik Cas proteinine sahiptir; tip1 sistemleri Cas-3 nükleaz-helikaz içerir, tip2 sistemleri Cas-9 nükleaz tarafından tanımlanır ve tip 3 sistemleri fonksiyonu bilinmeyen büyük bir protein olan Cas10'a sahiptir. Tip 1 ve Tip 3 sistemlerinin

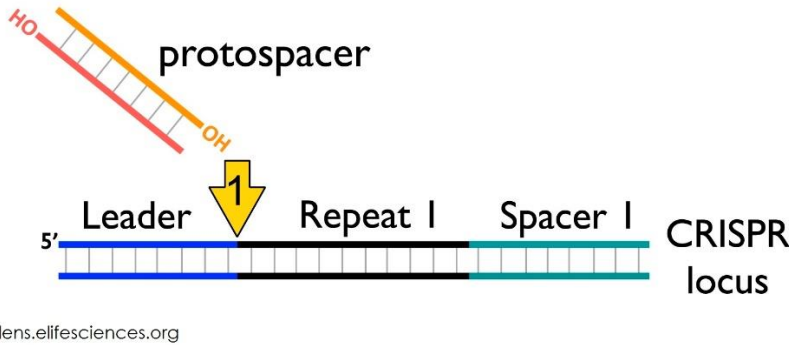
uzaktan ilişkili olduğu görülmesine karşın tip 2 sistemleri filogenetik ve yapısal olarak farklıdır. İşgalci nükleik asitlerin kesimi ve hedeflenmesi amacıyla crRNA ve Cas proteinlerinin bileşimi isimlendirilmede kaynak olmuştur. Tip 1-A'dan Tip 1-F'ye crRNP kompleksleri CAscade (Antiviral savunma için CRISPR ilişkili kompleks) olarak bilinirken tip 2'deki bütün crRNP'ler (tip 2-A,B,C) cas-9 kompleksleri olarak bilinir. Ayrıca tip 3-A crRNP kompleksleri Csm kompleksi olarak bilinirken, tip 3-B sistemleri Cmr kompleksi olarak bilinir.

Tip 1 ve tip 3 CRISPR-Cas sistemleri filogenetik olarak farklı arkea ve bakteryanın çeşitli kombinasyonlarında bulunmasına karşın farklı tip 2 sistemleri (Bazen diğer CRISPR-Cas tipleriyle kombine olur) bakteriler için sınırlıdır. İlginç olarak CRISPR-Cas sistemleri viral genomlarda ve plazmidlerde de bulunmuştur. Filogenetik çalışmalar bu sistemlerin horizontal gen transferi yoluyla sıkça değiştiğine örnektir. Onların çeşitliliğine rağmen bütün Cas proteinleri kendi içinde 4 fonksiyonel kategoride gruplandırılır; 1) spacer kazanımı ile ilişkili nükleazlar ve ya rekombinazlar, 2) crRNA kılavuzunun katalizi, ribonükleaz, 3) RNA ile kılavuzluk yapan crRNP kompleksi 4) DNA ve ya RNA'yı degriden eden nükleaz (Barrangou et al. 2007).

2.5.4.1 Spacer Kazanımı

Yeni işgalci kaynaklı spacer'ların kazanımı genellikle CRISPR lokusunun lider ucuna ilerler, bunun sonucunda önceden girmiş yabancı nükleik asit kronolojik olarak kaydedilir. Çoğu güncel deneysel bilgiler adım adım yeni spacer kazanımını destekler. İşgalci DNA'nın tanınması ve parçalanması bu prosesin ilk basamağı gibidir. Son çalışmalarda *Streptococcus thermophilus*'da Cas sistemleri ve R-M sistemleri arasında sinerji olduğu yayınlanmıştır ve R-M sistemi tarafından kazanılan işgalci DNA fragmentinin spacer kazanımı için potansiyel substrat olmasıyla desteklenir. CRISPR-Cas sistemi uygun spacer'ı spesifik PAM'ı (Protospacer adjent motif) bulmasıyla seçer, ardından DNA substratını spacer perkürsörlerinin tanımlanan boyutuna işler. (Datsenko et al., 2012), Sonra 2 dizideki karşılıklı bölgelerdeki tekrar (repeat) bölgelerin kesilmesiyle lider uçtaki repeatlar açılır, yeni spacer spesifik PAM

bağımlı oryantasyona girer. Desteklenen bu modelde lider uçtaki tekrar, spacer kazanımı sırasında duplike olur. Yeni bir spacer'ın CRISPR lokusuna katıldığı bölge aşağıda şekil 2'de gösterilmiştir. Ek olarak MGE'den (non-self DNA) kazanılan kromozomal DNA(self DNA) fragmenti olan DNA bazen yeni CRISPR spacerları olarak integre olur. Ama bu kendikendine hedeflenen spacer'lar sitotoksititeyle ilişkili olmasına rağmen, onların genomda varlığı tipik olarak modifiye edilmiş PAM ve ya inaktif CRISPR-Cas sistemi ile ilişkilidir. Hedef kesimi için temel olan Cas proteinlerinin yokluğunda kromozomdan türetilmiş spacerların kazanımı gözlenir, ama plazmid kaynaklı spacer'ların kazanımından en az 100 kat az sıklıkla ortaya çıkar (Semenova et al. 2011).



lens.elifsciences.org

Şekil 2 Yeni bir spacer'ın CRISPR lokusuna katıldığı bölge

2.5.4.1.1 Cas 1 ve Cas 2'nin İlişkisi

Bütün CRISPR-Cas sistemlerinde tam korunmuş Cas 1 ve Cas 2 nin birlikte yeni spacerların katılımı için gerekli olduğu bulunmuştur. Aynı anda salgılanan Cas 1 ve Cas2, spacer kazanımına izin vermesine rağmen adaptasyon prosesinde kesin fonksiyonu anlaşılmamaktadır. Cas 1; dsDNA, ssDNA ve dallanmış DNA'nın kesimini katalizleyen metal bağımlı bir endonükleazdır. Homodimerik Cas 1 proteininin kristal yapısı, amino terminal β -strand domaini ve karboksi terminal α -helikal domain içerdiğini gösterir. C-terminal bölgesi divalent metal iyonu için korunmuş bağlanma bölgesi içerir ve in vitro DNA degradasyonu ve in vivo spacer kazanımı için daireseldir. Metal bağlanma bölgesi, C-terminal alan yüzünün karşı şeridinde pozitif yüklü temel residü kümeleri tarafından çevrilmiştir. Bu yüzey DNA

bağlanması içerir ve aktif bölgede metal iyonlarına yakın substratların yerleştirilmesiyle ilişkili olabilir. (Yosef et al. 2012).

Metal bağımlı nükleaz olan Cas 2; 4 antiparel β -yapısı ile 2 α -heliks birlikte konumlanmış RAMP benzer katlanmış tipik $\beta 1\alpha 1\beta 2\beta 3\alpha 2\beta 4$ dizilişi içerir. Cas 2 yapısındaki β -sheet'ler β sandviç yapısındadır ve korunmuş aminoasitler dimer arayüzeyine konumlanmıştır. Herbir protomerdeki korunmuş aspartik asit residüsü; dimer ara yüzeyine yerleşmiştir, onların montajını etkilemez ama metal iyonunun bağlanmasını aksatır ve nükleaz aktivitesini engeller. Çeşitli çalışmalarda yayımlanmasına rağmen Cas2 proteinleri endoribonükleazdır, diğer Cas2 proteinleri dsDNA'nın kesilmesini katalizlediğinden bunlar deoksiribonükleazlardır. Düğümlerde(Loop) ki farklılıklar, substrat seçimindeki farklılığı açıklar. Örneğin; Cas2 proteinleri $\alpha 2$ 'den $\beta 4$ 'e bağlanan uzun düğüm içerdiğinden dar substrat bağlayan yarığa sahiptir ve ribonükleazlara karşıdır. Buna karşın uzun $\beta 1$ - $\alpha 1$ düğümü içeren Cas2 proteinleri geniş substrat bağlayan yarık içerir ve deoksiribonükleaz aktivitesine karşılık gelir.

2.5.4.1.2 Spacer Kazanımı ile İlgili Diğer Faktörler

Cas1 ve Cas2 ortaklığına ek olarak spacer kazanımında ilişkili olabilen çeşitli aksesuar faktör belirtileri vardır. *E.coli*'deki Cas1in genel DNA tamir ve rekombinasyonla ilişkili housekeeping protein RuvB ve RecBCD ile etkileşimi bunu göstermiştir. Gen füzyonunun ve korunmuş gen kümelerinin birkaç olayı CRISPR kazanımında Csn2, Cas4, Cas1 ve Cas3 gibi ek Cas proteinlerinin gerekli olabildiğini göstermiştir.

Csn2 bütün tip 2-A sistemleri tarafından kodlanır ve *Streptococcus thermophilus*'da CRISPR adaptasyonunda ilişkili olduğu gösterilmiştir. Yüzük şeklindeki tetramerik kompleks Csn2 , DNA fragmentine bağlanan pozitif yüklü boşluğa sahiptir. Bariz Csn2 katalitik aktivitesi eksikliği spacer kazanımı sırasında bir aksesuar role sahip olduğunu göstermiştir.(Örneğin; spacer katılımında çift ipliğin kesiminin stabilize edilmesi) (Barrangou et al. 2007).

Cas4 ve Csa1, RecB- ve AddB tip nükleaz-helikaz ile benzer aminoasid sekansı gösterir. Sulfolobus solfataricus'taki Cas4 protein DNA hedefleyen 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi olan yüzük biçimli dekamerdir. Ek olarak, bazı Cas4 homologlarının helikaz aktivitesi kadar iyi endonükleaz aktivitesi gösterdiği yayınlanmıştır. Cas1 ve Cas4 ün füzyonu (birleşimi) çeşitli bakteriyel ve arkeal tip 1 ve tip 3 sistemlerinde açığa çıkar ve 2 proteinin fonksiyonel olarak ilişkili olduğunu gösterir. Thermoproteus tenax'daki Cas4'ün, Cas1-Cas2 füzyon proteini ve Csa1 ile bir kompleks oluşturduğu gösterilmiştir. Ama bazı kompleksler doğal sistemlerden izole edilememiştir. Ayrıca bu füzyon proteinlerinin (Cas4-Cas1 ve Cas1-Cas2) bu kompleksleri stabilize edilmesine katkıda bulunduğu olasıdır. (Lintner et al., 2011)

Cas 3 tip 1-F sistemlerinde Cas2 ile birleşmiş çokdomainli nükleaz-helikazdır. Pectobacterium atropiticum'un tip 1-F sisteminde Cas1 ile Cas2- Cas3 füzyon proteini arasında direkt etkileşimin ortaya çıkması Cas3'ün çift role sahip olduğunu önerir, CRISPR müdahalesi sırasındaki işleyişi spacer kazanımındaki kadar iyidir. Cas3'ün hem müdahale hem kazanım sırasındaki önerilen rolü spacer kazanım öncüsü olarak bilinen fenomen ile ilişkili olabilir. Priming (ateşleme) önceden girmiş genetik elementlerden yeni spacer kazanımını hızlandıran pozitif geri besleme düğümü olarak adlandırılır. Tip 1-E sistemlerinde bu proses Cas1, Cas2, Cas2-crRNA ile çoklu Cas proteini (Cascade) karışımı bir RNP kompleksi gerektirir. Ama ateşlenmiş spacer kazanım mekanizması tam bilinmemektedir.

2.5.4.2. crRNA Biogenesis

Olgun crRNA'lar, genom işgalcilerle karşı CRISPR-Cas savunmasında kilit unsurlardır. Bu kısa RNA'lar, Cas proteinlerini / proteinlerini, yok edilmeleri için istilacı nükleik asitlere yönlendiren benzersiz tekrarlar / aralayıcı dizilerden oluşur. Olgun crRNA'ların biyogenezi, oldukça hassas işleme olayları içerir. İlginçtir ki, farklı CRISPR-Cas sistemleri farklı belirgin crRNA'lar geliştirmiştir. CRISPR tekrar-aralayıcı dizisi, bir veya iki olgunlaşma basamağından geçen bir prekürsör CRISPR RNA molekülü (ön-crRNA) olarak kopyalanır. Tip I CRISPR-Cas sistemlerinde, ön-crRNA, tekrarlanan bölgeler içerisinde belirli bir Cas6 benzeri

endoribonükleaz ile tekrar bölgelerinde bölünür; bazı durumlarda, olgun crRNA'ları elde etmek için bir Cascade kompleksinin alt birimi rol alır. Tip III sistemlerde, bağımsız endoribonükleaz Cas6, tekrarları içinde bölünerek ön crRNA'yı işleyerek Endoribonükleaz III protein Cas9 (Csn1) varlığında olgun crRNA'ları üretmek için daha fazla kesilmiş bir ara molekülü üretir. Oluşturulan ara ürünler daha sonra henüz açıklanmayan bir mekanizma ile daha fazla olgunlaşmaya tabi tutulur (Barrangou et al. 2007).

Olgun crRNA'ların biyogenezini üç aşamaya ayrılabilir. İlk adımda, uzun bir primer transkripsiyon veya prekürsör crRNA'nın (crRNA öncesi) transkripsiyonu, CRISPR tekrar-aralayıcı dizisinden önceki liderin yukarısında bulunan bir promotörden transkript edilir. İkinci aşamada, kesim , ön-crRNA kısmi tekrar dizileri ile çevrili bütün aralayıcı diziden oluşan ara crRNA'ları elde etmek için tekrarlar içinde belirli bir bölgeden kesilir. Bazı durumlarda, işleme, ek bir aşama, aktif olgun crRNA'ları üreten ara crRNA'nın ikinci bir nükleolitik işlemiyle ilgilidir. (Barrangou et al. 2007).

CRISPR-Cas'in çeşitli (alt) tiplere ayrılması, geniş Cas protein panelleri ile birlikte, farklı crRNA biyogenez tiplerinin evrimi ile bağlantılıdır. Alt tipler arasında ortak bir tema, ön-crRNA'nın (tek yönlü) transkripsiyonu ve bunu takiben tekrarlar içindeki bir ilk işlem olayıdır. I ve III tiplerinde, Cas6 benzeri bir protein bu basamağı katalize eder. Tip II'de, trans-etkili küçük bir RNA, Cas9 (Csn1) varlığında tekrarlar içindeki endoribonükleaz III aracılı kesim ile ön-crRNA zarını yönlendirir. Tip I (IA, IE, IF) 'den işlenmiş crRNA'lar daha fazla olgunlaşmayacak gibi görünmez, oysa II ve III (ve muhtemelen bazı tip I alt tipler) aktif crRNA'ları, farklı bileşenleri ve benzerlerini üretmek için ikinci bir olgunlaşma basamağını geliştirmiştir.

CRISPR araçlarının transkripsiyonunu bir uzun transkript prekürsörü üretir (pre-crRNA olarak bilinir)Pre-crRNA'nın birincil prosesi tekrar sekanslarının Cas6 homologlarının endoribonükleotik kesimiyle ve ya RNAase 3 ile ilişkilidir.

2.5.4.2.1 Tip 1 ve Tip 3 sistemleri

Tip 1 ve tip 3 sistemlerinde Cas6 benzeri nükleazlar pre-crRNA'nın birincil prosesinden sorumludur. Cas6 homologları genel olarak 2 RAMP domaini içermesine rağmen, önemli yapısal çeşitlilik seviyesi açıklanmıştır.

Yapısal çeşitliliğe rağmen Cas6 enzimleri spesifik olarak transkriptin tekrar sekanslarındaki tek fosfodiester bağına hidrolizleyerek pre-crRNA'yı keser. Bunun tipik sonucunda crRNA'da repeat kaynaklı 5' ucunda 8 nükleotide sahip olur ve takiben spacer sekansı tamamlanır ve bazı sistemlerdeki repeat kaynaklı 3' ucu saç tokası yapısı oluşturur. Cas6 çeşitleri crRNA'lar oluşturan metal-bağımsız endoribonükleazlardır, 5' hidroksi grubu ve herbir 31 fosfat yada 2'-3' fosfata sahiptir. Bu Cas6'nın genel asit baz mekanizmasına sahip olduğunu gösterir, Cas6 benzeri enzimlerle karakterize edilmiş bütün katlitik bölgeler değişmez histidin residüsü, bir triosin ve ya serin residüsü ve bazı durumlarda bir lizin residüsünden oluşmuştur. Ama bu residülerin yakın pozisyonları az korunduğundan Cas6 aktivitesinde fonksiyonel çeşitliliği açıklayabilir (Barrangou et al. 2007).

Tip 1-E ve Tip 1-F sistemlerinde Cas6 proteinleri (Cas6e ve Cas6f olarak bilinir) keşilmiş crRNA ürünlerine yüksek affiniteye sahiptir. Bu Cascade kompleksininmerkezi bileşenleri olan Cas6e ve Cas6f'nin gözetimi ile tutarlıdır ve onlar crRNA'nın 3' ucundaki saç tokası yapısı ile ilişkili olarak sıkıca kalır[fig4d]. Buna karşı diğer tip 1 sistemlerinde Cas6 çeşitleri ve bütün tip 3 sistemleri yalnız kalan nükleazlar olarak işler ve bu öncül crRNA'ları kendi crRNP komplekslerine teslim eder. crRNA'ların bu komplekslere transferinden sonra 3' uçları nükleotit düzenlemesi için ulaşılabilir. Bu sekonder işlem tip 1-A , tip 1-B, tip1-C ve tip 1-D sistemlerinde kısa 3' uçları ile sonuçlandığı görülür.

Tip 1-C sistemlerinde Cas6'nın yeri bir Cas5 (Cas5e) tarafından alınır ve pre-crRNA'yı olgun crRNA oluşturmak için keser. Bunun sonucunda crRNA 5' ucunda 11 nükleotit ve 3' ucunda 21-26 nükleotit içerir. Cas6'ya benzer olarak Cas5d RAMP proteini ile birlikte aktif bölgede katalitik üçlüden oluşan (triosin, lizin, histidin) ve

Cas6e ve Cas6f ile birlikte Cas5d crRNA ürünleri ve diğer Cas proteinlerinden çokaltbirimli Cascade komplekslerini oluşturmakla ilişkilidir. Diğer bütün tip 1 sistemlerinde katalitik olarak aktif Cas5 homologları Cascade'in altbirimidir ve crRNA'nın 5' ucuyla etkileşime geçtiği öne sürülmüştür.

2.5.4.2.2 Tip 2 sistemleri

Tip 2 sistemlerinde pre-crRNA'ların işlenmesi tamamen farklı mekanizmaya dayanır. Cas operonu ve CRISPR araçlarına ek olarak bu sistemlerin CRISPR lokusu, tracrRNA'yı kodlayan gen içerir. Bu tracrRNA, pre-crRNA'nın repeat bölgesine komplementer olan 25 nükleotitlik sekans içerir. Bu 2 RNA arasındaki baz eşleşmesinin , çift iplikli bölgenin housekeeping ribonükleaz RNAase3 tarafından tanınması ve kesilmesi gereklidir, çoğunlukla RNA molekülünün RNAase3 tarafından kesilmesi için bağlanması ve konumlandırılması gereklidir. RNAase3 tarafından yapılan başlangıç prosesinden sonra crRNA-tracrRNA hibridi , Cas9 ile sıkıca birleşmiş olarak kalır. crRNA spacer'ının 5' ucu (24-27 nükleotit uzunluğunda) bilinmeyen bir nükleaz tarafından kesilir, tipik olarak 20 nükleotit uzunluğunda spacer oluşur. Olgun crRNA-tracrRNA hibridi müdahalenin hedeflenmesi için gereklidir, muhtemelen uygun sunucu ve Cas9daki crRNA'nın pozisyonlandırılması için bir şekilde o Cascade'de crRNA'nın saç tokasına bağlanan analogu olabilir (Garneau et al. 2010).

2.5.4.3. crRNP komplekslerinin montajı (kontrol- içtima)

Olgun crRNA'lar Cas proteinleriyle, kalıcı RNP komplekslerini oluşturma için ilişkilidir. Tip 1 sistemleri Cascade(şelale) denilen çokaltbirimli gözetim komplekslerini oluştururlar. Tip 3 crRNP'lerle ilişkili proteinler filogenetik olarak tip 1 sistemlerinden farklı olmasına rağmen, son çalışmalar tip 1 ve tip 3 crRNP kompleksleri arasında çarpıcı yapısal benzerlik olduğunu göstermiştir. Ayrıca tip 2 kompleksleri (cas9 tek protein bileşenidir) esasen farklıdır.

2.5.4.3.1. Tip1 crRNP kompleksleri

İlk tanımlanmış crRNP kompleksi *E.coli* tip 1-E sisteminin Cascade sistemiydi. Çarpıcı yapısal benzerlikleri nedeniyle, diğer tip 1 çeşitlerindeki crRNP kompleksleri genel olarak cascade olarak adlandırılmıştır. *E. coli*'deki Cascade 1-E (tip 1-E) bir merkez kompleksinden (cas5, cas6, cas7 ve single 61 nükleotit crRNA) ve daha az sıkı ilişkili altbirimden (cse1 ve cse2) oluşmuştur. Bu tamamlanmış kompleks inişli çıkışlı bir sitokimetriye sahiptir; [Cse1]1- [Cse2]2-[Cas5]1- [cas7]6- [cas6] bunun tipik özelliği, bütün tip 1 ve tip 3 crRNP kompleksleri polisistronik mRNA'dan kodlanan kademeli transkripsiyonla kontrol edilir. tip 1-C ve tip 1-F sistemlerinin tüm cascade yapısı, Cas7 (tip 1-F de Cas3), Cas8(tip1-F de Cys1), Cas5(tip1-F de Cys2) ve bir crRNA'dan oluşan helikal omurga yapısı gösterir[fig5a]. İlginç olarak Cascade1-A sistemi, Cas7, Cas8, Cas5 ve Csa5'e (küçük alt birim olarak bilinir) ek olarak ucu kesilmiş Cas3 domaini (helikaz domaini 3' olarak ve nükleaz domaini 3" olarak bilinir) bu kompleksin parçasını oluşturur (Barrangou et al. 2007).

E. coli'deki crRNA'nın 3' ve 5' ucundaki tüm denizati şeklindeki Cascade1-E yapısı, kompleksin karşı ucunda sunuculuk yapar ve 32 nükleotitli spacer sekansı 6 tane cas7 proteininden oluşan helikal omurga gösterir. Bu cascade kompleksinin tipik bir özelliği bu cas7 dizisi, crRNA kılavuzu için ince uzun bağlanmış yarığa sahip bir omurga sağlar. Cascade1-A'nın Cas7'si merkezi RAMP domaini içeren hilal şekilli yapıya sahiptir. Cas7-RAMP domaini bir tipik RNA-tanıma motifine (RRM) benzemesine rağmen onun standart RRM tarafından RNA bağlanmasından sorumlu bazı korunmuş residüerlerin eksik olduğu görülmüştür. 3 boyutlu yapılarındaki oldukça korunmuş residüerlerin haritalanmasıyla, cas7 yapısının yüzeyinde 2 korunmuş küme tanımlanmıştır ve crRNA'ya bağlanma ile ilişkilidir.

2.5.4.3.2. Tip 2 crRNP Kompleksleri

Nükleik asit yokluğunda, kristal yapıda 2 cas9 proteini bulunmuştur. (*S. pyogenes*'den tip 2-A ve *Actinomyces naeslundii*'den tip 2-C sisteminde bulunmuştur) Daha sonra tip 2-A sistemindeki cas9'un yapısının sgRNA ile 20 nükleotitlik DNA

hedefine hibridize olduğu çözülmüştür.(sgRNA: crRNA ve tracrRNA'nın fonksiyonel birleşme mühendisliğidir). Bu yapı cas9'un 2 farklı lob içeren korunmuş yapıya sahip olduğunu gösterir) öncelikli olarak sgRNA'yı koordine eden α helikal- tanıma lobu ve 2) PAM tanınmasından sorumlu ve de sonraki DNA'nın kesiminden sorumlu bir nükleaz lobu. Loblar hedef DNA'nın kesilmesi için ve bağlanmanın engellenmesi için bir pozisyona yönlendirilir. 2 yapısal lobun sgRNA bağlanmasını takip eden bir oryantasyona katlanır ve merkezi kanal formasyonu yapısı, DNA substratının bağlanması için izin verir. ' lobun arayüzeyindeki pozitif yüklü boşluğa lokalize olan RNA-DNA heterodupleksinin olduğu yerde cas9-sgRNA yapısı ile ssDNA hedefinin bir anlaşmasıdır. -HNH ve RuvC iki nükleaz domainin katalitik bölgeleri olan gözetim , kesim için konumlandırılmaz ve R-loop konfigürasyonun Cas9'un en yüksek bileşen kesim seviyesine ulaşmak için gerekli olduğu önerilebilir. (Zhang et al., 2012)

2.5.4.3.3. Tip 3 crRNP kompleksleri

S. solfataricus'taki Tip 3-A kompleksleri (Csm kompleksleri) ve *Pyrococcus friosus* ve *Thermus thermophilus*'daki 2 Tip 3-B crRNP kompleksleri (Cmr olarak bilinir) geçenlerde elektron mikroskobu tarafından görüntülendi. Tip 3 kompleksleri, morfolojik olarak tip 1 Cascade komplekslerindeki Cas7 omurgasına benzer olan çokkopyalı omurgaya sahiptir.(Tip3-A'da Csm3'den ve Tip3-B'de Cmr4'den oluşur). Doğrusu csm3'ün kristal yapısının cas7 nin yapısal homologu olduğu gözler önüne seilmiştir. Cmr komplekslerin konumlanmış tek omurgasının Cascade'deki crRNA'ya benzediği elektron mikroskobunda belirlenmiştir.

Tip 1 ve Tip 3 crRNP komplekslerinin bileşenleri arasındaki yapısal ve fonksiyonel benzerlikler büyükaltbirim ve küçükaltbirim olarak adlandırılmıştır. Çoğu tip1 sistemlerinde büyük altbirimlerin cas8 homologları (cas8a, cas8b, cas8c, cse1 ve cys1) olmasına karşın tip 3 sistemlerinde büyük altbirim cas10 homologlarıdır(Csm1 ve cmr2). Tip1 cascade komplekslerinde büyük altbirim cas5e olarak crRNA 5' ucuna yakın biçimde konumlanmıştır. Benzer olarak tip 3-A csm komplekslerinin doğal kütle spektrometrisinde , Csm1'in büyük altbirimin (cas10

homologu) csm4 (cas5 homologu) ile etkileştiği ortaya çıkmıştır. Ek olarak benzer etkileşim cmr2 (cas10 homologu) ve cmr3(cas5 homologu) 'den oluşan cmr kompleksinin kristal yapısında ortaya çıkmıştır. Tip1-E Cse1'in kristal yapısının (Cas8 homologu) ve tip 3-B altbirim cmr2 (cas10 homologu) 'nin karşılaştırılması bu 2 proteinin bariz benzerlik gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Ama tip 1 ve tip 3 crRNP kompleksinin korunmuş büyük altbirimleri bariz cas10 tarafından cas8'in yerine geçen tip 1-D crRNP kompleksleri kadar iyidir ve bu onların analog rol oynadığını gösterir (Makarova et al. 2011).

2.5.4.4. Hedefin İzlenmesi ve Müdahale

Farklı crRNP kompleksleri tarafından işgalci MGE'lerin hedeflenmesi kademeli şekilde işlenir. crRNA'ya komplementer olan bir protospacer sekansının bulunması, işgalci DNA'nın taranmasını gerektirir, kendinin olmayandan kendi seçimi ve spacer'ın çekirdek bölgesi ve komplementer spacer arasında 7-8 nükleotit baz eşleşmesi ve bunu takiben spacer ve protospacer arasındaki genişletilmiş baz eşleşmesi ve sonunda yerinden çıkarılan ipliğin tamamlanması, crRNA'nın hedef ipliğe hibridizasyonu b,r R-loop yapısı oluşturur, enaz bazı durumlarda crRNP kompleksinde konformasyonel değişimin tetiklendiği görülür. Bu yapısal değişim, trans-acting nükleazı (tip 1 ve tip 3 A) güçlendiren bir sinyal ya da gerçek nükleaz(tip2 ve tip3B) aktivitesine sebep olarak işlev görür.

2.5.4.4.1 tip 1 sistemleri

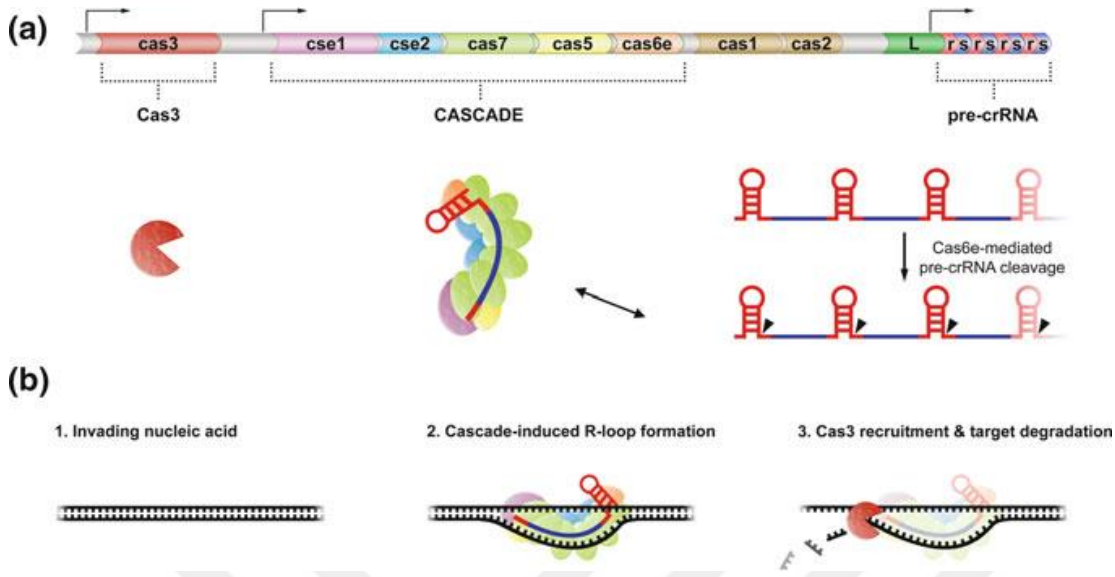
Yabancı DNA'nın taranması, crRNP kompleksiyle işgalci DNA arasındaki non-spesifik etkileşime güçlüce bağlı olduğu görülmüştür. Tip1-E sistemlerinde cascade'in altbirimi cse1, DNA ile non-spesifik birleşme için önemlidir ve otoimmünitenin (kromozomal sekansların hedeflenmesi) önlenmesinde anahtar role sahiptir. yapısal ve biyokimyasal çalışmalar cse1'deki değişken loop'un 3 nükleotitlik PAM motifi ile etkileştiğini gösterir. PAM bir antijenik işaretir ve cse1 tarafından PAM tanınması DNA dubleksini istikrarsızlaştırır, böylece crRNA hibridizasyon için hedef DNAYA bağlanmak için etkinleştirilir. Başarılı müdahale için crRNA

spacer'ının çekirdek bölgesi ile tamamlayıcı hedef protospacerın baz eşleşmesi PAM'a yakın pozisyonlarda esastır. Cascade 1-E sistemlerinde crRNA'nın çekirdek bölgesi , spacerın 5' sınırında 1-5 ve 7-8 nükleotit içerir. Bu çekirdek bölge ile eşleşen mutasyona uğramış hedefler kusurludur, genellikle cascade tarafından tanınmadan kaçarlar. PAM tanınmasının bu durumunda ve başarılı baz eşleşmesinde , istilacı DNA'nın crRNA kılavuzlu ipliği ATP bağımsız şekilde ilerler ve pozitif yüklü 2 altbirim (cse2) tarafından stabilize edilebilen bir R-loop oluşturur (Diez-Villasenor et al. 2010).

Tamamlanmış R-loop formasyonu, Cascade 1-E nin bir temel konformasyonel değişimine ve hedef DNA'nın bölgesel eğilmesine denk gelir. Tip1 sistemlerinde bu yapısal değişimlerin cas3 nükleaz-helikaz'ı kuvvetlendiren tetikleyici olarak görülür. cascade bağlı dsDNA'nın tek parçacıklı E:M çalışmaları cascade'in dolaşmış DNA dubleksini yerleştirdiğini ve bu yolla PAM motifinin cse1 altbirim ile etkileşime geçtiğini göstermiştir. İlginç olarak bu çalışma cascade'in üzerinde cas3, cas5'e yakın cse1 tarafından sağlanan bir bölgede açığa çıkmıştır. Cas 3 ün bir kısmına karşılık gelen bu yeniden yapılanmada cas3 için incelenen yoğunluğa rağmen doğal cas3 bileşimlerinin ile uygundur, örneğin; tip1-E'de cas3- cse1 ve tip1-B'de cas3-cas5 birleşimi gibi (Jore et al. 2011). tip1-E'de girişim aşaması şekil 3'te verilmiştir.

HD nükleaz domaini içeren cas3 bir SF-2 helikaz domaini (süperaille 2 helikaz) ile kaynaşır. Cascade 1-E sistemlerinde daha önce belirtilen loop'un sadece PAM tanıma ile ilişkili olmadığını ayrıca cascade ilişkili cas3 nükleaz aktivitesi için gerekli olduğu kanıtlanmıştır.

Cas3'ün ATP bağımlı helikaz aktivitesi, onun metal bağımlı nükleaz aktivitesiyle birleşerek hedef DNA'nın degradasyonun tamamlanmasına aracılık eder. R-loop ipliğinin başlatıcı endonükleotik kesiminden sonra 3'-5' yönünde ekzonükleotik degradasyon devam eder. Diğer DNA ipliği endonükleotik ve ekzonükleotik yıkıma uğrar (Wiedenheft et al., 2011).



Şekil 3 CRISPR-Cas tip I-E sistemlerinin girişim aşamalarının şematik gösterimi

a İfade aşamasında, transkripsiyon, CRISPR-temelli girişimin üç ana bileşenine yol açar: Cas3, Cascade (Cse1, Cse2, Cas7, Cas5 ve Cas6e'den oluşur) ve bir ön-crRNA. Ön-crRNA, Cascade kompleksine bağlı kalan olgun crRNA üretmek için Cas6e ile ayrılır. b Etkileşim aşamasında, crRNA yüklü Cascade kompleksi, bağlı crRNA'sına tamamlayıcı olan istilacı nükleik asitleri tarayacak ve bağlayacaktır. Cascade'in istilacı nükleik aside bağlanması, sırayla R-ilmek oluşumuna neden olacaktır; Cas3 işe alım için bir sinyal görevi gördüğüne inanılan Cascade kompleksinin bir konformasyonel değişikliğini tetikler. Son olarak, istilacı nükleik asit, Cas3'ün nükleaz aktiviteleri ile nötrleştirilecektir.

2.5.4.4.2 Tip2 Sistemleri

Tip 2 sistemlerindeki müdahale mekanizması tip1 ve tip3 sistemlerden tamamen farklıdır. Tip2 sistemlerde müdahale Cas9 ve 2 RNA içeren (crRNA ve tracrRNA) cas9-RNP kompleksi aracılığıyla yapılır. Cas9 tarafından tamamlayıcı DNA fragmentinin hedeflenmesinin kademeli olarak işlendiği son deneylerde gösterilmiştir. Yukarıda bahsedildiği gibi sgRNA tetikleyicilerinin yapısal yeniden düzenlemeyle doldurulması, yapısal DNA'ya bağlanan merkezi kanal formasyonuna neden olur. sonra cas9-RNA kompleksi PAM motifi için DNA'yı tarar. Tip2 sistemleri tarafından hedef DNA'nın taranması ve identifikasyonu tip1 müdahalenin başlangıç adımının aynısıdır; PAM motifi hedef DNA'nın üzerinde bulunur ve crRNA

kılavuzunun 3' ucuna yakın yere konumlanmıştır. Cas9 nükleaz lobunun C-terminal alanındaki ' triptofan içeren esnek loop , PAM tanımayla ilişkilidir ve bu residülerin mutasyonu hem bağlanmayı hem hedef DNA kesimini etkiler. PAM motifi ile etkileşim DNA bağlanması için, DNA ipliğinin değişimi ve PAMda R-loop oluşturmak için gereklidir. Baz eşleşmesi, 12 12 nükleotit çekirdek sekans üzerinde merkezden uzak hedef sekansa doğru ilerler. Müdahalenin son evresi sırasında cas9 , DNA'yı kesmek için onun esas nükleotik aktivitesinin kullanır. Endonükleaz aktivitesi nükleaz lobunda ayrılmış konumlarda 2 aktif bölge tarafından katalize edilir. HNH benzeri nükleaz DNA ipliğini keser ve RuvC benzeri nükleaz yerinden çıkarılmış DNA'yı keser. Cas9 aracılı nükleaz aktivitesi sonucunda spesifik bölgede kör çif iplik uc oluşur ve protospacer'ın 3' ucunda tipik olarak 3 nükleotit oluşturulur (Jansen et al., 2002).

2.5.4.4.3 Tip 3 Sistemleri

Tip 3-A sistemlerinin Csm kompleksleri tipik olarak en az 5 farklı protein (csm1-5) içerir ve crRNA 5' ucunda korunmuş 8 nükleotit ve değişken 3' ucu içerir. Mekanistik detayların altında kalan tip3-A sistemleri kendi DNAsını , kendinden olmayan DNA'yı PAM bağımlı davranışla Cas10 benzeri csm1 proteinin ilişkisi imkanıyla ayırt eder. Tip 1 sistemlerine benzer olarak crRNA'nın spacer bölgesinin 5' ucunun bir çekir sekansı içerdiği öne sürülmüştür. Tip3A sisteminin in vivo DNA hedeflenmesi gösterilmiştir ama in vitro DNA yıkım aktivitesi şüana kadar yoktur. Genetik analizler bir ek protein csm6 (csm1 olarak bilinir) müdahale için gerekli olduğu kanıtlanmıştır. Tip 1 sistemlerinde Cas3 'e analog olan cas6 DNA müdahalesini kuvvetlendiren bir nükleaz ve ya helikazdır. (Hatoum-Aslan et al. 2011)

Tip 3-B sistemlerinin cmr kompleksleri enaz 6 farklı protein (cmr1-6) içerir. onlar CRISPR cas sistemlerinde DNA'yı hedefleyen benzersiz sistemlerdir. Hedef RNA'nın T. thermophilus cmr kompleksi tarafından 4-5 farklı bölgede kesildiği gösterilmiştir. fig5d. RNA hedefinin kesimi 3'-5' yönünde 6 nükleotitlik aralıkta gerçekleşir. RNA hedefinin sekansal doğranması ek 2 cmr kompleksi tarafından doğrulanır. Spacer'ın 5' ucundaki çekirdek benzeri sekans belirlenmiştir. Düzenli

olarak araları boşluk bırakılmış cmr kompleksleri modeli yalnız kompleksin omurgasında çoklu katalitik bölge içerir. (Carte et al., 2008)

Sulfolobus islandicus'taki 2 cmr kompleksi (cmra ve cmrbeta) faklı gen kümeleri tarafından kodlanır. Cmr alfa kompleksi (cmr1 ve cmr6dan oluşur) plasmid DNAsını hedefler ve hedefinin transkripsiyonu için gerekli csm1 bağımlı mekanizmayı kullanır. Buna karşın *sulfolobus solfaticus* cmr-beta kompleksi (cmr1 ve cmr7den oluşur) invitro RNA hedefler ama katalitik metabolizması tip3-Bden farklı olduğu yayınlanmıştır.

2.5.4.4.4 *E.coli* de DNA Müdahalesi

E.coli CRISPR-cas sistemi CRISPRın downstream bölgesinin 8 cas proteinini kodlar ve 5 cas proteinini crRNAYA bağlanan antiviral savunma için CRISPR ilişki kompleks (Cascade) olarak adlandırın efektor içine birleştirir. Ec-cascade sistemindeki 61 nt crRNA , 8nt 5' ucu ve 3' ucu 21 nt çevrili 32 nt spacer'dan oluşur ve bunun sonunda pre-crRNA cas6e endoribonükleaz tarafından kesilir. Ec-cascade crRNAYı hedef DNanın kılavuzu olarak proseste kullanır. Eğer protospacer'da PAM motifi varsa komplementer DNA ipliği bir R-Loop (düğümü) oluşturur. Başlangıç olarak, 5'-AWG-3' PAm cascade'in bağlanması için ve DNA müdahalesi için gereklidir. Diğer yandan CRISPR repeat sınırlarının deneysel çalışmaları PAM gibi 5'-AWG-3' dinükleotitindeki son G nükleotitinin protospacer sekansına ait olduğunu gösterir. *E coli*'deki yeni spacer katılım mekanizmasını PAM sekansı tanımlar , ve 2nt protospacer'ın dışından ve 3nt G protospacer'ın integral kısmından alınır. Ec-cascade'in Low resolution EM'si denizati şeklini açığa çıkarmıştır. Ec-cascade , 6 cas7 kopyasını bir helikal yapı içine birleştirir ve bu yapı crRNA için bağlanma platformu oluşturur ve diğer cas proteinleri ile fiziksel olarak bağlantılı bir iskele gibi etkiler. Korunmuş repeat bölgesinden orjinlenen crRNAnın 3' ve 5' ucunun ikiside cas6e ribonükleaz ve 5' proksimal cas7/cse1 altbirimi ile etkileşimi tarafından demirlidir. Öte yandan cas7 oligomerine katılan cse2 dimeri crRNA spacer'ının 3' için geniş bağlanma yüzeyi oluşturur ve crRNA cas7 oligomerleri tarafından yapılan bir helikal yapı üzerinde görülür. Bu tür bağlanma modu DNAYı degradasyondan

korur ama bir komplementer hedef DNA ile potansiyel baz eşleşmesini sürdürür. R-loop formasyonunda sonuçlanan Ec-cascade'in hedef bölgeye bağlanması bir karmaşık prosestir; yabancı nükleik asidin tanınması, PAM lokalizasyonu ve uygun DNA ipliğine crRNA'nın hibridizasyonu evrelerini içerir. Cse1 altbirimi muhtemelen cascade tarafından PAM tanınmasında ilişkilidir, aynı zamanda cas3 nükleaz-helikaz için yerleştirme bölgesi olarak görev yapmaktadır. Ayrıca hedef DNAdaki PAM'a yakın sadece 7 nükleotidine Ec-cascade bağlanması için dairesel olduğu görülür ve microRNAlardaki çekirdek sekanslarına benzer bir rol oynadığı önerilmektedir. E colideki crRNA çekirdek sekansı, iyi bir eşleşme için yabancı DNAnın taranmasında bir rol oynayabilir. İlk DNA ipliğinin açılması , PAM sekansına bağlanan Ec-cascade üzerine açığa çıkan bükülme tarafından teiklenmiş olabilir ve bir negatif supercoil tarafından organize edilir. (Kunin et al. 2007).

3. MATERYAL VE METOD

3.1 MATERYAL

3.1.1 Besiyerler ve Biyokimyasal Testler

3.1.1.1 CT-Smac

E. coli O157 bakterileri için seçici selektif bir besiyeridir. 500 ml besiyeri içerisinde 0,025 mg cefixim ve 1,25 mg potasyum tellurit katkısı eklenmektedir. Besiyeri bileşimindeki safra tuzları ve kristal viyole Gram pozitif mikrobiyel biyotayı önemli ölçüde inhibe eder. *E. coli* O157:H7 serotipinin sorbitol negatif olması nedeni ile standart MacConkey Agar besiyeri bileşiminden laktoz çıkartılmış, yerine sorbitol ilave edilmiştir. Dolayısı ile sorbitol negatif olan bakteriler bu besiyerinde renksiz koloniler oluşturur. 35-37° C'da 24 saat inkübasyon sonunda sorbitolu kullanamayan *E. coli* O157:H7 ve diğer bakteriler renksiz koloni oluştururken, sorbitol pozitif olanlar pH indikatörü olan nötral red nedeni ile kırmızı koloni oluştururlar.

3.1.1.2 mTSB Broth

E. coli O157 bakterileri için seçici zenginleştirici sıvı besiyeridir. mTSB broth novobiocin içermektedir. İçerdiği novobiocin gram pozitif bakterilerin üremesini engeller.

3.1.1.3 LB Broth

E. coli'nin çoğaltılıp saflaştırma ve DNA izolasyon aşamasında kullanılan zenginleştirici bir besiyeridir.

3.1.1.4 *E. coli* O 157:H7 latex

Latex testi *E. coli* O157 nin somatic hücre duvarındaki lipopolisakkarit O157 antijenini ile eşleşen antikor ile kaplanmıştır. Lateks ortamında saf koloni bir damla %0.85lik NaCl ile homojenize edilerek *E. coli* O157 antijenlerinin bunlara özgü

antikorlarla birleşmesi sonucu bir çökelti oluşturarak doğrulama sağlamaktadır. Aynı şekilde H7 antiserumu içermektedir.

3.1.1.5 DNA İzolasyon Kiti

Yaptığımız çalışmada *Ecoli* O157 izolatlarından DNA izolasyonu için QIAamp DNA Blood Mini Kit kullanılmıştır.

3.1.1.6 PCR Kiti

“Thermo Scientific PCR Master Mix, DNA kalıbı ve primerler hariç, Taq DNA Polimerazı, dNTP'ler ve PCR için gerekli tüm bileşenlerin 2X'lik bir konsantre çözeltisidir.” Bu master-mix kitin kullanımı ile PCR kurulumu için gerekli olan az sayıda pipetleme aşaması kontaminasyonu azaltırken işlemi hızlandırmaktadır..

3.1.1.7 Primerler

Hedef bölgelerin çoğaltılmasında kullanılan primerler aşağıda tablo 2'de verilmiştir;

Tablo 2 hedef gen bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılan primer çiftleri

| Hedef gen | kodu | Primerler | | |
|-----------|-------------|------------------------------|-----------------------|------------------------------|
| Stx1 | stx1-det-F1 | “GTACGGGGATGCAGATAAAATCGC” | Scheutz et al.,(2012) | |
| | stx1-det-R1 | “AGCAGTCATTACATAAGAACYCCACT” | | |
| Stx2 | Seg-F4 | “GGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGT” | | |
| | Seg-F1 | “ATTAAACTGCACTTCAGCAAATCC” | | |
| CRISPR1 | C1F1 | “TCTCTTCTTTGCAGGGAGGC” | | Díez-Villaseñor et al (2010) |
| | C1F2 | “GAAAATGTCCCTCCGCGCTTACG” | | |
| | C1R1 | “AATAGAACGTCGCTGCCGTGA” | | |
| CRISPR2b | C2bF1 | “CCTCATGTTCAAATAGCTCTCCA” | | |
| | C2bR1 | “CGATCCAGAGCTGGTCGAATG” | | |
| CRISPR2a | C2aF1 | “GGCATTAAATTTTCGCTGGA” | | |
| | C2aR1 | “GAACATGAGGTGTTACGTGGA” | | |

3.1.1.8 TBE çözeltisi

TBE Buffer (Tris-Boric Acid -EDTA), DNA ve RNA agaroz jel elektroforezi için en yaygın kullanılan tampondur. 1000 ml 5X TBE tamponu hazırlamak için 54

gram Tris ve 27.5 gram borik asit tartılır. 800 ml deiyonize su ekleyip, kimyasallar tamamen eriyene kadar karıştırılır. Sonra 20 ml 0.5 M EDTA çözeltisi eklenir, karıştırılmaya devam edilir. Sonrasında pH metre ile karışımın pH'sı kontrol edilir. Optimum çalışma için pH 8.3 olmalıdır. Son olarak Hazırlanan çözelti deiyonize su ile 1000 ml tamamlanır.

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

3.1.2.1 Rotator

E.coli O157 nin manyetik separasyonunda kullanılan cihazdır.

3.1.2.2 Manyetik Rak

İçerisinde demir tozu bulunan ve buna tutanan *E.coli*'lerin ayrıştırılması için kullanılan mıknatıs içeren araçtır.

3.1.2.3 Otoklav

Hirayama Hiclave marka ve HV-50 L model numaralı otoklav, çalışmada kullanılan ekipman ve malzemelerin sterilizasyonu için kullanılmıştır.

3.1.2.4 Hassas Terazı

PRECISA BJ 1000C, model hassas terazi kimyasalların ve besiyeri bileşenlerinin tartımı için kullanılmıştır.

3.1.2.5 pH metre

Inolab WTW model pH metre, tampon çözeltilerin pH değerlerinin kontrol edilmesi amacı ile kullanılmıştır.

3.1.2.6 Thermal Cyclers PCR

GeneAmp PCR system 9700 model cihazı polimeraz zincir reaksiyonu için kullanmıştır.

3.1.2.7 Elektroforez güç kaynağı ve Tankı

Thermofisher elektroforez tankı ve Consort EV265 güç kaynağı agaroz gel elektroforez uygulaması için kullanmıştır.

3.1.2.8 İnkübatör

Sanyo Incubator marka soğutmalı inkübatör *E.coli* O157:H7'nin 37°C üreme koşullarında inkübasyonunu sağlamak amacıyla kullanılmıştır..

3.2 METOT

3.2.1. Gıdalardan *E.coli* O157:H7 aranması

Gıdalardan *E.coli* O157:H7 aranması İvenura Gıda Analiz Laboratuvarı Mikrobiyobiyoloji Biriminde gerçekleştirilmiştir. Numuneler, numune alma prosedürüne göre alınmış olup laboratuvara +4°C'de soğutucularda en geç 4 saat içerisinde laboratuvara getirilmiştir. *E.coli* O157:H7 aranması TS EN ISO 16654 standartına göre yapılmıştır. *E.coli* O157:H7 aranmasında, Karkas et, bütün tavuk eti, kıyım, kuşbaşı et, çiğ hamburger köftesi, donuk sebze gibi numuneler çalışılmış olup bunlardan pozitif gelen bakteriler stoklanarak shiga toksin geninin varlığı araştırmalarında kullanılmak üzere stoklara kaldırılmıştır.

3.2.1.1 Ön Zenginleştirme

Laboratuvara gelen çeşitli numunelerden steril stomacher poşetine 25 g tartım alınarak, önceden sıcaklığı 41.5°C'ye getirilmiş novobiosin içeren mTSB besiyerinden 225 ml eklenerek 41.5°C'de 18-24 saat inkübasyona kaldırılır.

3.2.1.2 Manyetik Seperasyon

İnkübasyon sonucunda 1ml steril ependorfa alınarak içerisinde 20µl demirtozu eklenir. Vortekslendikten sonra rotatorda 13rpm'de 10 dk çevrilir. Daha sonra manyetik raka yerleştirilerek içerisinde demir tozuna tutunması beklenerek manyetik duvarın kenarında birikmesi sağlanır. Daha sonra sıvı besiyeri çekilerek içerisinde 1ml fosfat buffer eklenerek 1. Yıkama aşaması tamamlanır. Daha sonra ikinci yıkama aşaması yine 1ml fosfat buffer ile gerçekleştirildikten sonra atılarak içerisinde demir tozları kalmış olan ependorfa 0.1ml fosfat buffer eklenerek vortekslenir. Ependorfтан 50µl CT-SMAC besiyeri üzerine yayılır.

3.2.1.3. İnkübasyon ve Doğrulama

CT-SMAC besiyerleri 37°C'de 18-24 saat sonucu şüpheli koloniler doğrulamaya alınmaktadır. CT-SMAC besiyerinde *E. coli* O157:H7 sorbitol negatif olduğundan renksiz olarak üreme gösterecektir. Renksiz şeffaf koloniler *E. coli* O157:H7 latex testinde sırasıyla O157 ve H7 antiserumu damlatılarak koagülant oluşumuna bakılır ve pozitif veya negatif olarak değerlendirilmektedir.

3.2.1.4. Saflaştırma

Renksiz şeffaf koloniler *E.coli* O157:H7 latex testinde sırasıyla O157 ve H7 antiserumu damlatılarak koagülant oluşturan koloniler CT-SMAC besiyerine öze ile çizgi ekim tekrardan 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılır. Saflaşan koloniler stoklanır.

3.2.1.5. Organizmaların Stoklanması

Pozitif olarak tespit edilen koloniler 10ml'lik tüplerde Lb Broth'a inoküle edilerek 24 saat boyunca 37°C'de çoğaltılır. İnkübasyon sonrası 0.7ml ependorfa aktarılarak 0.3ml gliserol eklenerek % 30'luk gliserolde -80°C'de saklanmaktadır.

3.2.2. DNA İzolasyon Aşaması

E. coli O157:H7 izolatları DNA izolasyonu için LB Broth besiyerinde aktive edilmiştir. 5'er ml olacak şekilde deney tüplerine ayrı bir şişede hazırlanmış ve sonrasında 121°C' de 15 dk. Otoklav'da sterilize edilmiş tüplere inokülasyon gerçekleştirilmiştir. İnokülasyon sonucu Lb broth içeren tüpler 37°C' de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda bulanıklık görülen tüplerde üreme pozitif olarak değerlendirilmiştir. *E. coli* O157:H7 izolatlarından genomik DNA izolasyonu, QIAamp DNA Mini Kit (50) (QIAGEN) kitinin kılavuzuna uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.3 PCR aşaması

3.2.3.1. Stx Genlerinin PCR ile çoğaltılması

Elde edilen DNA izolasyonunun konsantrasyonu ve saflığı Thermo Scientific NanoDrop 2000/2000C ile saptanmıştır. Bütün DNA örneklerinin A260/280 oranının 1,80-1,95 aralığında olmasına dikkat edilerek, bu değerlerin CRISPR gen bölgelerinin araştırılmasında PCR için uygun olduğuna karar verilmiştir.

E. coli O157 :H7 türleri genomunda Stx1 ve st2 olmak üzere shigatoksin üreten 2 farklı gen bulunmaktadır. DNA izolasyonu yapılmış suşlardan elde edilen ürünlerde Stx1 ve stx2 gen bölgelerinin çoğaltılması için uygun PCR koşulları aşağıda tablo 3'de verilmiştir

Tablo 3 Stx1 ve stx2 gen bölgeleri için PCR koşulları Scheutz et al.,(2012)

| | |
|-------------|-----------------------------------|
| stx1-det-F1 | 94°C, 50 s; 56°C, 40s; 72°C, 60 s |
| stx1-det-R1 | |
| Seg-F4 | 94°C, 50 s; 56°C, 40s; 72°C, 60 s |
| Seg-F1 | |

3.2.3.2. CRISPR 1, CRISPR 2a ve CRISPR 2ab Bölgeleri İçin PCR aşaması

E coli O157 :H7 türleri genomunda CRISPR 1, CRISPR 2a ve CRISPR 2ab olarak adlandırılan 3 adet CRISPR lokusu bulunmaktadır. Araştırmamızda kullanılan ve DNA izolasyonu yapılmış suşlardan elde edilen ürünlerde CRISPR 1 ve CRISPR 2 bölgelerinin varlığının saptanabilmesi PCR uygulaması yapılmıştır. Bu PCR ile yapılan amplifikasyon işleminin en iyi sonucu verilebilmesi için CRISPR 1 ve CRISPR 2 bölgelerine özgü primer çiftleri kullanılarak ilgili bölgeler aşağıda belirtilen PCR koşullarındaki gibi çoğaltılmıştır (Díez-Villaseñor et al., 2010).

CRSPR1 bölgesi için touch down PCR koşulları (i) 94°C de 2 dk (ii) 11 cycles; 94°C 15 s, annealing için 20 s, her döngüde sıcaklık 1°C azaltılarak 62 °C'den 52 °C'ye, 68 °C de 2 s, ve 72 °C 'de 2 dk (iii) 35 döngü; 94 °C 'de 15 s, 60 °C'de 20 s, 68 °C 'de 2s ve 72 °C'de 2 dk, ve (iv) son uzaman aşaması 72°C 'de 10 dk. CRISPR2a ve CRSPR2b bölgesi için PCR koşulları ; (i) 94 °C de 2 dk, (ii) 11 döngü; 94°C de 15s, annealing için 20 s, her döngüde sıcaklık 1°C azaltılarak, 68 °C den 58°C ye ve 10 s, ve 72 °C de 3 dk (iii) 35 döngü 94 °C de 15 s, 60 °C de 20 s, 68 °C de 10 s and 72 °C de for 3 dk, ve (iv) 72 °C de 10dk. (Díez-Villaseñor et al., 2010)

3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi

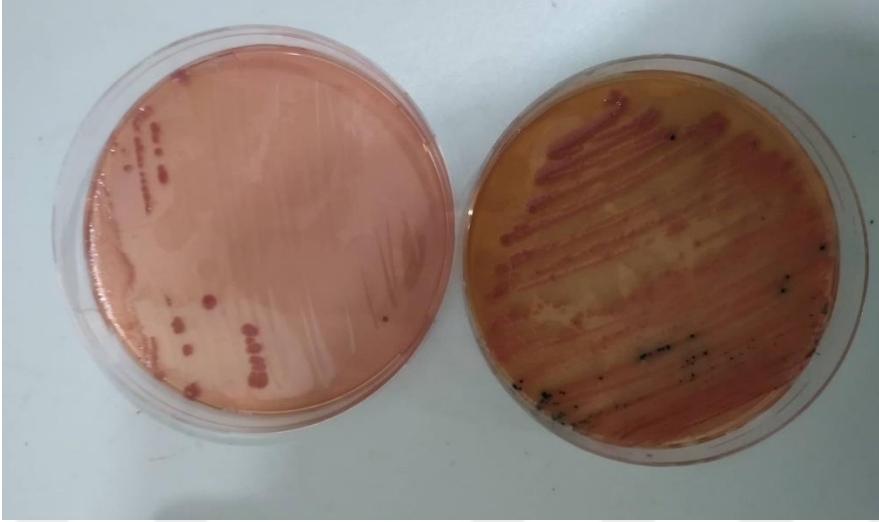
250ml'lik temiz erlen içerisine 100ml'lik TBE tamponu konularak ve %1.5 konsantrasyonu sağlayacak miktarda agaroz tartılıp içerisine ilave edilir. Agaroz suspansiyonu tamamen berraklaşıncaya kadar mikrodalga fırında ısıtılarak, agarozun erimesi sağlanır. Elde edilen bu sıvı jel 35-40 °C' ye kadar soğutulmak üzere bekletilir ve içerisine 100 ml' ye 5 µl SafeView DNA boyasından eklendikten sonra önceden tarakların yerleştirilmiş olduğu elektroforez tankımıza doklr. Jel oda sıcaklığında tamamen donduktan sonra (45-60 dk.) bantlar ve taraklar dikkatlice çıkartıldıktan sonra tankın için jel için hazırlanmış olan aynı TBE tamponuyla dolduruldu. PCR rnlerimiz 6x DNA loading dye (yükleme boyasıyla) 1 µl boya- 5 µl DNA olacak şekilde karıştırılıp jelimizdeki kuyucuklara yüklenir. Yine aynı şekilde markerımız (DNA ladder) 3 µl hacminde kuyucuklara yüklenir. 90 volt akımda 1 saat elektroforez yapıldıktan sonra DNA bantlarının olup olmadığı eğer varsa büyüklüklerinin ne kadar olduğunu saptamak amacıyla UV (transillüminatör) altında incelenmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 Gıdalardan *E. coli* O157:H7 İzolasyonu

Bu çalışmada Özel Gıda Laboratuvarına talep üzerine gelen numuneler *E.coli* O157:H7 saptanması TS EN ISO 16654 metoduna uygun olarak tarafınca çalışılmıştır. Laboratuvara 2 yıl boyunca gıda kaynaklı 220 adet *E. Coli* O157:H7 numunesi çalışılmıştır. Bu numunelerin % 60'ını kırmızı çiğ et kökenli gıda türevleri; kıyma, kuzu incik, karkas, dana kuşbaşı, kuz şiş, dana antrikot, ciğer, işkembe gibi numuneler oluşturmaktadır. Bu numunelerin %30 'unu ise çiğ tavuk ürünleri; bütün tavuk, but, tavuk göğsü, tavuk incik, tavuk kanat, çiğ soslu tavuk döner oluşturmaktadır. Geri kalan %10'luk kısımda çiğ ve dondurulmuş sebzeler, dondurulmuş patates, dondurulmuş bezelye, dondurulmuş domates, çiğ maydanoz gibi numuneler oluşturmaktadır.

Çalışılan izolatlar dan toplamda 13 adet pozitif *E. coli* O157:H7 tespit edilmiş edilmiştir. Bunlardan 10 tanesi kırmızı et türevleri iken 3 tanesi çiğ tavuk türevidir. Yapılan izolasyon çalışması sonucu *E. coli* O157:H7 pozitif olarak tespit edilen kolonilerin ve saflaştırmanın CT-Smac agar üzerindeki görüntüsü bir sonraki sayfada yer almaktadır.(Şekil 4) Elde edilen *E. coli* O157:H7 izolatların gıda kaynağı tablo 4'te verilmiştir.



Şekil 4 B1 izolatından izole edilen *E. coli* O157:H7'nin CT-Smac agar üzerindeki görüntüsü

Tablo 4 Elde edilen İzolatlar ve gıda kaynağı

| İzolat Kodu | Kaynak | <i>E. coli</i> O157:H7 Lateks |
|-------------|-------------------|----------------------------------|
| A1 | Karkas et | + |
| A2 | kıyma | + |
| A3 | Karkas et | + |
| A4 | Kuşbaşı | + |
| A5 | Çiğ tavuk | + |
| A6 | Kuşbaşı | + |
| B1 | Dana Kuşbaşı | + |
| B2 | Karkas et | + |
| B3 | Kıyma | + |
| B4 | Tavuk but | + |
| B5 | Hamburger köftesi | + |
| B6 | Tavuk göğüs | + |
| B7 | kıyma | + |
| NEG | Kıyma | - |

4.2. DNA İzolasyonu:

Kültürel yöntemler sonucunda *E coli O157:H7* olduğu saptanan saf kültürlerden DNA izolasyonu için LB sıvı besiyerine inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir. 13 adet izolatın DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA izolasyonunun konsantrasyonu ve saflığı Thermo Scientific NanoDrop 2000/2000C ile saptanmıştır. Bütün DNA örneklerinin A260/280 oranının 1,80-1,95 aralığında olmasına dikkat edilerek, bu değerlerin Stx1, Stx2, CRISPR1 ve CRISPR2 gen bölgelerinin araştırılmasında PCR için uygun olduğuna karar verilmiştir.

4.3. PCR

4.3.1 Stx1 ve Stx2 Gen Bölgelerinin Araştırılması

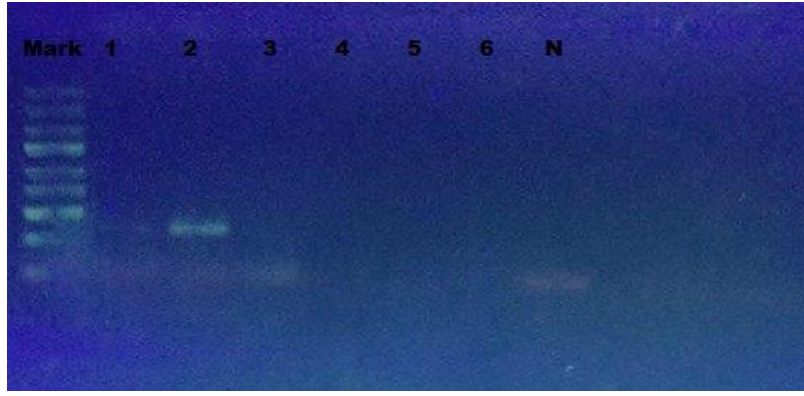
Elde edilen izolatlardan *Stx1* ve *Stx2* genlerinin saptanması için PCR çalışması yapılmıştır. İlk denemelerde yapılan çalışmalar sonucu başarı elde edilememiş olup daha sonraki optimizasyon koşulları ile metaryal kısmında belirtilen PCR koşullarında çalışma yapılarak toplamda 13 izolatta 12 *Stx1* ve *Stx 2* gen bölgeleri tespit edilmiştir. İzolatlar ve çıkan stx tipleri aşağıda tablo 5’te verilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek uv görüntüleyici ile gözlenmiştir. Agaroz jelde elde edilen stx bantlarının görüntüsü şekil 5, şekil 6 ve şekil 7’de gösterilmiştir.

Tablo 5 Elde edilen PCR sonuçlarına Göre Stx çeşitliliği

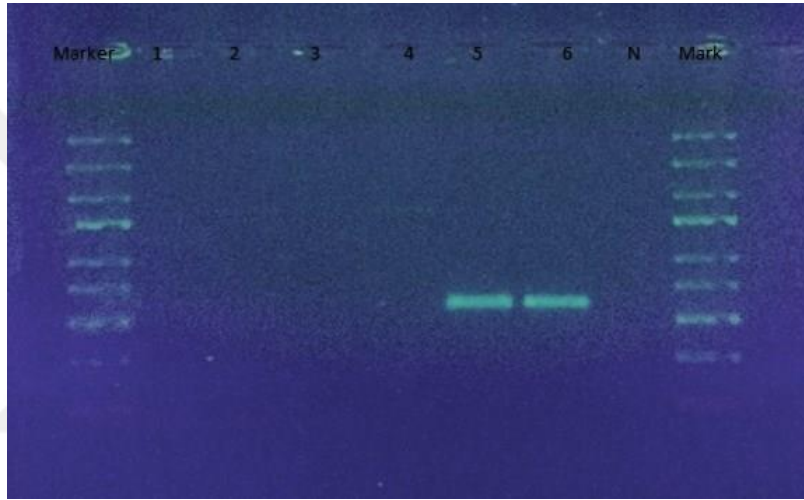
| İzolat Kodu | Kaynak | Stx1 | Stx2 |
|-------------|-------------------|------|------|
| A1 | Karkas et | + | - |
| A2 | kıyma | + | - |
| A3 | Karkas et | + | - |
| A4 | Kuşbaşı | - | - |
| A5 | Çiğ tavuk | - | + |
| A6 | Kuşbaşı | - | + |
| B1 | Dana Kuşbaşı | + | - |
| B2 | Karkas et | - | + |
| B3 | Kıyma | + | - |
| B4 | Tavuk but | + | - |
| B5 | Hamburger köftesi | - | + |
| B6 | Tavuk göğüs | + | - |
| B7 | kıyma | + | - |
| NEG | | - | - |

Tablo 6 STX1, STX2, CRSPR1, CRISPR2a ve CRISPR2b bölgeleri için pcr reaksiyon karışımı

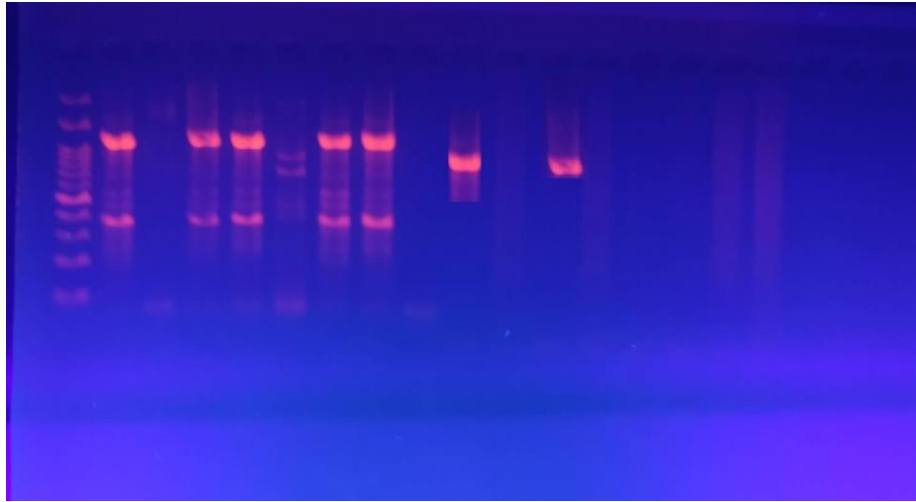
| | |
|---------------------|-------|
| PCR master mix (2x) | 25µl |
| Forward (2nmol) | 1 µl |
| Reverse(2nmol) | 1 µl |
| İzolat DNA'sı | 3 µl |
| Su | 20 µl |
| Toplam | 50 µl |



Şekil 5 A1-A6 Stx 1 pozitif bant görüntüleri



Şekil 6 A1-A6 Stx 2 pozitif bant görüntüleri



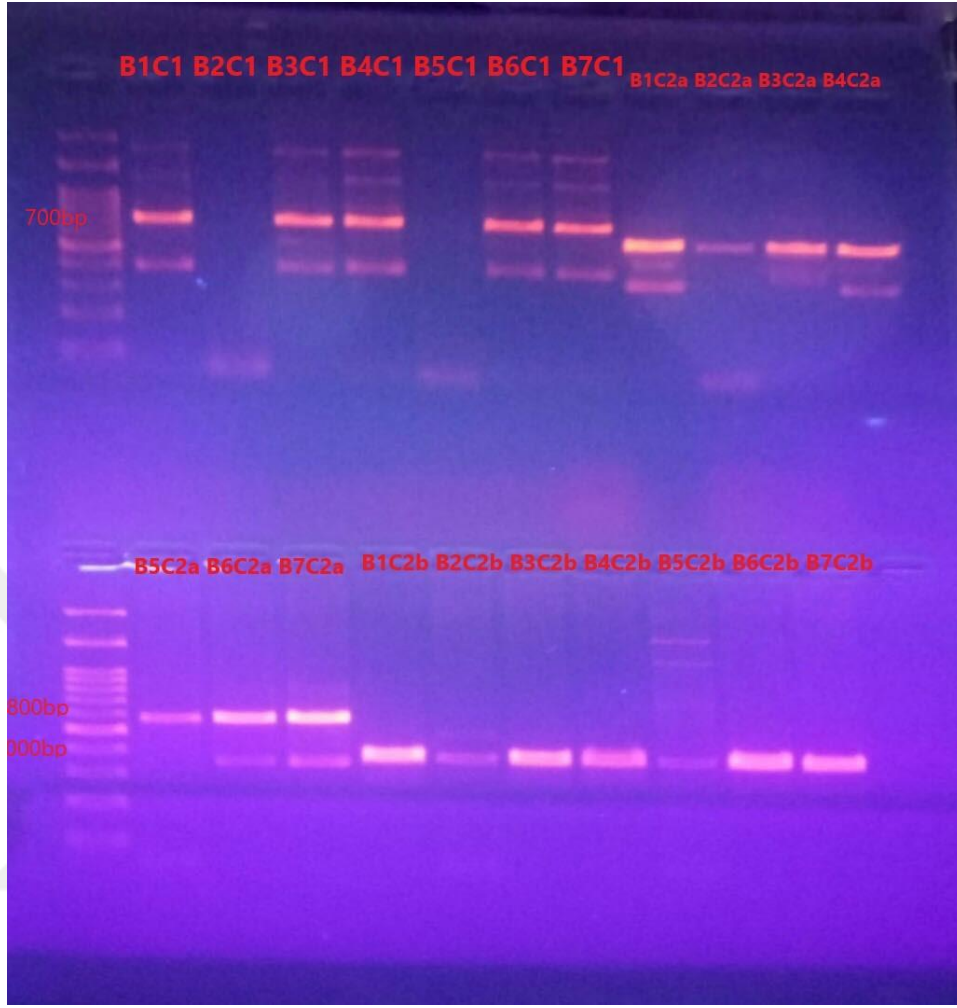
Şekil 7 Sırasıyla Stx1 B1-B7, Stx2 B1-B7 oluşan bantlar

4.3.2. CRSPR1, CRISPR2a ve CRISPR2b bölgeleri için PCR

Elde edilen izolatlardan CRSPR1, CRISPR2a ve CRISPR2b genlerinin saptanması için PCR çalışması yapılmıştır. Yapılan çalışmada 7 izolatan bulunan sonuçlar ve agaroz jel görüntüsü aşağıda verilmiştir. Yukarıda tabloda belirtilen PCR bileşenleri kullanılarak CRSPR1, CRISPR2a ve CRISPR2b genlerinin saptanması için PCR 3.2.3.2. belirtilen PCR koşullarında gerçekleştirilmiştir. Saptan bölgeler tablo 7’de verilmiştir. Saptanan CRISPR bölgelerinin agaroz jel görüntüsü şekil 8’de verilmiştir.

Tablo 7 CRSPR1, CRISPR2a ve CRISPR2b genleri için PCR sonuçları

| İzolat kodu | CRISPR1 | CRISPR2a | CRISPR2b |
|-------------|---------|----------|----------|
| B1 | + | + | + |
| B2 | - | - | + |
| B3 | + | + | + |
| B4 | + | + | + |
| B5 | - | + | + |
| B6 | + | + | + |
| B7 | + | + | + |



Şekil 8 Sırasıyla B1-B7 izolatların CRISPR1, CRISPR2a ve CRISPR2b gen bölgelerinin agaroz jel görüntüsü

4.4. Dizi Analizi:

Agaroz jel elektroforezi sonucunda bütün PCR ürünleri jelde tek bant olarak görüntülenmiştir. Daha sonra PCR ürünlerinden parlak bant görüntüsüne sahip *Stx1* için A2 nolu örnek ve *stx2* için A5 nolu örnek dizi analizine gönderilmiştir.

Dizi analiz sonucuna göre yapılan blast sonuçları şekil 9 ve şekil 10'da verilmiştir.

| Description | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
|---|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------------------------|
| Escherichia coli O157:H7 strain ATCC 43888 chromosome_complete genome | 505 | 505 | 85% | 5e-139 | 100.00% | CP041623.1 |
| Escherichia coli strain Ec40743 chromosome_complete genome | 505 | 505 | 85% | 5e-139 | 100.00% | CP041919.1 |
| Escherichia coli O111:H-110512 DNA_complete genome | 505 | 505 | 85% | 5e-139 | 100.00% | AP019761.1 |
| Escherichia coli strain ECOL-18-VL-LA-PA-Ryan-0026 chromosome_complete genome | 505 | 505 | 85% | 5e-139 | 100.00% | CP041392.1 |
| Escherichia coli strain ECCTRSRTH03 chromosome_complete genome | 505 | 505 | 85% | 5e-139 | 100.00% | CP041110.1 |
| Escherichia coli strain ATCC 43889 chromosome_complete genome | 505 | 505 | 85% | 5e-139 | 100.00% | CP015853.1 |
| Escherichia coli O157:H7 strain COPRO21317 chromosome | 505 | 505 | 85% | 5e-139 | 100.00% | CP035706.1 |

Şekil 9 Stx1 blast sonucu

| Description | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------------------------|
| Escherichia coli genes for Shiga toxin 2 A-subunit, Shiga toxin 2 B-subunit, complete cds, strain #C-2 | 1059 | 1059 | 82% | 0.0 | 99.32% | AB048240.1 |
| Escherichia coli strain ATCC 43889 chromosome_complete genome | 1053 | 2143 | 93% | 0.0 | 99.15% | CP015853.1 |
| Escherichia coli O157:H7 strain COPRO21317 chromosome | 1053 | 1184 | 93% | 0.0 | 99.15% | CP035706.1 |
| Escherichia coli strain 113 chromosome_complete genome | 1053 | 1184 | 93% | 0.0 | 99.15% | CP028888.1 |

Şekil 10 Stx2 blast sonucu

4.5. Tartışma

Shigatoksin üreten *E.coli* O157:H7 insanlarda, hemorajik kolit (HC), trombotik trombositopenik purpura (TTP) ve hemolitik üremik sendrom (HUS) olarak adlandırılan ve ölümlü sonuçlanabilen hastalıklara neden olur. Gıda kaynaklı patojenlerin büyük tehlikeli bakterilerinden olan *E. coli* O157:H7 bakterileri çeşitli gıda örneklerinden çalışılmıştır. TS EN ISO 16654 standardına dayalı olarak yapılan *E. Coli* O157:H7 analizlerinden 2 yıl içerisinde 220 örnekte 13 adet pozitif numune tespit edilmiştir. Bu oran çalışılan numunelerin % 5.9'u *E. coli* O157:H7 pozitifdir. Bulunan bu pozitif gıda numuneleri et ve et ürünlerinden oluşturmaktadır. *E. coli* O157:H7 pozitif 10 adet numune kırmızı et ve et ürünlerinden oluşurken 3 tanesi çiğ tavuk ürünlerinden oluşmaktadır. Literatür özetinde belirttiğimiz gibi sığırlar ve tavuklar bu grup bakterilerin ana yayılım rezervuarıdır.

İzole edilen saf kültürlerden DNA izolasyonu için LB sıvı besiyerinde inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir. 13 adet izolatın DNA izolasyonu yapılarak DNA

izolasyonunun konsantrasyonu ve saflığı A260/280 oranının 1,80-1,95 aralığında saptanarak doğrulanmıştır. *E. coli* O157:H7'de shigatoksin üretiminden sorumlu *stx* genleri 2 ana alt tipe ayrılmaktadır. (*Stx1* ve *Stx2*) Bu çalışmada *stx1* ve *stx2* hedef genlerinin primerleri kullanılarak yapılan PCR işleminden sonra agaroz jelde görüntülenmiştir. Agroz jel de oluşan *Stx 1* bantlarının boyutu yaklaşık 200bp bulunurken *Stx 2* bantlarının boyutu yaklaşık 600bp olarak görülmüştür. Buda Scheutz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayla uyusmaktadır (Scheutz et al., 2013). *Stx1* pozitif olarak tespit edilen izolatlardan bir örnek ve *stx 2* pozitif izolatlardan bir örneğinin PCR reaksiyonu oluşan karışımı DNA sekans analizi yaptırılmıştır.

DNA dizi analizi sonucu *stx 1* geninin yaklaşık 318 bp, *stx 2*'nin yaklaşık 569bp'lik sekans dizi analizine ulaşılmıştır. *Stx 1* geninin sekanslarının Blast sonucu *E. coli* O 157:H7 tüm genomu ile %99 benzerlik gösterdiği gözlemlenmiştir. (NCBI Sequence ID: CP041623.1) Elde edilen *stx 2* genin dizisinin Blast sonucu *E. coli* Shigatoksin üreten alt birim 2A ve Shigatoksin üreten alt birim 2B complete genomu ile %99 benzerlik göstermiştir. (NCBI Sequence ID: AB048240.1)

Analizi yapılan *E. coli* O157:H7 izolatlarının 13 tanesinden 8'inde *Stx 1*, 4 tanesinde *stx 2* tespit edilmiştir. *Stx 1* pozitif numunelerin 7 tanesi kırmızı et kaynaklı izolatlardan elde edilirken 1 tanesi çiğ tavuk kaynaklı gıdalardan tespit edildiği gözlemlenmiştir. *Stx 2* pozitif numunelerin 1 tanesi çiğ tavuk eti kaynaklı iken diğer 3 tanesi ise kırmızı et ve et ürünleri kaynaklıdır. Kırmızı et ürününden *E. coli* O157:H7 pozitif olarak tespit edilen bir izolatta ne *stx1* ne de *stx2* geni tespit edilmiştir. Muhtemeldir *stx1* ve *stx2* bir çok alt tip çeşitliliğinden farklı primerler kullanılarak izole edilebilir.

Elde edilen CRISPR bölgelerinin çeşitliliğine bakıldığında B1, B3, B4, B5ve B7 izolatları CRSPR1, CRISPR2a ve CRSPR2b gen bölgelerinin 3 ünüde içermektedir. İçerdiği CRISPR dizilerinin içerdiği spacer sekansları çeşitliliği DNA sekans analizi ile detaylı incelenecektir.

Yeni genom düzenlenmesinde yeni çağ başlatan CRSIPR-Cas sistemi ile bir çok genomun regülasyonu baskılanıp engellenebilmektedir. Bulunan bu metod

sayesinde özellikle *Streptococcus pyogenes*'den elde edilen nükleaz aktivitesine sahip Cas9 içeren plasmidlerin aktarımı ve ekspresyonu ile gerçekleştirilebilir. Bu yöntemle regülasyonun sağlanması için hedef bölge (spacer) nin *S.pyogenes* spCas9'un ilk başka okuma yapabileceği PAM sekansı (NGG)'nin olması gerekmektedir. Normal spacer(hedef bölge) optimum 22 bp uzunluğunda olduğunda ve PAM sekansı içerdiğinde cas9'un bağlanma seviyesinin daha yüksek olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. (Sternberg et al., 2014) *E.coli* O157:H7de shigatoksin üretiminin baskılanabilmesi için ya stx genlerinin ifadesinin baskılanmasına yönelik ya da bakterinin antifaj sisteminin baskılanarak faj enfeksiyonu ile engellenebilir. Antifaj sisteminin engellenmesi CRISPR sisteminin içerdiği virüsün korunmuş bölgelerinden diziler içeren spacer sekansların bilinmesi ve bu CRISPR spacer sekanslarında delesyonla ve ya mutasyonla elemine edilmesiyle bakterinin bu virüse karşı olan bağışıklığı düşürülebilir. Diğer bir yöntemse, elde edilen *Stx* 1 ve *Stx*2 sekanslarından spCas9 aktivitesiyle engellenmesidir. Yaptığımız bu çalışmada İzolatlardan *stx* genlerinin hedeflenmesi için oluşturulabilecek 22 nükleotitlik ve 5' ucunda PAM sekansı (NGG) içeren bölgeler tablo 8'te belirtilmiştir. Bu yöntemle hedef bölgeler spCas9 içeren plasmide aktarılarak ve plasmidin bakteriye transformasyonu ve ekspresyonuyla *E. coli* O157:H7'nin shigatoksin üretiminin engellenmesinde kullanılacağı düşünülmüştür.

Tablo 8 Stx1 ve Stx2 hedef oluşturulabilecek bölgeler

| NO | Stx1(5',3') | Stx2(5',3') |
|----|--------------------------|-------------------------|
| 1 | CGGTTTCGTATGACTACTCTAATG | CGGGAAGTGGACCTCACTCTGA |
| 2 | CGGAAACGGCGAAAACCCTGTG | TGGACCTCACTCTGAACTGGGG |
| 3 | TGGCGTTGTGGTTTGCCGGAAT | GGGCGAATCAGCAATGTGCTT |
| 4 | TGGTTTGCCGGAATGGATGCCA | TGGAGAGGATGGTGTGAGAGT |
| 5 | CGGAATGGATGCCTTTGATGCC | AGGATGGTGTGAGAGTGGGGGA |
| 6 | TGGATGCCTTTGATGCCATCGG | TGGTGTGAGAGTGGGGAGAAT |
| 7 | CGGCCATAGCTTTGCGACTATC | TGGGGAGAATATCCTTTAATAA |
| 8 | TGGCGGCTTCTCGACACATGAT | CGGCGATACTGGGCACTGTGG |
| 9 | CGGCTTCTCGACACATGATGCC | GGGGCGGTTCTGTTGCGCGG |
| 10 | CGGTTATTTGATAGCCCGACT | CGTGAATGAAGATAGTATTAT |
| 11 | CGGCTGTAACACGGTCTGCAC | TGGGAAAGTAATACAGCTGCA |
| 12 | CGGTCTGCACTTTCACTGTAA | CGGGTAAATAAAGGAGTTAAG |
| 13 | TGGACGTTCTTATGAATGACTG | TGGCGGTTTTATTTGCATTAGT |
| 14 | AGGTGCTTTACTTGTATTATTG | CGGTTTTATTTGCATTAGTTTCT |
| 15 | TGGTGTGTGTATGGATTGTCA | TGGCGGCGGATTGCGCTAAAG |
| 16 | TGGATGTGGAGTGGACGTTCTT | TGGCGGCGGATTGCGCTAAAG |
| 17 | TGGAGTGGACGTTCTTATGTAA | TGGCGGCGGATTGCGCTAAAG |
| 18 | TGGACGTTCTTATGTAATGACTG | AGGTAAAATTGAGTTTTCCAAG |
| 19 | CGGTTTCGTATGACTACTCTAATG | TGGCCGAAAAGAGTACTGGA |
| 20 | CGGAAACGGCGAAAACCCTGTG | AGGCTCCGGATTTGCTGATGCA |

Yeni nesil genom düzenlenmesinde popüler bir araç haline gelen CRISPR-cas9 sistemi ile ilgili genlerin regülasyonu mümkün hale gelmiştir. Bu süreçte ilgili genlerin protospacer bölgesi cas9 ve ya cas9 içeren plazmide aktararak bu plazmidin hedef bakteriye transasyonu ve ekspresyonu ile sağlanabilmektedir. Hedef mikroorganizmanın içerdiği CRISPR dizilerinin keşfi bize bakterinin antifaj sistemleri ve dirençli olduğu virüsler hakkında bilgiye ulaştırır.

Elde edilen izolatlardan CRISPR1, CRISPR2a ve CRISPR2b dizileri pcr ile çoğaltılmış bunlardan 5 tanesi sekans analizine gönderilmiştir. Sekans analizi sonucuna göre yapılan CRISPRfinder programı yardımıyla içerdiği tekrar ve spacer bölgeleri tespit edilmiştir. Yapılan sekans analizi sonucunda CRISPR2b bölgesinde kirlilikten dolayı beklenenden daha fazla çifti bulunmuş ve R ve S bölgeleri tespit edilememiştir.

Elde edilen 5 CRISPR1 sekanslarından CRISPR finder sistemi ile tüm izolatlarda aynı tekrar ve spacer dizileri tespit edilmiştir. Buda bu spacer ve tekrar bölgelerinin korunmuş olduğu görüşüne çıkmaktadır. Elde edilen sekanslar yaklaşık 800 bp uzunluğunda olup 4 adet R ve 3 adet S bölgesi içermektedir. Elde edilen repeat uzunluğu 29 bp uzunluğunda spacer uzunluğu 32bp uzunluğundadır. Bkz şekil 11. Ayrıca yapılan protein araştırmasında Cas2 proteini ile eşleşme göstermiştir. Bakınız şekil 12. CRISPR1 bölgesinden elde edilen spacer sekansının karşılaştırılması yapıldığında Escherichia coli O157:H7 str. SS17 GCF_000730345 ile aynı spacer'ı içerdiği gözlemlenmiştir. Bkz şekil 13.

Elde edilen CRISPR2b bölgesi yaklaşık 1000bp uzunluğunda beklenirken elde edilen sekans uzunluğu yaklaşık 500 bp olarak bulunmuştur. Elde edilen izolatlardan 5 tanesinde aynı R ve S bölgeleri tespit edilmiştir. CRISPR2b bölgesi 29 bp uzunluğunda 2 R bölgesi ve 33 bp uzunluğunda 1 adet S içermektedir. Bkz şekil 4.14

Sequence description :
Length (bp): 708

| Number of CRISPRs candidates = 1 | |
|---|--------------------------|
| Confirmed CRISPRs = 1 | Questionable CRISPRs = 0 |
| <ul style="list-style-type: none"> sequence_Crispr_1 | |

Rebuild a CRISPR, modify the DR sequence

Confirmed CRISPRs (1)

CRISPR id : tmp_1_Crispr_1

- CRISPR start position : 337 ----- CRISPR end position : 548 ----- CRISPR length : 211
- DR consensus : GTGTTCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCG
- DR length : 29 Number of spacers : 3

| | | | |
|-----|--------------------------------|---------------------------------|-----|
| 337 | GTGTTCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCG | TCACCAAAACAGTGACAAAACTGTACCAAAA | 397 |
| 398 | GTGTTCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCG | | 458 |
| 459 | GTGTTCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCG | TCACCAAAACAGTGACAAAACTGTACCAAAA | 519 |
| 520 | GTGTTCCCGCGCATCAGCGGGGATAAACCG | | 548 |

Display spacers Crispr Properties Search the local cas bank search encoded proteins

Şekil 11 CRISPR1 bölgesi R ve S analizi

| Sequences producing significant alignments: | Score | E Value |
|---|-------|---------|
| A4XYT6_PSEMY::Cas2_family CRISPR-associated protein tax=cellular... | 102 | 2e-28 |
| B8IZA9_DESDA CRISPR-associated protein Cas2 tax=Desulfovibrio de... | 78 | 3e-19 |
| A8LZ00_SALAI CRISPR-associated protein Cas2 tax=Actinomycetales | 58 | 7e-12 |
| Q2JWC8_SYNJA CRISPR-associated protein Cas2 tax=Chroococcales | 57 | 9e-12 |
| C7QEM1_CATAD CRISPR-associated protein Cas2 tax=Actinomycetales | 57 | 1e-11 |
| C7MTL7_SACVD CRISPR-associated protein Cas2 tax=Saccharomonospor... | 57 | 2e-11 |

Şekil 12 CRISPR1 bölgesi cas protein analizi

NZ_CP008805_2 top

Strain : Escherichia coli O157:H7 str. SS17 GCF_000730345 RefSeq :NZ_CP008805 (chromosome circular)

CRISPR id : NZ_CP008805_2

DR consensus (29 bp) : **CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACAC** Number of repetitions : 4

Begin Position : 3654440 End Position : 3654651

| | | | | |
|---------|--------------------------------------|---|---------|--------------------------|
| 3654440 | CGGTTTATCCCCGCTGATCGGGGAACAC | AGCGGCACGCTGGATTGAACAAATCCCTGGGC | 3654500 | <input type="checkbox"/> |
| 3654501 | CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACAC | TAACCGAAACACACGATCAATCGAATATGAC | 3654561 | <input type="checkbox"/> |
| 3654562 | CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACAC | TTGGTGACAGTTTTGTCACTGTTTTGGTGA | 3654622 | <input type="checkbox"/> |
| 3654623 | CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACAC | | 3654651 | <input type="checkbox"/> |

BLAST spacers

Şekil 13 CRISPR1 Spacer bölgesi bakımından benzerlik

Sequence description :
Length (bp): 353

| Number of CRISPRs candidates = 1 | |
|----------------------------------|--|
| Confirmed CRISPRs = 0 | Questionable CRISPRs = 1 |
| | <ul style="list-style-type: none"> IHSAN_YASA_B1-C2B_P7__PossibleCrispr_1 |
| CRISPRs candidates localization | |

Rebuild a CRISPR, modify the DR sequence

Questionable [*] CRISPRs (1)

CRISPR id : tmp_1_PossibleCrispr_1

- CRISPR start position : 55 ----- CRISPR end position : 143 ----- CRISPR length : 88
- DR consensus : GGTTTATCCCCACTGGCGCGGGGAACAC
- DR length : 28 Number of spacers : 1

| | | | |
|-----|-------------------------------------|--|-----|
| 55 | GGTTTATCCCCACTGGCGCGGGGAACAC | CTCGACTTTAATTTTTTCGCTGCCCGCTTTTTC | 115 |
| 116 | GGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACAC | | 143 |

Şekil 14 CRISPR2b R ve S blast sonucu

KAYNAKLAR

- Babu M, Beloglazova N, Flick R, Graham C, Skarina T, Nocek B, Gagarinova A, Pogoutse O, Brown G, Binkowski A, Phanse S, Joachimiak A, Koonin EV, Savchenko A, Emili A, Greenblatt J, Edwards AM, Yakunin AF** 2011, A dual function of the CRISPR-Cas system in bacterial antiviral immunity and DNA repair. *Mol Microbiol* 79:484–502
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P.** 2007, CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315:1709–1712. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1138140>.
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S et al** 2007, CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315:1709–1712
- Beloglazova N, Brown G, Zimmerman MD, Proudfoot M, Makarova KS, Kudritska M, Kochinyan S, Wang S, Chruszcz M, Minor W, Koonin EV, Edwards AM, Savchenko A, Yakunin AF** 2008, A novel family of sequence-specific endoribonucleases associated with the clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *J Biol Chem* 283:20361–20371
- Bhaya D, Davison M, Barrangou R** 2011, CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet* 45:273–297
- Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJ, Snijders AP, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, van der Oost J.** 2008, Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 321:960–964

- Campbell, A., Schneider, S.J., Song, B.,** 1992, Lambdoid phages as elements of bacterial genomes (integrase/phage21/*Escherichia coli* K-12/icd gene). *Genetica* 86, 259–267
- Carte J, Wang R, Li H, Terns RM, Terns MP.** 2008, Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. *Genes Dev* 22:3489–3496
- Chen, I., Christie, P.J., Dubnau, D.,** 2005, The ins and outs of DNA transfer in bacteria. *Science* 310 (5753), 1456–1460.
- Daines DA, Jarisch J, Smith AL.,** 2004, Identification and characterization of a nontypeable *Haemophilus influenzae* putative toxin–antitoxin locus. *BMC Microbiol* 4:30
- Datsenko KA, Pougach K, Tikhonov A, Wanner BL, Severinov K, Semenova E.,** 2012, Molecular memory of prior infections activates the CRISPR/Cas adaptive bacterial immunity system. *Nat Commun* 3:945
- Díez-Villaseñor C, Almendros C, García-Martínez J, Mojica FJM.,** 2010, Diversity of CRISPR loci in *Escherichia coli*. *Microbiology* 156:1351–1361.
- Endo, Y., Tsurugi, K., Yutsudo, T., et al.,** 1988, Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. *Eur. J. Biochem.* 171 (1-2), 45–50.
- Farmer 3rd, J.J., Fanning, G.R., Davis, B.R., et al.,** 1985, *Escherichia fergusonii* and *Enterobacter taylorae*, two new species of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 21, 77–81
- Flamand MC, Goblet JP, Duc G, Briquet M, Boutry M.,** 1992, Sequence and transcription analysis of mitochondrial plasmids isolated from cytoplasmic male-sterile lines of *Vicia faba*. *Plant Mol Biol* 19:913–923

- Frank, C., Werber, D., Cramer, J.P., et al.**, 2011, Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *NEJM* 365, 1771–1780.
- Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P et al.**, 2010, The CRISPR/cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 468:67–71
- Garred, O., Dubinina, E., Poleskaya, A., et al.**, 1997, Role of the disulfide bond in Shiga toxin A-chain for toxin entry into cells. *J. Biol. Chem.* 272 (17), 11414–11419.
- Godde JS, Bickerton A.**, 2006, The repetitive DNA elements called CRISPRs and their associated genes: evidence of horizontal transfer among prokaryotes. *J Mol Evol* 62:718–729
- Hale CR, Zhao P, Olson S, Duff MO, Graveley BR, Wells L, Terns RM, Terns MP.**, 2009, RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell* 139:945–956
- Hatoum-Aslan A, Maniv I, Marraffini LA.**, 2011, Mature clustered regularly interspaced short palindromic repeats RNA (crRNA) length is measured by a ruler mechanism anchored at the precursor processing site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:21218–21222
- Hermans PW, van Soolingen D, Bik EM, de Haas PE, Dale JW, van Embden JD.**, 1991, Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect Immun* 59(8), 2695–2705
- Hoffmann, P., Hulsewig, M., Duvar, S., et al.**, 2010, On the structural diversity of Shiga toxin glycosphingolipid receptors in lymphoid and myeloid cells determined by nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 24 (15), 2295–2304.

- Huys, G., Cnockaert, M., Janda, J.M., Swings, J.,** 2003, *Escherichia albertii* sp. nov., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*53, 807–810.
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A.,** 1987, Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* 169:5429–5433
- Jansen R, Embden JD, Gastra W, Schouls LM.,** 2002, Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* 43:1565–1575
- Jore MM, Brouns SJ, van der Oost J.,** 2011, RNA in defense: CRISPRs protect prokaryotes against mobile genetic elements. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(6)
- Jore MM, Lundgren M, van Duijn E, Bultema JB, Westra ER, Waghmare SP et al.,** 2011, Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by cascade. *Nat Struct Mol Biol* 18:529–536
- Karch H., Bielaszewska M., Bitzan M., Schmit H.,** 1999, Epidemiology and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*,34, 229-243,
- Kunin, V., Sorek, R., Hugenholtz, P.,** 2007, Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome biology*, 8(4), R61
- Kwon AR, Kim JH, Park SJ, Lee KY, Min YH, Im H, Lee I, Lee BJ.,** 2012, Structural and biochemical characterization of HP0315 from *Helicobacter pylori* as a VapD protein with an endoribonuclease activity. *Nucleic Acids Res* 40:4216–4228

- LaPointe, P., Wei, X., Garipey, J.,** 2005, A role for the protease-sensitive loop region of Shigalike toxin 1 in the retrotranslocation of its A1 domain from the endoplasmic reticulum lumen. *J. Biol. Chem.* 280 (24), 23310–23318.
- Lillestøl RK, Shah SA, Brügger K, Redder P, Phan H, Christiansen J, Garrett RA.,** 2009, CRISPR families of the crenarchaeal genus *Sulfolobus* bidirectional transcription and dynamic properties. *Mol Microbiol* 72:259–272
- Lintner NG, Kerou M, Brumfield SK, Graham S, Liu H, Naismith JH, Sdano M, Peng N, She Q, Copie V, Young MJ, White MF, Lawrence CM.,** 2011, Structural and functional characterization of an archaeal CASCADE complex for CRISPR-mediated viral defense. *J Biol Chem* 286:21643–21656
- Makarova KS, Aravind L, Grishin NV, Rogozin IB, Koonin EV.,** 2002, A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Res* 30:482–496
- Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV.,** 2006, A putative RNAinterference- based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct* 1:7
- Makarova KS, Wolf YI, Snir S, Koonin EV.,** 2011, Defense islands in bacterial and archaeal genomes and prediction of novel defense systems. *J Bacteriol* 193:6039–6056
- Marraffini LA, Sontheimer EJ.,** 2008, CRISPR interference limits horizontal gene transfer in *Staphylococci* by targeting DNA. *Science* 322:1843–1845
- Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G.,** 2000, Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of archaea, bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol* 36:244–246

- Mojica FJM, Juez G, Rodríguez-Valera F.,** 1993, Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol Microbiol* 9:613–621
- O’Brien, C.L., Gordon, D.M.,** 2011, Effect of diet and gut dynamics on the establishment and persistence of *Escherichia coli*. *Microbiology* 157, 1375–1384
- Obrig, T.G., Moran, T.P., Brown, J.E.,** 1987, The mode of action of Shiga toxin on peptide elongation of eukaryotic protein synthesis. *Biochem. J.* 244 (2), 287–294.
- Portillo MC, González JM.,** 2009, CRISPR elements in the thermococcales: evidence for associated horizontal gene transfer in *Pyrococcus furiosus*. *J Appl Genet* 50:421–430
- Rasko, D.A., Webster, D.R., Sahl, J.W., et al.,** 2011, Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *N. Engl. J. Med.* 365, 725–729.
- Samai P, Smith P, Shuman S.,** 2010, Structure of a CRISPR-associated protein Cas2 from *Desulfovibrio vulgaris*. *Acta Crystallogr Sect F: Struct Biol Cryst Commun* 66:1552–1556
- Saxena, S.K., O’Brien, A.D., Ackerman, E.J.,** 1989, Shiga toxin, Shiga-like toxin II variant, and ricin are all single-site RNA N-glycosidases of 28 S RNA when microinjected into *Xenopus oocytes*. *J. Biol. Chem.* 264 (1), 596–601.
- Scheutz, F., Teel, L. D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., Strockbine, N. A.,** 2012, Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal of clinical microbiology*, 50(9), 2951-2963.

- Sebahia M, Wren BW, Mullany P, Fairweather NF, Minton N, Stabler R et al.,** 2006, The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile mosaic genome. *Nature Genet* 38:779–786
- Semenova E, Jore MM, Datsenko KA, Semenova A, Westra ER, Wanner B et al.,** 2011, Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:10098–10103
- Shah SA, Hansen NR, Garrett RA.,** 2009, Distribution of CRISPR spacer matches in viruses and plasmids of crenarchaeal acidothermophiles and implications for their inhibitory mechanism. *Biochem Soc Trans* 37:23–28
- Sinkunas T, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V.,** 2011, Cas3 is a singlestranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. *EMBO J* 30(7):1335–1342
- Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., & Doudna, J. A. (2014).** DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 507(7490), 62.
- Tam, P.J., Lingwood, C.A.,** 2007, Membrane cytosolic translocation of verotoxin A1 subunit in target cells. *Microbiology* 153, 2700–2710.
- TS EN ISO 16654: 2003,** Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157
- Van der Oost J, Jore MM, Westra ER, Lundgren M, Brouns SJ.,** 2009, CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends Biochem Sci* 34:401–407
- Walk, S.T., Alm, E.W., Gordon, D.M., et al.,** 2009, Cryptic lineages of the genus *Escherichia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6534–6544.

Westra ER, van Erp PB, Kunne T, Wong SP, Staals RH, Seegers CL, Bollen S, Jore MM, Semenova E, Severinov K, de Vos WM, Dame RT, de Vries R, Brouns SJ, van der Oost J., 2012, CRISPR immunity relies on the consecutive binding and degradation of negatively supercoiled invader DNA by cascade and Cas3. *Mol Cell* 46:595–605

Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA., 2012, RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 482:331–338

Wiedenheft B, van Duijn E, Bultema J, Waghmare S, Zhou K, Barendregt A, Westphal W, Heck A, Boekema E, Dickman M, Doudna JA., 2011, RNA-guided complex from a bacterial immune system enhances target recognition through seed sequence interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:10092–10097

Wiedenheft B, Zhou K, Jinek M, Coyle SM, Ma W, Doudna JA., 2009, Structural basis for DNase activity of a conserved protein implicated in CRISPR-mediated genome defense. *Structure* 17:904–912

Wolber, P.K., Green, R.L., 1990, Detection of bacteria by transduction of ice nucleation genes, *Trends in biotechnology* 8, 276-279 pp.

Yosef I, Goren MG, Qimron U., 2012, Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 40:5569–5576

Zhang J, Rouillon C, Kerou M, Reeks J, Brugger K, Graham S, Reimann J, Cannone G, Liu H, Albers SV, Naismith JH, Spagnolo L, White MF., 2012, Structure and mechanism of the CMR complex for CRISPR-mediated antiviral immunity. *Mol Cell* 45:303–313



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana bu konuda çalıőmamı sağlayan, ilgisini ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. İhsan YAŞA'ya sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Çalıőmalarım boyunca maddi manevi destekleriyle beni yalnız bırakmayan annem, babam, amcalarım ve eőim Ecehan ALP GÜL'e sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Çalıőmalarım boyunca yardımını hiç esirgemeyen beyin fırtınaları ile çıkan sorunlara destekçi olan yüksek lisans arkadaőım Mert KEECECİ'ye, Nazenin Eftekari'ye teőekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans eğitim hayatı boyunca yaptığım çalışmaları destekleyen İnnenura Gıda Analizi Mikrobiyoloji alıőma arkadaőlarıma teőekkürlerimi sunarım.

Ege Üniversitesi Bilimsel Araőtırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (BAP) 17FEN16 no' lu bu projeye saęlamıő oldukları katkıdan dolayı teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ**Doğukan GÜL**

Doğum Tarihi : 01.05.1991

Doğum Yeri : Bursa

Medeni Durum Evli

Askerlik durumu Yapıldı

Adres 1703/1sk. No 19 d 2 Bahçelievler/Karşıyaka/İZMİR

Ehliyet B/A2 09.01.2014

EĞİTİM DURUMU

Eylül 2015: Ege Üniversitesi , Fen Fakültesi, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Dalı Yüksek Lisans Eğitimi, Tez döneminde devam ediyor.

2009-2014: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü / Temel ve Endüstriyel Ağırlıklı Mikrobiyoloji Bölümü

2005-2009: İznik Anadolu Lisesi / Fen Bilimleri

İŞ DENEYİMLERİ

Temmuz 2016: AG Pür Analiz Laboratuvarı/Mikrobiyoloji Analiz Laboratuvarı / Mikrobiyoloji Analisti. Halen devam ediyor.

2015-2016: Özel Ege Kız Lisesi / Proje yöneticiliği

2014-2015 Boyner/ YKM Satış Danışmanı

2013- Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı İzmir İl Kontrol Laboratuvarı/Staj

Sertifika Bilgileri

1. Sağlık Bakanlığı Onaylı İlk Yardım Eğitimlik Belgesi

Sertifika Tarihi: Haziran 2016

Alındığı Kurum: Hızıroğlu Eğitim Kurumları

2. Sağlık Bakanlığı Onaylı İlk Yardım Belgesi

Sertifika Tarihi: Haziran 2016

Alındığı Kurum: Hızıroğlu Eğitim Kurumları

3. PCR- Polimeraz zincir reaksiyonları

Sertifika Tarihi: 05.2018

Alındığı Kurum: İMEA eğitim Danışmanlık

4. GMP- iyi üretim uygulamaları

Sertifika Tarihi: Ağustos 2015

Alındığı Kurum: İMEA eğitim Danışmanlık

5. OHSAS 18001:2007 İş Sağlığı ve Güvenliği

Sertifika Tarihi: Temmuz 2015

Alındığı Kurum: TSC Akademi

6. ISO 13485 Tıbbi Cihazlar Kalite Yönetim Sistemi

Sertifika Tarihi: Temmuz 2015

Alındığı Kurum: TSC Akademi

YABANCI DİL

İngilizce: B1 seviyede

Türkçe: Ana Dil