

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTİBİYOTİK ADAPTİF LABORATUVAR EVRİMİ UYGULANAN
Escherichia coli MG1655'DE ÖNEMİ ARTAN GENLERİN CRISPRİ
İLE BELİRLENMESİ

Dilan CAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Doç. Dr. Tülin ÖZBEK

Eş Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Enes Seyfullah KOTİL

Ocak, 2023

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANTİBİYOTİK ADAPTİF LABORATUVAR EVRİMİ UYGULANAN
Escherichia coli MG1655'DE ÖNEMİ ARTAN GENLERİN CRISPRİ İLE
BELİRLENMESİ**

Dilan CAN tarafından hazırlanan tez çalışması 20.01.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Tülin ÖZBEK
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Enes Seyfullah KOTİL
Boğaziçi Üniversitesi
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Tülin ÖZBEK, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Enes Seyfullah KOTİL, Eş Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Nehir Özdemir Özgentürk, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Çağrı Kurt, Üye
Boğaziçi Üniversitesi

Danışmanım Doç. Dr. Tülin ÖZBEK sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Antibiyotik Adaptif Laboratuvar Evrimi Uygulanan *Escherichia coli* MG1655’de Önemi Artan Genlerin CRISPRi ile Belirlenmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Dilan CAN

İmza



Bu alışma, TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'nın 118C244 numaralı projesi ile desteklenmiştir.



Aileme
ve
Loki'ye

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca beni destekleyerek yol gösteren, bu tezin yürütülmesine danışmanlık ederek akademik kariyerimin temellerini atmamı sağlayan danışmanım Doç. Dr. Tülin ÖZBEK ve eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Enes Seyfullah KOTİL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili aileme teşekkürlerimi iletiyorum.

Ayrıca tez yazım sürecimde motivasyon vererek destek olan tüm ekip arkadaşlarıma, KOTİL LAB ailesine de teşekkür etmek istiyorum.

Son olarak bu tez çalışmasını 2232-Uluslararası Lider Araştırmacılar Programı bursu ile destekleyen TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Dilan CAN

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xvi
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı	3
1.3 Hipotez	3
2 GENEL BİLGİ	4
2.1 CRISPRi Sistemi ve Özellikleri	4
2.1.1 CRISPR Sistemi	4
2.1.2 CRISPRi Sistemi	6
2.1.3 CRISPRi Sisteminin Moleküler Mekanizması.....	9
2.1.4 Cas9 ve dCas9 Proteinlerinin Karşılaştırılması.....	10
2.1.5 CRISPRi Sisteminin Avantaj ve Dezavantajları	11
2.1.6 Bakterilerde CRISPRi Uygulamaları	14
2.2 Bakterilerde Genom Çapında CRISPRi Tarama	16
2.2.1 Genom Çapında CRISPRi Tarama Yönteminin Diğer Yöntemlerle Karşılaştırılması	18
2.3 Bakteriyel Adaptasyon ve Antibiyotik Direnci	19
2.3.1 Antibiyotik Direncinin Moleküler Temelleri	22
2.3.2 Bu Tez Çalışmasında Kullanılan Antibiyotikler ve Direnç Mekanizmaları	24
2.4 Adaptif Laboratuvar Evrimi Deneyleri.....	25
3 MATERYAL VE METOT	28
3.1 Materyal.....	28
3.1.1 Kullanılan Cihazlar.....	28
3.1.2 Kullanılan Mikroorganizma Suşları	29
3.1.3 Kullanılan Antibiyotikler	29
3.1.4 Kullanılan Besiyerleri	29

3.1.5 Plazmit DNA İzolasyonu.....	29
3.1.6 Genom Çapında CRISPRi Kütüphanesi.....	29
3.1.7 Elektroforez Reaktifleri	30
3.1.8 Agaroz Jelden DNA Saflaştırılması	31
3.1.9 PZR Reaktifleri	31
3.1.10 Kullanılan Primerler	31
3.1.11 Elektroporasyon Küveti	32
3.1.12 Florometrik Hassas DNA Miktarı Ölçüm Kiti	32
3.1.13 Yeni Nesil Dizileme Cihazı ve Akış Hücresi	32
3.1.14 Kullanılan Bilgisayar Yazılımları.....	32
3.2 Metot	33
3.2.1 Adaptif Laboratuvar Evrimi Deneyleri	33
3.2.2 Genom Çapında CRISPRi Kütüphanesinin Transformasyonu	34
3.2.3 Genom Çapında CRISPRi Tarama Deneyleri	36
3.2.4 Yeni Nesil Dizileme Kütüphanesinin Hazırlanması ve Dizileme....	37
3.2.5 Yeni Nesil Dizileme Veri Setlerinin Analizi.....	42
3.2.6 Veri Setinin Doğruluğunun Karşılaştırılması	44
3.2.7 Adaptasyondan Sonra Önemi Artan Genlerin Belirlenmesi	44
4 SONUÇ VE ÖNERİLER	46
4.1 Deneysel Bulgular	46
4.1.1 Adaptif Laboratuvar Evrimi Deney Sonuçları	46
4.1.2 Genom Çapında CRISPRi Tarama Deneyleri Sonuçları.....	51
4.1.3 Yeni Nesil Dizileme Verilerinin Analiz Sonuçları	52
4.1.4 Veri Setinin Doğruluğunun Karşılaştırılma Sonuçları	67
4.1.5 Adaptasyondan Sonra Önemi Artan Genler.....	69
4.2 Sonuç ve Öneriler	89
KAYNAKÇA	97
A EKLER	106
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	116

SİMGE LİSTESİ

Ω	Akım
bç	Baz çifti
dk	Dakika
RPM	Dakikadaki devir sayısı
g	Gravite
Kb	Kilobaz çifti
μ F	Mikrofarad
μ L	Mikrolitre
μ M	Mikromolar
mg	Miligram
mL	Mililitre
ng	Nanogram
OD	Optik yoğunluk
sn	Saniye
°C	Santigrat derece
U	Ünite
V	Volt

KISALTMA LİSTESİ

ALE	Adaptif Laboratuvar Evrimi
AUC	Eğrinin Altında Kalan Alan
AME	Aminoglikozit değiştirici enzim
Cas	CRISPR ilişkili genler
Cas9	Cas9 proteini
CAT	Kloramfenikol asetil transferaz enzimi
CRISPR	Düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar
CRISPRİ	CRISPR interferans
crRNA	CRISPR RNA
dCas9	Katalitik olarak aktif olmayan Cas9 proteini
ESRS	Çeper Stres Yanıt Sistemi
FDR	Yanlış Keşif Oranı
FOR	Yanlış İhmal Oranı
kob	Koloni Oluşturan Birim
LPS	Lipopolisakkarit
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MT	Mutant Tip
NHEJ	Homolog olmayan uç birleştirme
NET-Seq	Yerel Uzayan Transkript Sekansalama
PAM	Aralıklı Bitişik Motif
PBP	Penisilin Bağlanma Proteini
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
p	p değeri

pre-crRNA	Öncül crRNA
Rcs	Kapsüler Sentez Düzenleyici
RNAi	RNA interferans
ROC	Alıcı Karakteristik Eğrisi
RBS	Ribozom Bağlanma Sekansı
sgRNA	Tek rehber RNA
SOS	Stres yanıtı
t-CRISPRi	Ayarlanabilir CRISPRi
Tn-Seq	Transpozon Sekanslama
YND	Yeni Nesil Dizileme
YT	Yabanıl Tip

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1	CRISPR/Cas sisteminin hücre içi moleküler mekanizması [26].	5
Şekil 2. 2	CRISPRi çalışma mekanizmasının şeması [26].	7
Şekil 2. 3	sgRNA yapısı ve CRISPRi'nin hedeflenme mekanizması [3].	8
Şekil 2. 4	dCas9-sgRNA-hedef DNA arasındaki üçlü kompleksin oluşum mekanizması [30].	10
Şekil 2. 5	Cas9 ve dCas9'un fonksiyonlarının karşılaştırılması [30].	11
Şekil 2. 6	Genom çapında CRISPRi tarama deneylerinin akış şeması [30].	17
Şekil 2. 7	Doğal seçilime bağlı olarak antibiyotik direncinin gelişimi.	20
Şekil 2. 8	Türkiye, Çin ve ABD'de <i>E. coli</i> 'nin çeşitli antibiyotiklere direnç seviyesi [55].	21
Şekil 2. 9	Antibiyotik direncinin moleküler mekanizmaları [59].	23
Şekil 2. 10	ALE deneylerinde kullanılan deneysel yöntemler [17].	26
Şekil 3. 1	Genom çapında CRISPRi kütüphanesini oluşturan plazmitlerin dizi haritası [39].	30
Şekil 4. 1	Bu tez çalışmasında uygulanan deneysel yöntemlerin akış şeması.	46
Şekil 4. 2	ALE deneyi süresince antibiyotiklere direnç kazanan LCE-75 hücrelerinin MİK değişimi ($\mu\text{g/mL}$).	49
Şekil 4. 3	Tüm deney gruplarından elde edilen plazmit örneklerinin elektroforez görüntüsü.	52
Şekil 4. 4	YT.A T.0 deney grubunda yer alan her bir geni hedefleyen sgRNA sayısının dağılımı.	53
Şekil 4. 5	YND sonucu elde edilen toplam okuma sayıları.	55
Şekil 4. 6	Ham sgRNA okuma sayılarının deney grupları arasındaki dağılımı.	57
Şekil 4. 7	Ham ve normalize edilmiş veri setinin karşılaştırılması (Her kutuda, ortadaki işaret medyanı, kutunun alt ve üst kenarları sırasıyla 25. ve 75. yüzdalık dilimleri gösterir).	59
Şekil 4. 8	Normalize edilmiş veri setlerinin deney grupları, zaman noktası=20 ve zaman noktası=0'a göre dağılımı (Her bir nokta 1 sgRNA'yı temsil etmektedir).	60
Şekil 4. 9	Her bir deney grubunun kat değişiminin dağılımını gösteren histogram grafikleri.	62
Şekil 4. 10	Her bir deney grubunun medyan kat değişim değerlerinin dağılımı.	65
Şekil 4. 11	Yabani Tip deney gruplarından elde edilen veri setinin EcoGene veri setiyle karşılaştırılması sonucunun ROC grafiği ile gösterimi.	68

Şekil 4. 12 Yabanıl Tip deney gruplarından elde edilen veri setinin Tradis veri setiyle karşılaştırılması sonucunun ROC grafiği ile gösterimi.	69
Şekil 4. 13 Adaptasyondan sonra önemi artan genlerin deney gruplarına göre değişimini gösteren sıcaklık grafiği.....	70
Şekil 4. 14 Küme-1 Ortak grubunda yer alan genleri hedefleyen 5 sgRNA'nın kat değişimi.....	74
Şekil 4. 15 Küme 1-AMP.A grubunda yer alan genleri hedefleyen 5 sgRNA'nın kat değişimi.	77
Şekil 4. 16 Küme 1-AMP.B grubunda yer alan genleri hedefleyen 5 sgRNA'nın kat değişimi.	80
Şekil 4. 17 Küme 2 grubunda yer alan genleri hedefleyen 5 sgRNA'nın kat değişimi.....	84
Şekil 4. 18 Adaptasyondan sonra önem kazanan genlerin zenginleşme analizi ($p<0.05$).	87
Şekil 4. 19 Adaptasyondan sonra önem seviyesi artan genlerin interaksiyon ağı ($FDR< 0.02$).	88

TABLO LİSTESİ

Tablo 3. 1	Bu tez çalışmasında kullanılan primerlerin listesi.....	31
Tablo 3. 2	Birinci PZR Reaksiyon Karışımı (25 μ L).....	38
Tablo 3. 3	Birinci PZR işleminde uygulanan ısı döngü koşulları.....	38
Tablo 3. 4	YND kütüphanesi hazırlığında uygulanan ikili indeksleme planı.....	39
Tablo 3. 5	İkinci PZR Reaksiyon Karışımı (25 μ L).....	41
Tablo 3. 6	İkinci PZR işleminde uygulanan ısı döngü koşulları.....	41
Tablo 4. 1	LCE-75 hücrelerinin antibiyotikler için MİK değerleri.....	47
Tablo 4. 2	ALE boyunca her deney gününde LCE-75'in büyüdüğü en yüksek MİK değerleri (μ g/mL).....	48
Tablo 4. 3	Tüm deney gruplarında elde edilen toplam sgRNA okuma sayıları. .	54
Tablo 4. 4	Her bir deney grubunda en düşük kat değişimi gösteren genler.....	71
Tablo 4. 5	Küme-1 Ortak grubunda yer alan genler ve fonksiyonları.....	73
Tablo 4. 6	Küme 1-AMP.A grubunda yer alan genler ve fonksiyonları.....	76
Tablo 4. 7	Küme 1-AMP.B grubunda yer alan genler ve fonksiyonları.....	79
Tablo 4. 8	Küme 2 grubunda yer alan genler ve işlevleri.....	83

Antibiyotik Adaptif Laboratuvar Evrimi Uygulanan *Escherichia coli* MG1655’de Önemi Artan Genlerin CRISPRi ile Belirlenmesi

Dilan CAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Tülin ÖZBEK

Eş-Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Enes Seyfullah KOTİL

Bakteriler antibiyotiklere adapte olurken çok sayıda değişikliğe uğrar. Dirençli ve yabani tip bakteriler arasındaki farklılıkların karakterizasyonu dirençle mücadele için kritik bir öneme sahiptir. Bu farklılıklardan gen ifadesi seviyesi ve nükleotit değişimlerini tanımlamak üzere Tüm Genom Dizilimi ve Transkriptom Dizileme yöntemleri kullanılmıştır. Adaptasyona aracılık eden bir diğer değişim ise, esansiyel olmayan genlerin hücresel faktörleri etkileyerek adaptasyondan sonra bakteri için daha önemli hale gelmesidir. Yapılan çalışmalarda dirençli mutantların hayatta kalmasında kritik roller üstlenen esansiyel olmayan genlerin varlığı Transpozon Mutajenez Dizileme ile gösterilmiştir. Fakat birçok antibiyotik direnci ve mutanti için ortaklık gösterebilecek, dirençli bakterilerin büyümesini azaltabilecek genler araştırılmamıştır. Bu tez çalışmasında, adaptasyondan sonra önemi artan genleri belirlemek için laboratuvar evrimleştirilmiş *Escherichia coli* MG1655 (*E. coli*) de genom çapında CRISPRi tarama kullanılmıştır. Ampisilin, doksisisiklin, kloramfenikol, oksasilin ve kloramfenikole dirençli 2 soy hattı elde edilmiştir. İnhibisyonu halinde yabani tipe kıyasla mutant tiplerde daha çok

büyüme kusuruna sebep olan genler belirlenmiştir. 28 genin adaptasyondan sonra daha önemli hale geldiği belirlenmiştir. En düşük kat değişim değerini veren 4 gen; lapB, yrfF; mrdA ve rsfS öne çıkmıştır. Ampisiline adaptasyondan sonra önemi artan 19 genin diğer deney gruplarından ayrı bir küme oluşturduğu gözlemlenmiştir. Kloramfenikol, doksasiklin, oksasilin ve spiramisin gruplarında hücre membranı ve zar yapısını düzenleyen genlerin varlığı tespit edilmiştir. En çok zenginleşen hücresel yollar DNA replikasyonu, lizin biyosentezi, yanlış baz eşleşmesi tamiri, homolog rekombinasyon ve peptidoglikan biyosentezi olmuştur. Bu genlerin tanımlanması, özellikle dirençli suşları hedefleyen, uygun yeni tedaviler geliştirme potansiyeline sahiptir.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik direnci, adaptif laboratuvar evrimi, CRISPR interferans.

Identification of Genes of Increasing Importance in *Escherichia coli* MG1655 with Antibiotic Adaptive Laboratory Evolution by CRISPRi

Dilan CAN

Department of Molecular Biology and Genetics

Master of Science Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Tlin ÖZBEK

Co-supervisor: Assist. Prof. Dr. Enes Seyfullah KOTIL

Bacteria undergo numerous changes as they adapt to antibiotics. Characterization of differences between resistant and wild-type bacteria is critical for combating resistance. Whole Genome Sequencing and Transcriptome Sequencing methods were used to identify gene expression level and nucleotide changes from these differences. Another change that mediates adaptation is that non-essential genes become more important for bacteria after adaptation by influencing cellular factors. The presence of non-essential genes that play critical roles in the survival of resistant mutants has been demonstrated by Transposon Mutagenesis Sequencing. However, genes that may be associated with many antibiotic resistances and mutants, and that may reduce the growth of resistant bacteria, have not been investigated. In this thesis, genome-wide CRISPRi screening was used in laboratory-evolved *Escherichia coli* MG1655 (*E. coli*) to identify genes of increased importance after adaptation. Two strains were obtained, each resistant to ampicillin, doxycycline, chloramphenicol, oxacillin and chloramphenicol. In case of inhibition, genes that cause more growth defects were determined in

mutant types compared to wild type. 28 genes were determined to become more important after adaptation. 4 genes (lapB, yrfF; mrdA and rsfS) came to the forefront by giving the lowest fold change value. It was observed that 19 genes, whose importance increased after adaptation to ampicillin, formed a separate cluster from other experimental groups. The presence of genes regulating cell membrane and membrane structure was detected in chloramphenicol, doxacycline, oxacillin and spiramycin resistant groups. The most enriched cellular pathways were DNA replication, lysine biosynthesis, mismatch repair, homologous recombination, and peptidoglycan biosynthesis. Identification of these genes has the potential to develop appropriate and novel therapies that specifically target resistant strains.

Keywords: Antibiotic resistance, adaptive laboratory evolution, CRISPR interference.

1.1 Literatür Özeti

Düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar (CRISPR) ve ilişkili proteinler (Cas), birçok bakteri ve arkede yabancı elementlere karşı bağışıklık sağlayan CRISPR/Cas sistemini oluşturur. Cas9, Cas12a, Cascade-Cas3 proteinleri son yıllarda moleküler araçlar olarak çeşitlenmekte ve farklı amaçlarla kullanılmaktadır [1]. CRISPR araçları ile gen ifadesinin aktivasyonu, inhibisyonu, dizi ekleme ve silme gibi farklı işlemleri uygulamak mümkündür [2], [3].

CRISPR interferans (CRISPRi), hedef genin ifade seviyesinin diziye özgü baskılanmasını sağlar [3]. Tip II *Streptococcus pyogenes* CRISPR/Cas sistemlerinden uyarlanan CRISPRi sistemleri iki bileşenle programlanmaktadır; katalitik olarak aktif olmayan Cas9 proteini (dCas9) ve tek rehber RNA (sgRNA). sgRNA, 20 nükleotitlik hedef diziye tamamlayıcı bölge, 42 nükleotitlik Cas9 bağlayıcı RNA yapısı ve *S. pyogenes*ten türetilmiş 40 nükleotitlik transkripsiyon sonlandırıcıdan oluşan 102 nükleotit uzunluğunda kimerik, kodlama yapmayan RNA'dır. dCas9, RuvC ve HNH katalitik domainlerini aktivitesini bozan iki nokta mutasyonu (D10A ve H841A) nedeniyle endonükleaz aktivitesini yitirmiştir [4]. sgRNA ve dCas9'un hedef DNA'yı tanıyarak oluşturdukları kompleks, RNA polimeraza sterik engel yaparak transkripsiyonu inhibe eder [3]. İfadesi bastırılmak istenen genin promotor dizilerine tamamlayıcı sgRNA kullanıldığında transkripsiyonun başlangıcı engellenir. Genin kodlayıcı zincirine tamamlayıcı sgRNA kullanıldığında ise transkripsiyonun uzaması bloke edilir. CRISPRi araçları kullanılarak birden fazla genin aynı anda inhibisyonu, indüklemeye seviyesinin ayarlanması ve baskılamamanın tersine çevrilmesi gibi farklı gen ifadesi kontrolü stratejileri mümkündür. Bakteri genomları küçük boyutları ve basit organizasyonlarıyla CRISPRi çalışmalarında sıklıkla tercih edilmiştir. Ayrıca bakteriyel genomlar CRISPR-Cas9 araçlarıyla çalışmaya elverişli olmadığı için araştırmalar bu sahaya yönelmiştir. Hedef genlerin ifade seviyesinin

ayarlanmasıyla istenilen metabolizma ürünlerinin miktarını artırmak ya da azaltmak, genom çapında sgRNA kütüphaneleri kullanarak tarama yapmak, gen haritası oluşturmak, ilaç hedeflerinin tayini ve patojenlerde virülans genlerinin analizi gibi farklı çalışmalarda CRISPRi kullanılmıştır [5]–[7].

Genomda yer alan bütün genlere tamamlayıcı 20 nükleotitlik sgRNA'ların tasarımı ve plazmit DNA'lar kullanılarak hücrelere transformasyonu ile genom çapında CRISPRi tarama yöntemi uygulanır [8]–[10]. Genom çapında CRISPRi tarama yönteminde; sgRNA dizilerinin plazmitlere klonlanmasıyla oluşturulan sgRNA kütüphanesi, dCas9 proteinini içeren hücrelere transforme edilir. Transforme edilen hücreler indükleyici varlığında ve kontrol koşullarında inkübe edilir. İndüklenerek ekspresyona başlayan dCas9 proteini ve sgRNA'lar hedef geni inhibe eder. Bu esnada kütüphaneyi oluşturan sgRNA plazmitleri hücreye etkisinden dolayı sayıca artar ya da azalır. Kütüphanede yer alan her bir sgRNA'nın hücre büyümesine etkisi, sgRNA'ların sayısının belirlendiği Yeni Nesil Dizileme tekniğiyle ölçülür [10]. Her bir deney grubunun kat değişim değeri, indüksiyon öncesi ve sonrasında alınan sgRNA okuma sayısı değerlerinin işlenmesiyle elde edilir. Hesaplanan kat değişim değerlerinin analiz edilmesiyle genomdaki her bir genden yanıt alınmış olunur. Yüksek verimli genom çapında CRISPRi tarama çalışmalarıyla hücre morfolojisi ve büyümeyle ilişkili temel genlerin genotip ve fenotip ilişkisi üzerinde birçok araştırma yapılmıştır [9], [11]–[13].

Mikroorganizmalar doğal seleksiyona bağlı olarak bulundukları ortamdaki çeşitli inhibitör moleküllere zamanla adaptasyon sağlarlar. Antibiyotik direnci bakteriyel adaptasyon sonucu ortaya çıkan önemli bir sağlık krizidir. Belirli bir antibiyotiğe karşı kazanılan direnç, direnci kodlayan kromozomal genlerde oluşan mutasyonlar veya bunu sağlayan genetik materyalin yatay gen transferiyle aktarımı sonucu oluşabilir [14]. Bu mekanizmaların incelenmesi için laboratuvar ortamında dirençli bakterilerin üretimi yaygın bir yöntemdir. Adaptif laboratuvar evrimi (ALE) deneyleri, belirli bir fiziksel veya kimyasal etkene karşı adaptasyon kazanan mikrobiyal suşların laboratuvar koşullarında üretilmesidir [15]. Deney sonucunda direnç kazanan suşların moleküler tekniklerle incelenmesiyle adaptasyon esnasında hücrenin genotipinde gerçekleşen değişimler ortaya çıkarılır. Bu değişimlerden gen ifadesi ve nükleotit dizilimiyle ilgili olanların

incelenmesinde Tüm Genom ve Tüm Transkriptom Dizileme gibi tekniklerden sıklıkla yararlanılmaktadır [16], [17]. Adaptasyonda gerçekleşen değişimlerden birisi ise, esansiyel olmayan bazı genlerin hücresel faaliyetleri düzenleyerek bakteriye avantajlar sunmasıdır. Bu genlerin varlığı ve aktiviteleri, hücrenin uyumunda üstlendikleri kritik roller yüzünden adaptasyon sonra bakteri için daha önemli hale gelir [18]. Yakın zamanlı bir çalışmada; rifampisine dirençli H526Y mutantının hayatta kalmasını etkileyen esansiyel olmayan genlerin varlığı Transpozon Mutajenez Dizileme ile tespit edilmiştir [19]. Fakat, farklı antibiyotiklere dirençli bakterilerde ortak olan ve doğrudan dirençli bakterilerin büyüme davranışlarını azaltabilen genler araştırılmamıştır. Bu genlerin belirlenmesi ve ilişkili oldukları hücresel yolların incelenmesi, dirençli suşların hedeflenmesini sağlayacak yeni tedavilerin keşfinde önemli bir potansiyele sahiptir.

1.2 Tezin Amacı

Farklı antibiyotiklere dirençli hale getirilen *E. coli* bakterisinde adaptasyondan sonra hücre büyümesinde önemi artan genlerin ortaya çıkarılması için genom çapında CRISPRi tarama yönteminin uygulanması hedeflenmiştir. Bu amaca yönelik belirlenen hedefler şunlardır:

- ✓ *E. coli* hücrelerinin ampisilin, kloramfenikol, doksisisiklin, oksasiline ve spiramisine dirençli hale getirilmesi
- ✓ Yabanıl tip ve mutant tip *E. coli* hücrelerinin CRISPRi kütüphanesiyle transformasyonu ve genom çapında tarama deneylerinin yapılması
- ✓ Kütüphaneyi oluşturan plazmitlerin sgRNA okuma sayılarının elde edilmesi
- ✓ Elde edilen verilerin işlenmesi ve analizi
- ✓ Antibiyotiklere adaptasyondan sonra önemi artan genlerin belirlenmesi gerçekleştirilecektir.

1.3 Hipotez

Bu tez çalışmasının hipotezi; genom çapında CRISPRi tarama protokolünün antibiyotiklere dirençli bakterilerde uygulanması ile, adaptasyondan sonra hücre için daha önemli hale gelen genlerin belirlenebileceği fikrinden yola çıkılarak oluşturulmuştur.

2.1 CRISPRi Sistemi ve Özellikleri

2.1.1 CRISPR Sistemi

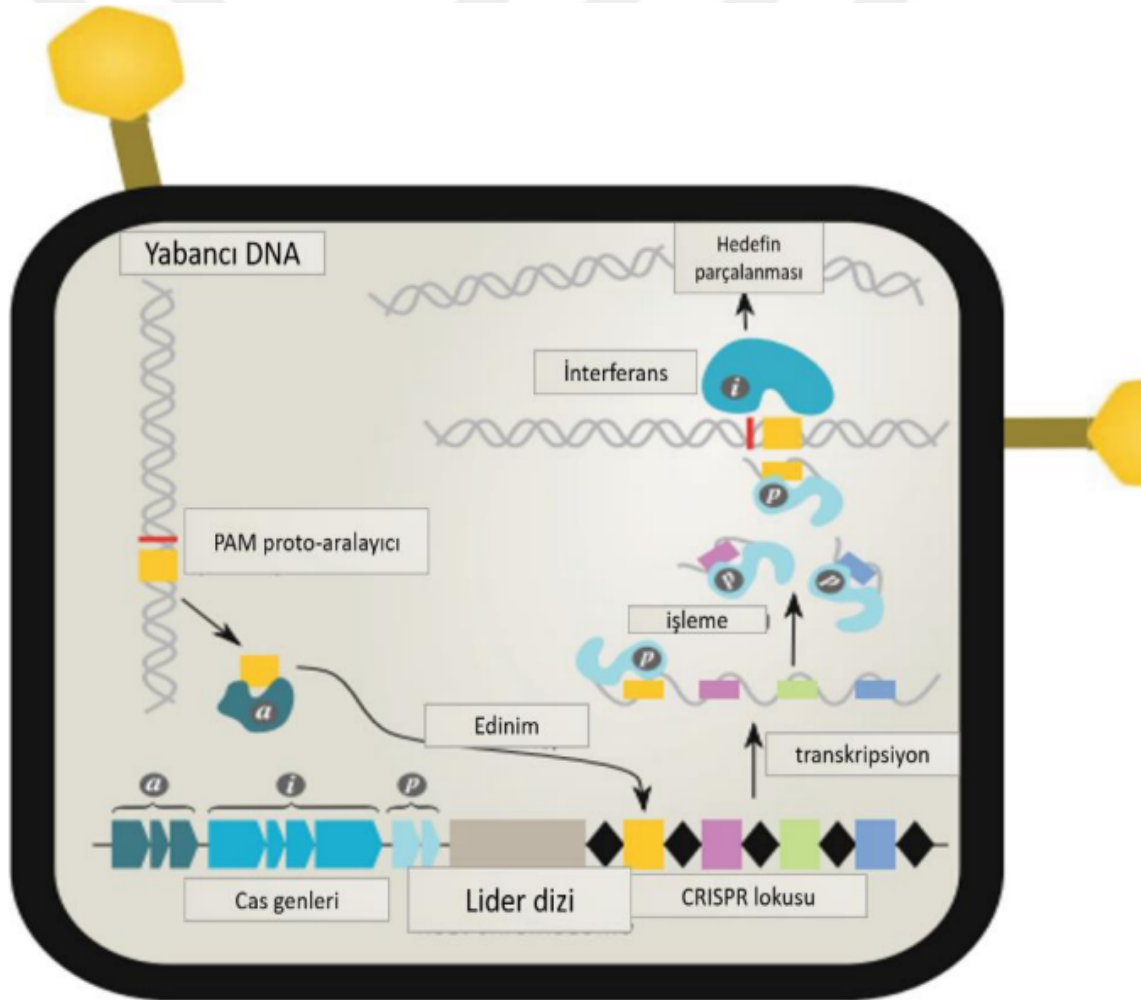
Düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar (CRISPR) ve CRISPR ile ilişkili (Cas) genlerden oluşan CRISPR/Cas sistemleri farklı birçok prokaryotik türde bulunur. Bu sistemler faj genomları gibi yabancı DNA'yı spesifik olarak tanıır ve yok eder. Böylece organizmaya bağışıklık sağlar [20].

CRISPR lokusları bakterilerin % 90'ında ve arkelerin % 40'ında bulunur. CRISPR lokusları nükleaz, helikaz ve polimeraz işlevlerine sahip proteinleri kodlayan Cas genlerinden ve istilacı genomlardan elde edilen aralıklı dizilerle bağışıklığı işlevsel hale getiren nükleik asit belleği şeklinde fonksiyonlaşmıştır [21]. CRISPR lokuslarından transkribe edilen RNA dizileri işlendikten sonra nükleazların hedefi tanımasıyla bağışıklık tepkisi sağlanır ve elde edilen dizi CRISPR lokusuna entegre edilerek hafıza kazanılır. Tip I, III ve IV dahil olmak üzere Sınıf 1 sistemler, çok alt birimli RNA rehberlikli Cas nükleazlarının kullanımı ile tanımlanırken, Tip II, V ve VI dahil olmak üzere sınıf 2 sistemler tek bir crRNA:Cas ribonükleoprotein kompleksi kullanır [22].

1987'de ilk keşfinden bu yana, Tip I ve Tip II sınıfına ait farklı CRISPR proteinleri genom düzenlemede sıklıkla tercih edilen moleküler araçlar olarak çeşitlenmiştir. Bu moleküler araçlara Cas9 ve türevleri, Cas12a ve Cascade-Cas3 proteinleri örnek verilebilir [1]. DNA'yı ve RNA'yı hedefleyebilen CRISPR araçları gen ifade seviyesinin arttırılması ya da azaltılması, kromatin modelleme, epigenetik modifikasyonlar, fonksiyonel genomik ve genom tarama gibi geniş spektrumlu bir uygulama alanına sahiptir [2].

CRISPR lokusları, aralıklı dizilerle eşit olarak ayrılan kısa tekrarlayan dizi kümelerinden (30-40 baz çifti) oluşur. Enfekte olan hücrelerde, istilacı patojenlerden kaynaklı kısa DNA sekansları, konakçı genomundaki CRISPR dizisinde "aralıklı" diziler olarak yerleştirilir. CRISPR dizisi, CRISPR RNA'lar

(crRNA'lar) olarak bilinen tek bir aralıklı içeren küçük RNA'lara transkribe edilir ve işlenir. Bu crRNA'lar, CRISPR ile ilişkili (Cas) proteinlere ve trans-aktif edici CRISPR RNA (tracrRNA) molekülüne bağlanır ve crRNA'larda aralıklı dizilerle baz eşleşmesi yoluyla yabancı DNA veya RNA dizilerini tanıyan efektör kompleksler haline gelir. Cas proteinler, DNA'nın palindromik tekrar kümelerinden kopyalanan RNA'ya bağlanabilen ya da RNA aralıklılarıyla eşleşmiş DNA'yı kesen helikazlardır. TracrRNA ve crRNA, proto-aralıklı bitişik motif (PAM) bölgelerinde çift sarmallı DNA kesimini sağlayacak Cas proteinlerini hedefleme üzere birleşirler [23]. Cas proteinleri, sonrasında bağışıklık cevabı indüklemek için istila edilen hedef nükleik asiti parçalar [24]. Bakterilerde *in vivo* da gerçekleşen CRISPR/Cas bağışıklık edinme mekanizması Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



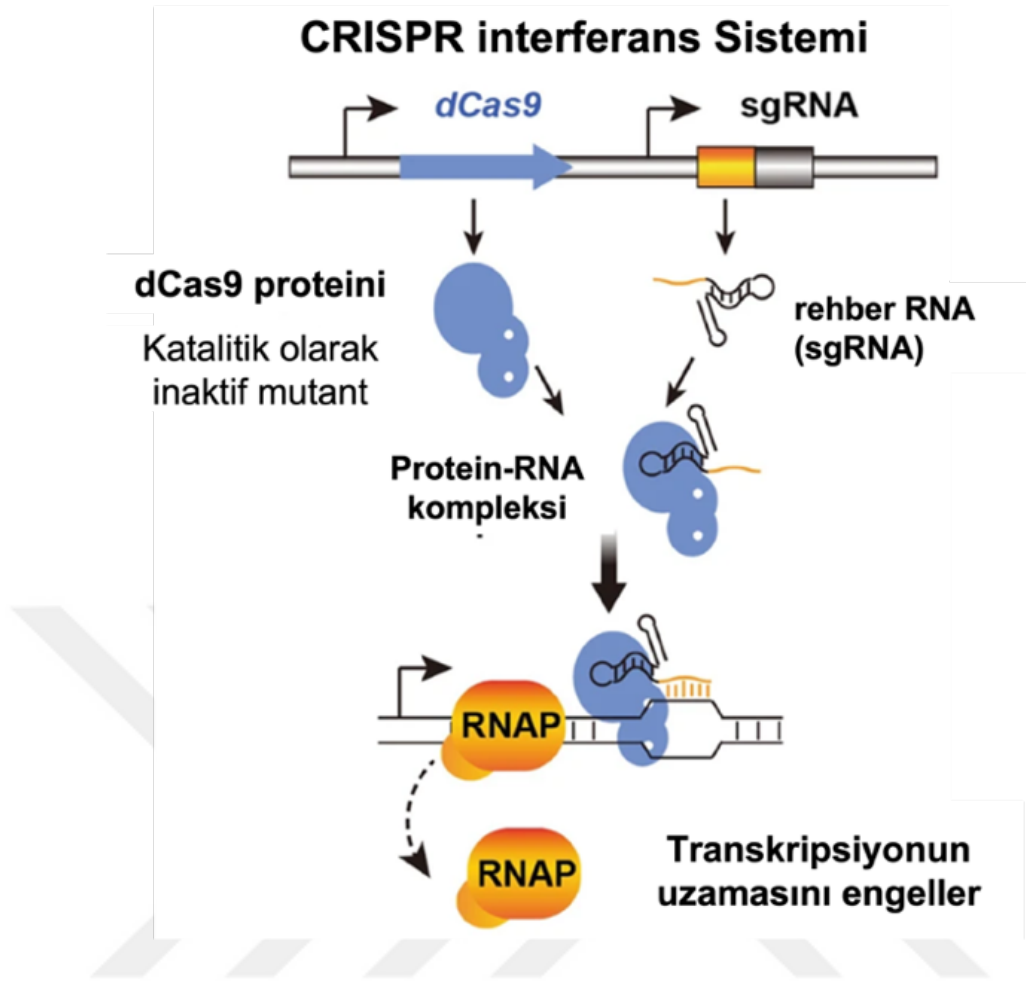
Şekil 2. 1 CRISPR/Cas sisteminin hücre içi moleküler mekanizması [26].

2.1.2 CRISPRi Sistemi

CRISPR interferans (CRISPRi), prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde gen ekspresyonunun diziye özgü baskılanmasını sağlayan moleküler bir araçtır. Bilim insanları; Cas9 proteinin programlanabilir şekilde hedef DNA'da çift zincir kırılımı oluşturma mekanizmalarını araştırırken, proteinin nükleaz domainlerinde oluşturdukları bölgeye özgün mutasyonlarla HNH ve RuvC bölgelerinin fonksiyonunu ortaya çıkarmıştır [25]. Qi ve ekibi, CRISPRi'yi diziye spesifik gen baskılanmasını sağlayabilecek RNA rehberlikli yeni bir teknik olarak 2013 yılında önermiştir [3], [4].

CRISPRi sistemleri, Tip II Streptococcus pyogenes'in CRISPR/Cas sistemlerinden türetilmiştir. Sistem, iki bileşen (dCas9 ve sgRNA) ile hedef DNA'ya programlanır. 20 nükleotitlik hedef DNA'ya tamamlayıcı bölge, 42 nükleotitlik Cas9 bağlayıcı RNA yapısı ve 40 nükleotitlik transkripsiyon sonlandırıcı dizi, toplamda 102 nükleotit uzunluktaki sgRNA'yı oluşturur. Cas9 proteini, RuvC ve HNH katalitik domainlerinde bulunan iki nokta mutasyonu (D10A ve H841A) yüzünden endonükleaz aktivitesini yitirmiştir. Bu mutant protein; ölü Cas9 ya da dCas9 olarak tanımlanmıştır. dCas9 proteini ise iki nokta mutasyonundan bağımsız olarak, hedef DNA'ya bağlanabilir ve sgRNA ile kompleks oluşturabilir [4].

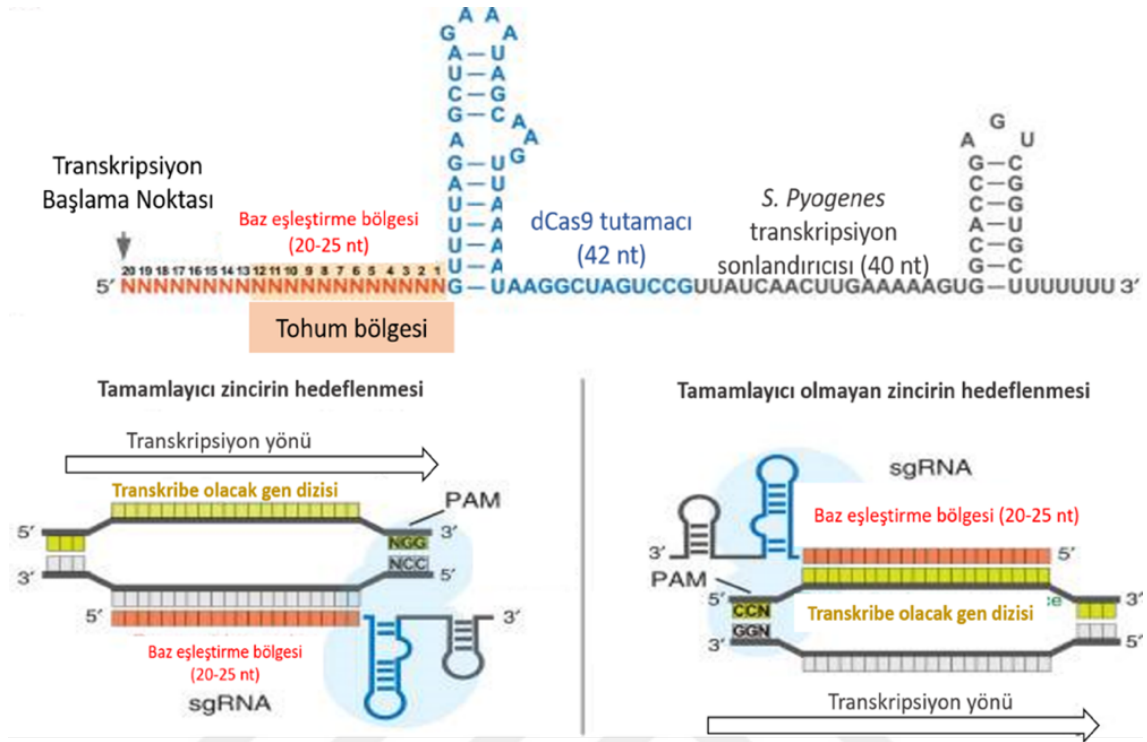
dCas9 ve sgRNA eksprese edildiğinde hedef DNA'yı kesmeden spesifik diziye bağlanabilen DNA tanıma kompleksi oluşturur. Hedef DNA'nın promotor dizilerine bağlanmak üzere sgRNA ve dCas9 programlandığında; transkripsiyon başlangıcı bloke edilebilir. Alternatif olarak sgRNA genin kodlayıcı zincirine hedeflenerek dCas9'un oluşturacağı sterik engel aracılığıyla transkripsiyon uzaması da engellenebilmiştir. CRISPRi sisteminin hedef DNA'ya bağlanarak transkripsiyon uzamasını engellediği Qui vd. tarafından NET-Seq (Yerel Uzayan Transkript Sekansalama) deneyi yapılarak ispat edilmiştir [4]. Şekil 2.2'de CRISPRi sisteminin çalışma prensibi görselleştirilmiştir.



Şekil 2. 2 CRISPRi çalışma mekanizmasının şeması [26].

Qui ve arkadaşları, dCas9 ve hedefe tamamlayıcı sgRNA'ları kullanarak CRISPRi aracını gen baskılanması sağlamak üzere bakteri ve memeli hücrelerinde yeniden programlamışlardır [4]. *E. coli*'de, hedeflenecek herhangi bir gene tamamlayıcı 20 nükleotit uzunlukta tasarlanmış sgRNA ile birlikte eksprese edildiğinde % 99.9'a kadar etkin bir performansla gen ifadesini baskılamayı başarmışlardır ve kantitatif PZR ile ispat etmişlerdir. dCas9-sgRNA birlikteliğinin hedef dizinin kodlayıcı olmayan DNA zincirine bağlanması sonucu transkripsiyon uzamasını inhibisyonu NET-Sekanslama deneyleriyle kanıtlanmıştır [4]. sgRNA hedef genin promotor bölgesine hedeflendiğinde, dCas9-sgRNA kompleksinin RNA polimerazın transkripsiyon faktörleriyle kuracağı trans etkileşimi sterik olarak engellediği ve transkripsiyon başlangıcının inhibisyonu çalışmalarının bir diğer çıktısıdır. Araştırmacılar, CRISPRi aracının yüksek özgüllükle hedeflenebilir olduğunu, gen baskılanmasının indükleyicinin ortadan kaldırılmasıyla tersine çevrilebilir olduğunu da tespit etmişlerdir. Çoklu sgRNA'lar kullanarak eş zamanlı olarak

birden fazla geni hedeflemeyi veya tek bir geni birkaç farklı pozisyondan paralel olarak baskılanması gerçekleştirilebilir [3], [4].



Şekil 2. 3 sgRNA yapısı ve CRISPRi'nin hedeflenme mekanizması [3].

CRISPR/Cas tabanlı CRISPRi sisteminin hücreye transformasyonu için plazmit DNA'lar veya kromozoma entegre olabilen genetik parçalar tasarlanmıştır. Plazmit DNA'lar sgRNA'yı ve dCas9'u tek tek veya aynı diziden ifade edecek şekilde hazırlanmıştır. Tek plazmit sistemi dCas9 ve sgRNA'yı birlikte içeren kompozit bir yapıdadır. Ayrıca dCas9'u ve sgRNA'yı ayrı ayrı ifade edecek bağımsız tek plazmitler de hazırlanmıştır. Kromozoma entegre edilmiş sistemlerde ise dCas9 bakteri kromozomunda genom işlevini bozmayacak nötr bir bölgeye eklenmiştir. Rehber RNA ise küçük boyutlu bir plazmite klonlanarak yetkin hücrelere transfer edilmiştir [3]. Uygun tasarım ve deneysel koşulun sağlanması halinde, CRISPRi sistemi kısa plazmit DNA'lar ile laboratuvar ortamında kolayca çalışılabilir. Plazmit DNA'lar ile çalışabilmenin getirdiği bir diğer avantaj ise birçok sgRNA ile aynı anda çalışıp hücresel seviyede gen baskılanmasına dair bilgileri edebilmektir. Genom çapında yapılan CRISPRi kütüphaneleri fonksiyonel genomik çalışmalara uygunluğuyla son yıllarda öne çıkan bir araştırma sahasıdır [9], [10].

2.1.3 CRISPRi Sisteminin Moleküler Mekanizması

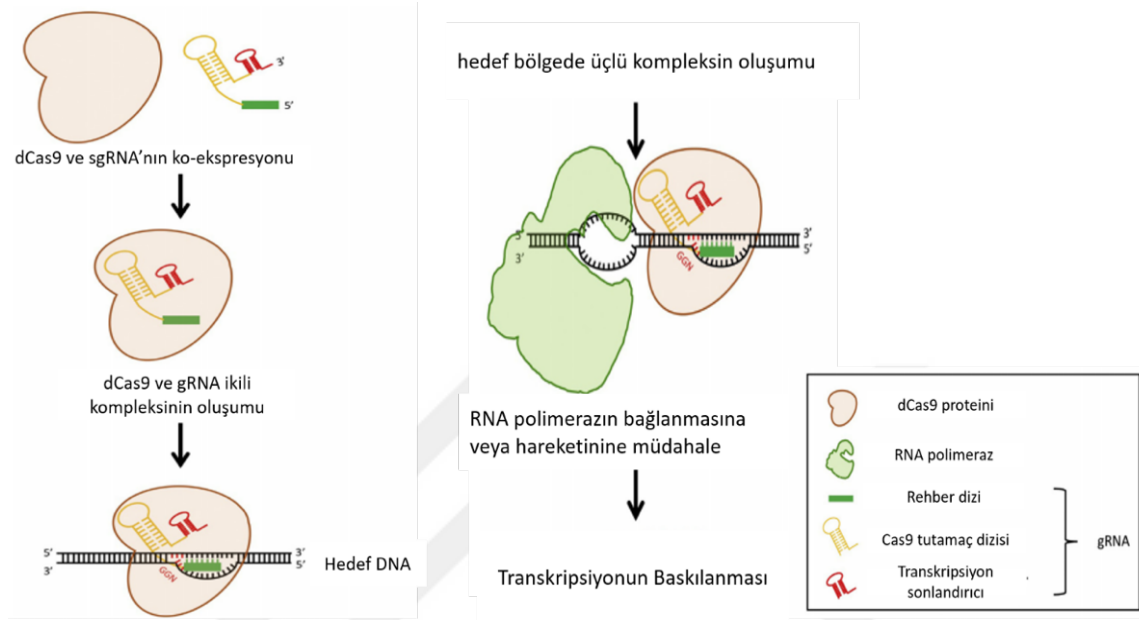
dCas9:sgRNA:DNA kompleksi oluşumu hakkında kapsamlı bilgiler CRISPRi mekanizmasını anlamada kritik öneme sahiptir. Hedef DNA-sgRNA-dCas9'un oluşturduğu kompleks yapı Nishimasu vd. tarafından 2016 yılında raporlanmıştır [27]. dCas9 ve sgRNA'nın eşleşmesinin başlangıcından transkripsiyonal baskılamanın son adımına kadar CRISPRi, farklı bileşenlerin çoklu bağlanmasını ve konformasyonel olarak yeniden düzenlenmesinin sonucunda oluşur [28].

Mekanizma, dCas9 ile hedefe tamamlayıcı bölgeyi içeren sgRNA arasında ikili bir kompleksin oluşumuyla başlar. İkili kompleksin oluşumu dCas9'da yapısal olarak yeniden düzenlenmesine neden olur ve sonucunda DNA'yı hedeflemek için uygun bir konformasyon sağlanır. dCas9'a sgRNA yüklenmesinde üç ana etkileşim noktası önemlidir. İlki, rehber bölgenin fosfat omurgasının dCas9'un REC lobuyla etkileşimidir. İkincisi, bu etkileşim sırasında tekrarlı bölgedeki G43 ve U44 kalıntılarının spesifik olarak tanınmasıdır. Üçüncüsü, tekrarlı olmayan bölgelerin REC domainince spesifik tanınması sonucunda dCas9 ve sgRNA arasında ikili kompleks kurulmuş olur [28].

Özetle; sgRNA'nın hedefe tamamlayıcı dizisindeki ilk 10 nükleotiti karakteristik tohum bölgesidir ve sgRNA-hedef DNA hibridizasyonunda oldukça etkili bir rol oynar. Hedef DNA ile sgRNA'nın tamamlayıcı nükleotitleri sonucu eşleşmesi, tohum bölgesinden başlar. Tohum bölgesi, dCas9-sgRNA ikili kompleksini hedef DNA dizisiyle ilişki kurmaya yöneltir ve dCas9 hedef DNA'yı tanıyabilecek aktif konformasyona kavuşur. Hedef DNA-sgRNA kompleksi negatif yüklüdür, dCas9'un REC ve NUC lobundaki pozitif olukla etkileşim kurar. Bu etkileşim dCas9'un fosfat omurgası ve karbon atomlarının REC1, RuvC ve PI domainlerinin bağlantı kurmasıyla sonuçlanır [28].

dCas9'un hedef bölgede konumlanması, sgRNA'nın hedeflenmesine bağlı olarak mRNA transkriptinin uzaması veya transkripsiyonun başlaması esnasında RNA polimeraz ile fiziksel çarpışma nedeniyle transkripsiyonu doğrudan bloke eder. dCas9, mRNA stabilitesine veya translasyonuna herhangi bir müdahalede bulunmaz [4]. dCas9, hedef bölgede transkripsiyonel duraklamaya neden olur [29]. Gen baskılanmasının aksine genom düzenleme uygulamalarında üçlü

kompleksin hedef bölgede konumlanması, Cas9'n HNH domainin hedef DNA'nın tamamlayıcı dizisine ulaşmasını ve PAM'ın 3 nükleotit ilerisinden dizinin bölünmesini sağlayacak konformasyonel yapıyı kazandırır. Aynı anda tamamlayıcı olmayan zincirde RuvC domaini tarafından da kırık oluşturulur [30].

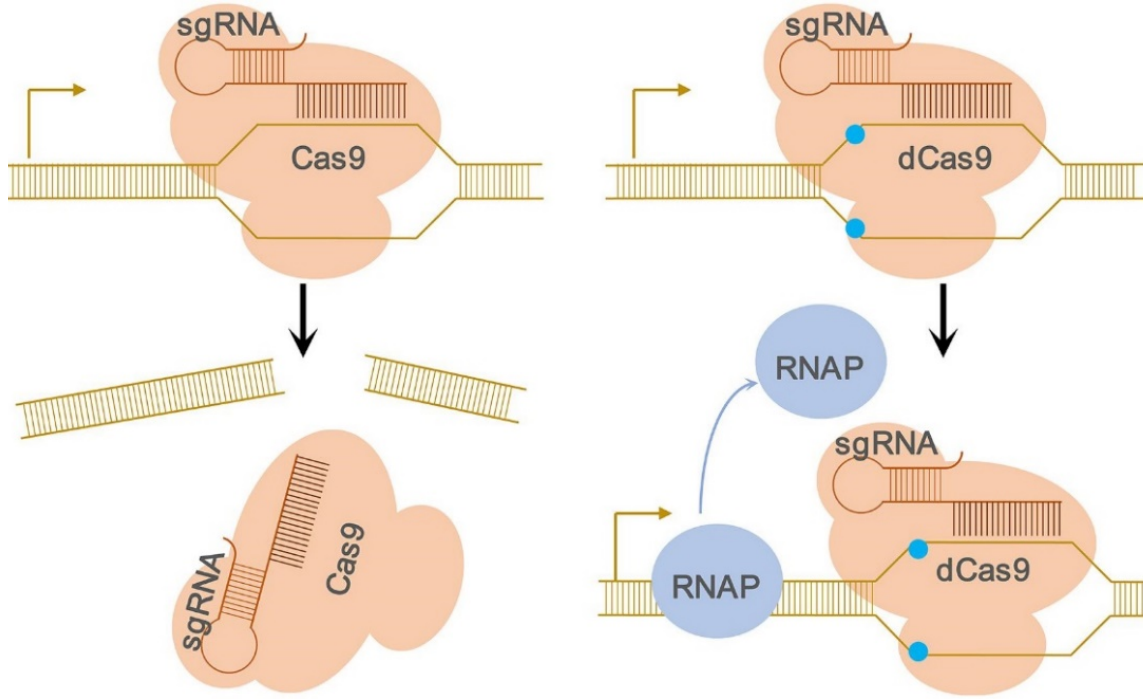


Şekil 2. 4 dCas9-sgRNA-hedef DNA arasındaki üçlü kompleksin oluşum mekanizması [30].

2.1.4 Cas9 ve dCas9 Proteinlerinin Karşılaştırılması

Doğal Cas9 proteini, sgRNA'ya bağlanır ve bir Cas9-RNA kompleksi oluşturur. Cas9-sgRNA kompleksi, PAM'a bitişik spesifik DNA hedefine bağlandığında, Cas9 proteininin nükleaz aktivitesi nedeniyle hedef DNA'nın bölünmesine yol açar. Bu mekanizmayla genom mühendisliği uygulamaları NHEJ ve HDR yoluyla uygulanmıştır. Nükleaz domainlerinde oluşturulan nokta mutasyonları (D10A ve H840A) nedeniyle katalitik aktivite sergileyemeyen dCas9 ve hedefe diziye tamamlayıcı sgRNA ile oluşturduğu dCas9-sgRNA kompleksi ise gen ekspresyonunu inhibe etmek için uygun bir araç haline getirilmiştir. Hedef DNA açık okuma çevreleri içinde yer alıyorsa dCas9-sgRNA-DNA kompleksi RNA polimerazın transkripsiyon için dizi üzerinde gerçekleştirmesi gereken kayma hareketlerini engelleyecek steril bir engel oluşturur böylece transkripsiyon başlangıcı veya uzamasını kolayca inhibe edilir. Hedef genin transkripsiyonun engellenmesiyle işlev gören CRISPRi sistemleri, gen regülasyonunu kontrol edecek

şekilde programlanabilir durumdadır [4]. Şekil 2.5'te Cas9 ve dCas9'un fonksiyonlarının karşılaştırılması gösterilmiştir.



Şekil 2. 5 Cas9 ve dCas9'un fonksiyonlarının karşılaştırılması [30].

2.1.5 CRISPRi Sisteminin Avantaj ve Dezavantajları

CRISPRi sisteminin birkaç önemli avantajı bulunmaktadır. CRISPRi sistemleri gen baskılanması için kolayca programlanabilir [29]. sgRNA-hedef DNA ve bir PAM motifinin Watson-Crick baz eşleşmesine dayandığından, genom içindeki hedeflenebilir bölgelerin seçimi basit ve esnektir [3]. Plazmitler aracılığıyla programlanan CRISPRi, genomda herhangi bir değişim yapmaz ve hedeflemediği hücresel elementlere etkileşime girmez. Hücre içi toksisite veya spesiklik gibi sınırlayıcı yanlarıyla diğer moleküler araçlarla hedeflenemeyen kodlama yapmayan RNA'lar ve diğer gen dizileri CRISPRi ile çalışılabilir [31]. Hem ökaryot hem prokaryot birçok organizmada uygun sgRNA tasarımlarının yapılmasıyla promotor diziler veya intronlar dahil birçok gen bölgesi hedeflenebilir [3]. Hedef DNA'ya spesifik olarak kontrol edilebilmesi özelliğiyle CRISPRi sistemi, gen işlevlerini ve hücresel yolları araştırmak için güçlü bir tekniktir [32].

CRISPRi sistemi kullanılarak birden fazla genin ifadesi eş zamanlı olarak düzenlenebilir. Qi ve arkadaşları, çoklu gen ifadesi baskılanması için tek plazmit

içine birkaç farklı sgRNA dizisini klonlamış ve çapraz ifadeler oluşmadan bağımsız genler üzerinde etkin susturma verimi elde etmişlerdir [29]. Bu sonuçlar metabolizma çalışmaları için de oldukça önemli olmuştur. Birçok araştırma grubu CRISPRi araçlarını kullanarak birden fazla gen ifadesini değiştirerek, metabolizma yollarının regülasyonunu aydınlatma ve ürün miktarını artırma gibi çalışmalar yapmıştır. Kim ve ekibi çoklu gen ekspresyonunu baskılamak için ayarlanabilir CRISPRi sistemini tasarlamıştır. Rekombinant *E. coli*'de n-bütanol üretim ve verimini artırmak için metabolizma mühendisliği ve CRISPRi araçlarını birleştirmişlerdir [33]. Benzer şekilde, 4HB sentezinde işlev gören birçok esansiyel gen ifadesini düzenlemek için CRISPRi aracı kullanılmış ve ilgili hücresel yolda yer alan P(3HB-co-4HB) ürününün seviyesi düzenlenmiştir [34].

CRISPRi kullanılarak gen ifadesinin azaltılmasının yanında, baskılama seviyesi de kontrol edilebilir. Genin baskılanma seviyesinin ayarlanabilmesi oldukça önemlidir. Esansiyel birçok genin ifadesi normal hücresel faaliyetlerde titizlikle düzenlenir. Bu genlere yapılan müdahale sonucu hücrede hasarlar meydana gelir. CRISPRi kullanılarak bu genlerin geçici olarak hedeflenmesi ileri işlemlerin yapılabilmesine olanak sağlar. CRISPRi aracını kullanarak ayarlanabilir gen baskılanmasını sağlayan başlangıç çalışmalarında sgRNA ve hedef dizi arasında nükleotit uyumsuzlukları eklenmiştir [35]. Devam eden çalışmalarda; baskılanma seviyesini ayarlamak için indüklenebilir promotor bölgeler içeren dCas9 veya sgRNA plazmitleri kullanılmıştır [3]. İndükleyicinin konsantrasyonu titre edilerek baskılanma derecesi çok küçük ve büyük seviyelere taşınmıştır. Li ve ekibi 2016 yılında yaptıkları ayarlanabilir CRISPRi (t-CRISPRi) aracıyla P_{BAD} promotoru kontrolünde dCas9'ın ifadesini ayarlamışlardır. Çalışmaları sonucunda CRISPRi araçlarını ayarlanabilir seviyede tutmak için dCas9 ekspresyonunu indükleyici bir promotor altında kontrol etmenin daha etkili sonuçlar verdiğini raporlamışlardır [36]. Bir diğer araştırma grubu, CRISPRi sisteminin sunduğu baskılanma seviyesini dinamik bir aralıkta tutmak için dCas9 ve sgRNA plazmitlerini konstitütif ve indüklenebilir promotorlarla ifade ederek raportör genin ifade seviyesini kantitatif olarak ölçmüşlerdir. P_{tet} promotoruyla sgRNA'nın ekspresyon seviyesini değiştirmenin gen baskılanmasında geniş bir titrasyon aralığı sunduğu

tespit edilmiştir. Sonuç olarak baskılama seviyesini kontrol etmenin yolu sgRNA ifadesini ayarlamakla elde edilebilir [37].

Hedeflenen gen baskılanmasının geri dönüştürülerek tersine çevrilebilmesi de CRISPRi aracının sunduğu önemli avantajlardan biridir. Bu durum hedef genin geçici ve dinamik olarak düzenlenebilmesini sunar. dCas9'un anhidrotetrasiklin ile indüklenebilir bir promotor altında ekspresyonu ve indükleyicinin besiyerinden yıkanarak uzaklaştırılmasıyla hedef hücrede birkaç saat sonra gen baskılanmasının geri çevrildiği gözlemlenmiştir [29]. Bir diğer çalışmada ise P_{BAD} promotorundan arabinozla dCas9 ekspresyonu aktive edilmiş ve yine indükleyicinin ortamdan yıkanmasıyla baskılamanın tersine çevrilebilir olduğu tespit edilmiştir [36]. Önceki çalışmalardan farklı olarak, aktif olarak çoğalan *Yersinia pestis* hücrelerinde hedeflenen CRISPRi inhibisyonunun tersine çevrilmesini takiben organizma normal büyüme koşullarına geri dönmüştür [38].

Genom çapında sgRNA kütüphanesi tasarlayan yakın zamanlı bir çalışmada, makine öğrenmesi yaklaşımları ve deneysel analizlerle CRISPRi sisteminin performansını etkileyen kötü tohum etkisi raporlanmıştır. Araştırmacılar, bazı tohum dizilerinin güçlü büyüme kusurları oluşturduğunu raporlamışlardır. 5 nükleotitlik bu spesifik tohum dizilerinin gösterdiği etkinlik, sgRNA'nın kalan 15 nükleotitlik kısmından bağımsız olarak tespit edilmiştir [39].

Hedeflenen bir gene spesifik olarak tasarlanan sgRNA'nın, operondaki tüm aşağı akış genlerinin de ifadesini bastırma potansiyeli polar etki olarak tanımlanmıştır [13]. Bu durum, hedef genin transkripsiyonu dCas9 tarafından bloke edildiğinde, transkripsiyona devam etmek üzere DNA'da ilerlemesi gereken RNA polimerazın aşağı akışta yer alan genlerin transkripsiyonu da gerçekleştirememesiyle açıklanır [39]. Tersine, CRISPRi sistemi operonda yer alan esansiyel genlerin yukarı akışında bulunan diğer genlere hedeflendiğinde, hücre canlılığında bozulmalar tespit edilmiştir [13]. Yukarı akışta ifadesi bastırılan genden aşağı akıştaki esansiyel gen ifadesi, dCas9-sgRNA kompleksinin DNA sarmalında RNA polimerazı engellemesi de ters polar etkiyle açıklanmıştır [13].

CRISPRi sisteminin kullanımını sınırlayan bir diğer faktör, yüksek seviyelerde ekspresyon sonucu gerçekleşen dCas9 toksisitesidir. Yapılan araştırmalarda

dCas9'un toksisitesinin *Vibrio natriegens*'in lag fazını etkilediği ortaya konmuştur [40]. Aşırı miktarda eksprese edilen dCas9'un *E. coli*'de büyüme oranını önemli derecede düşürdüğü ve hücrelerin anormal filamentli bir morfolojiye sahip olduğu da Cho ve arkadaşlarının yaptığı araştırmalar sonucunda raporlanmıştır. Katalitik olarak aktif olmayan Cas9'un kontrolsüz ekspresyonu hücre bölünmesinde rol alan genlerin yukarı doğru regülasyonunu sağlarken, hücre zarındaki proteinleri kodlayan genleri aşağı doğru regülasyonunu sağlayarak hücrenin normal büyümesini düzenleyen yolları etkilediği gösterilmiştir [41]. Bir diğer örnek ise *Mycobacterium tuberculosis*'te alternatif bir dCas9 kullanımı (dCas9Spy) sonucu gözlemlenen hücre ölümüdür [42]. Bu sınırlayıcı faktörün etkisini azaltmak için araştırmalar dCas9'un ifade seviyesini ayarlamak ve toksisite göstermeyen dCas9 varyantı tasarlamak yönünde olmuştur [43]. Optimize edilmiş RBS kütüphanesinin arkasına klonlanan ve zayıf P_{tet} promotorunun ekspresyonu sonucu dCas9 toksisitesi azaltılmıştır [39].

Genom çapında CRISPRi tarama araştırmalarında, kütüphanenin etkinliğini artırmak için en iyi inhibisyonu veren sgRNA ve tasarım kuralları incelenmiştir. Çalışmalar sonucunda hedef dışı etkiler raporlanmıştır. Makine öğrenmesi yaklaşımlarıyla tüm genomu tasarlanan sgRNA kütüphaneleri taranmıştır ve en az inhibisyonu veren sgRNA dizilerinin ortak özellikleri belirlenmiştir. Bu ortak özellik tohum dizisinde en az 9 nükleotitlik homolojiye sahip sgRNA'ların hedef dışı etkiler göstermesidir [39]. Takip eden çalışmalarda tüm genomu hedefleyen sgRNA kütüphanesi tasarım kuralları optimize edilerek kütüphanenin etkinliği artırılmıştır [10].

2.1.6 Bakterilerde CRISPRi Uygulamaları

Bakteriyel genomlar oldukça küçük boyutları ve basit organizasyonları sebebiyle CRISPRi sistemi çalışmalarında sıklıkla tercih edilmiştir. Ayrıca bakteriyel genomlar CRISPR-Cas9 sistemiyle çalışmaya elverişli olmadığı için fonksiyonel genomik çalışmalar bu sahaya yönelmiştir. Ek olarak sunduğu avantajlarla diğer moleküler araçlara kıyasla nispeten aşılabilir sınırlayıcı faktörleriyle CRISPRi araçlarının moleküler biyoloji ve genetik araştırmalarında yaygınlaşması olağandır. Hedef genlerin ifade seviyesinin bastırılmasıyla istenilen metabolizma

ürünlerinin miktarını artırmak ya da azaltmak, genom çapında sgRNA kütüphaneleri kullanarak genomik taramalar yapmak, esansiyel genleri saptamak, gen haritası oluşturmak, ilaç hedeflerinin tayini ve patojenlerde virülans genlerinin analizi gibi farklı uygulamalar yaygın kullanım alanlarıdır.

Patojenlerdeki spesifik genlerin fonksiyonel bir analizini gerçekleştirmek için CRISPRi sistemi kullanımı bakterilerde CRISPRi uygulamalarına örnektir. Peters ve arkadaşları patojenlerde bilinmeyen fonksiyonun viral etkenle ilişkili esansiyel genlerini incelemek için CRISPRi tabanlı gen susturma yaklaşımını kullanmışlardır. Mobil-CRISPRi sistemi bakteri genomlarına entegre edilebilir ve bakteriden bakteriye aktarılabilir durumdadır [7]. Benzer bir çalışma *Pseudomonas aeruginosa*'da Mobile-CRISPRi sistemi kullanılarak virülans mekanizmalarda oldukça önemli olan CE genlerinin hedeflenmesidir. CE gen grubunun bir üyesi olan *exsA* geninin inhibisyonu sonucu farelerde virülans etkilerin azaldığı belirlenmiştir [8].

CRISPRi sistemi bakteriyel patojene dahil edilerek canlılıkla doğrudan ilişkili temel genlerin hedeflenmesi sonucunda aşı ve antibiyotik geliştirme çalışmaları da uygulama alanlarında örnektir. *Streptococcus pneumoniae* serotip 2 D39 suşunda, *murT* ve *gatD* genlerinin hedeflenmiş ve peptidoglikan sentezi için kritik role sahip oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca, yeni aşı ve antibiyotiklerin geliştirilmesine öncü olma potansiyeline sahip olan teikoik asit öncülerinin polimerizasyonunda yer alan *tarP* ve *tarQ* genleri de kayda değer bir sonuçtur [44]. Benzer şekilde *Vibrio cholerae*'de canlılık ve virülans ile ilişkili genleri hedefleyen bir araştırmada ise lipoprotein taşıma sistemi ifadesi azaltılmış ve plazmoliz fenotipi raporlanmıştır [45].

CRISPRi araçlarının bakteriyel uygulamalarında bir diğer çalışma sahası ise bakterilerin metabolizmik faaliyetleri sonucu ürettikleri kimyasallardır. Bu yaklaşımla metabolizma mühendisliği ve CRISPRi araçları birleştirilmiştir. Araştırmacılar bakterilere ürettirilen ticari öneme sahip kimyasalların miktarını artırmak için, CRISPRi sistemini programlayarak ilgilenilen ürünün biyosentezinden sorumlu genin ifadesini düzenlemişlerdir. Pilot çalışmalarda *Corynebacterium glutamicum*'da ilgili genlerin ekspresyonu değiştirilerek şikimik

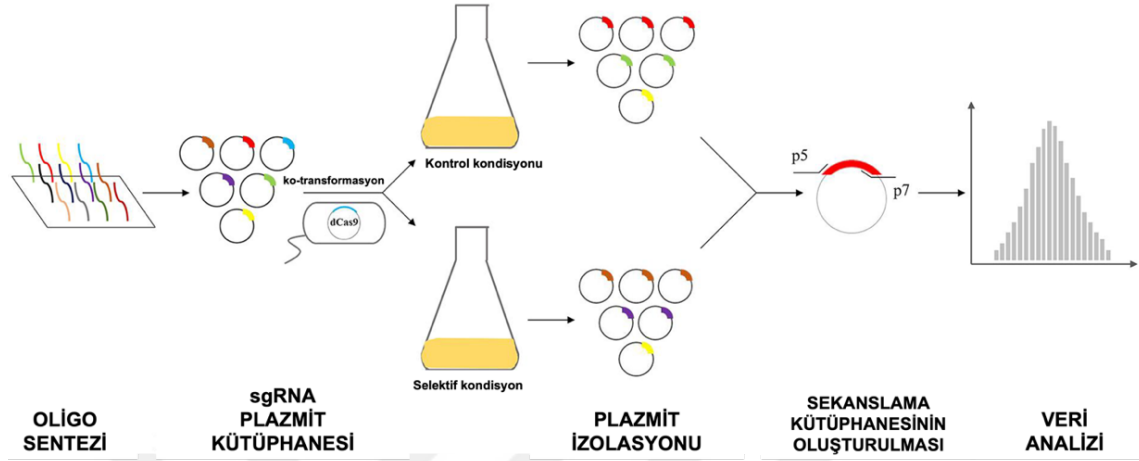
asit verimi artırılması yer alır [46]. Benzer şekilde P3G üretimi artırmak için *E. coli*'de metiyonin biyosentetik yolağını aşağı regüle edilmesi maksadıyla MetJ geni ifadesini bastırmıştır [6]. Ek olarak *Bacillus subtilis*'te surfaktin sentezini artırmak için metabolizmada yer alan yan yollardaki genleri susturmanın amino asit öncülleri sentezini artırdığı belirlenmiştir [5].

2.2 Bakterilerde Genom Çapında CRISPRi Tarama

CRISPRi sisteminin sunduğu önemli avantajlardan biri olan hedef gene spesifik 20 nükleotitik sgRNA'ların tasarım kolaylığıdır. Plazmit DNA'lar aracılığıyla organizmaya iletilen sistem, genom çapında taramalar yapılarak birçok bakteriyel türde fonksiyonel genomik çalışmaların yapılmasını sağlamıştır [8]–[10].

Genom çapında CRISPRi tarama deneylerinin temel bileşeni olan sgRNA kütüphanesi, genellikle, hedef genlere tamamlayıcı sgRNA dizilerinin bir karışımı olarak DNA çip tekniği ile sentezlenir. Bu diziler DNA *in vitro* birleştirme yöntemiyle sgRNA eksprese eden plazmitlere klonlanır. Oluşturulan sgRNA kütüphanesi, dCas9 proteinin eksprese eden hücrelere transforme edilir. Farklı sgRNA'ları içeren bu hücrelerin her biri belirli bir genotipi temsil etmektedir. Oluşturulan kütüphaneyle transforme edilen hücreler ilgilenilen seçici ortamda ve kontrol koşullarında indükleyici varlığında büyütülür. İnkübasyon süresince kütüphaneyi oluşturan sgRNA plazmitleri bulundukları hücrede hedeflenen genin dCas9 inhibisyonundan ne derece etkilendiğine bağlı olarak sayıca artar ya da azalır. CRISPRi tarama deneylerinde, özellikle büyüme üzerinde etkin roller üstlenen genlerin sgRNA kütüphanesinden önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir [9], [11], [12], [47]. Tarama deneylerini takiben, tüm genomu hedefleyen sgRNA kütüphanesindeki nicel değişimler plazmitlerin sgRNA içeren bölgelerinin dizilenmesiyle ölçülür. Bu amaçla, sıklıkla Yeni Nesil Dizileme tekniği uygulanır [10]. Her bir deney grubunun içerdiği sgRNA kütüphanesinin okuma sayısı tarama öncesi ve sonrası ile bölünerek kat değişim değeri elde edilir. Bu değer, dCas9'un RNA polimerazı engelleme gücünü ifade eder ve hedef genin inhibisyonuna karşın hücrenin gösterdiği büyüme farklılığının bir faktörüdür [26]. Deneysel hataları minimize etmek ve doğruluğunu artırmak için çalışmalarda yaygın olarak her bir gen için birden fazla sgRNA tasarımı yapılmıştır. Her bir

genin büyümeye etkisi ise aynı geni hedefleyen sgRNA'ların medyan kat değişimi hesaplanarak belirlenir. İstatiksel analizler yapılarak seçici ve kontrol ortamı için hesaplanan değerler karşılaştırılır [8]–[10]. Şekil 2.6'da genom çapında CRISPRi tarama deneylerinin akış şeması gösterilmiştir.



Şekil 2. 6 Genom çapında CRISPRi tarama deneylerinin akış şeması [30].

Yüksek verimli genom çapında CRISPRi tarama çalışmalarıyla hücre morfolojisi ve büyümeye ilişkili temel genlerin genotip ve fenotip ilişkisi üzerinde birçok araştırma yapılmıştır. Literatürde yer alan ilk çalışmalar *E. coli* [9], [39] ve *M. smegmatis*'te [47] yapılarak büyük ölçekli fonksiyonel genomik deneyler CRISPRi ile uygulanmıştır. Organizmanın neredeyse tüm genlerini hedefleyen ~60.000, ~90.000 ve ~12.000 sgRNA içeren bu kütüphaneler, genom çapında yapılan CRISPRi taramalarının güvenilirliğini ve esansiyel gen araştırmalarında kullanılabilirliğini göstermesi açısından oldukça önemlidir. Güncel bir diğer çalışmada ise tanımlanamayan sgRNA'ları hedefleyen ~33.000 sgRNA içeren CRISPRi kütüphanesi kullanılarak yeni gen fenotipleri ortaya çıkarılmıştır [48]. *Streptococcus pneumoniae*'de yeni esansiyel genlerin tanımlandığı ve antibiyotik hedefi olma potansiyeline sahip genlerin vurgulandığı bir diğer yüksek verimli CRISPRi çalışması ise yöntemin fonksiyonelliğini vurgulamaktadır [8]. Gram pozitif model bakteri *Bacillus subtilis*'te hücre morfolojisiyle yakından ilişkili temel genleri keşfetmek için CRISPRi taraması kullanımı da literatürde yer alan önemli bir çalışmadır [40]. *Vibrio natriegens*'in hızlı büyümesi için gereken minimum bir gen seti tanımlanarak organizma genomunun fonksiyonel olarak araştırılması da kayda değer bir araştırmadır [41]. Bakteriyofajlarda fonksiyonel soy üretimi için

λ , T4 ve 186 fajlarının gereksinim duyduğu konak *E. coli* genlerini tanımlanmış ve böylece gelişmiş faj terapilerinin tasarımına yeni bir çerçeve kazandırılmıştır [49]. Sonuç olarak yüksek verimli genom çapında CRISPRi tarama çalışmaları birçok mikroorganizma türünde farklı amaçlarla uygulanmış ve yöntemin geliştirilmesi hususunda önemli adımlar atılmıştır.

CRISPRi sistemini genom çapında tarama teknikleriyle birleştiren çalışmaların bir diğer hedefi ise CRISPRi'nin kendi özelliklerini ve tasarım kurallarını geliştirmek olmuştur. Cui ve arkadaşları tüm genomu hedefleyen sgRNA'ları makine öğrenmesi yöntemiyle tahmin etmiş ve bazı sgRNA'larda bulunan spesifik 5 nükleotitlik kötü tohum dizilerini tespit etmişlerdir [39]. Bir diğer araştırma grubu da CRISPRi'nin sunduğu baskılama verimini artırmak için başlangıç konumuna yakın açık okuma çerçevelerini hedefleyen sgRNA'ların kullanımının gerektiğini saptamışlardır. Ek olarak genomu tarayan CRISPRi kütüphanesi içinde bir genin maksimum verimle tamamen susturulmasını sağlamak için en az 10 adet sgRNA-gen kombinasyonunun denenmesi gerektiğini vurgulamışlardır [10]. Daha güncel bir çalışmada ise *E. coli*'de hedef diziye bağlı olarak dCas9'un aktivitesini tahmin edebilen yeni bir model tasarlanmıştır. Özellikle sgRNA'nın genin kodlayan zincirine hedeflenmesinin inhibisyon seviyesinde önemli seviyede farklılıklara sebep olduğunu saptayan bu çalışmada, dCas9'un gen baskılanması aktivitesinin sadece sgRNA tarafından değil, aynı zamanda hedef dizi tarafından da belirlendiği gösterilmiştir [10].

2.2.1 Genom Çapında CRISPRi Tarama Yönteminin Diğer Yöntemlerle

Karşılaştırılması

Bakterilerin RNAi mekanizmasından yoksun olması gen inhibisyonu sağlayan tekniklerin çeşitlenmesine yol açmıştır. Çünkü gen ve gen fonksiyonu arasında bir ilişki kurmak moleküler biyoloji için oldukça önemlidir. Bu amaçla kullanılan genom çapında CRISPRi tarama tekniğini diğer metotlarla karşılaştırmak, yöntemin bu tez çalışmasında tercih edilme sebeplerini açıklayacaktır.

Fonksiyonel genomik çalışmalarında kullanılan diğer genom çapında kütüphanelere örnek olarak *E. coli* için KEIO [50] ve *B. subtilis* için ikili barkotlu delesyon kütüphaneleri [51] örnek verilebilir. Fakat bu nakavt suş koleksiyonların

kullanımı sadece esansiyel olmayan genlerle sınırlıdır. Çünkü esansiyel bir gen nakavt edildiğinde hücre büyüyemez, dolayısıyla ileri analizler yapılamaz. Bir diğer negatif durum ise, bu koleksiyonları hazırlamanın oldukça zahmetli ve maliyetli olmasıdır.

Transpozon insersiyon kütüphaneleri de esansiyel gen taramaları ve genomik çalışmalar için kullanılan bir diğer yöntemdir [52]. Ancak bu yöntemlerde transpozon insersiyonu rastgele gerçekleşir ve tüm genoma homojen dağılım gösteremez. Aynı şekilde bu tekniklerin kullanımında da sadece esansiyel olmayan genler için çıktılar elde edilebilir. Elde edilen mutantların tanımlanabilmesi için yüksek derinlikte dizileme yapılması ve doğru tekniklerle analiz edilmesi elzemdir. Ayrıca uzun gen dizilerinin bozulma frekansı yüksektir ve kodlama yapmayan RNA'lar gibi alışılmadık, kısa dizilerin hedeflenmesi kolaylıkla sağlanamaz.

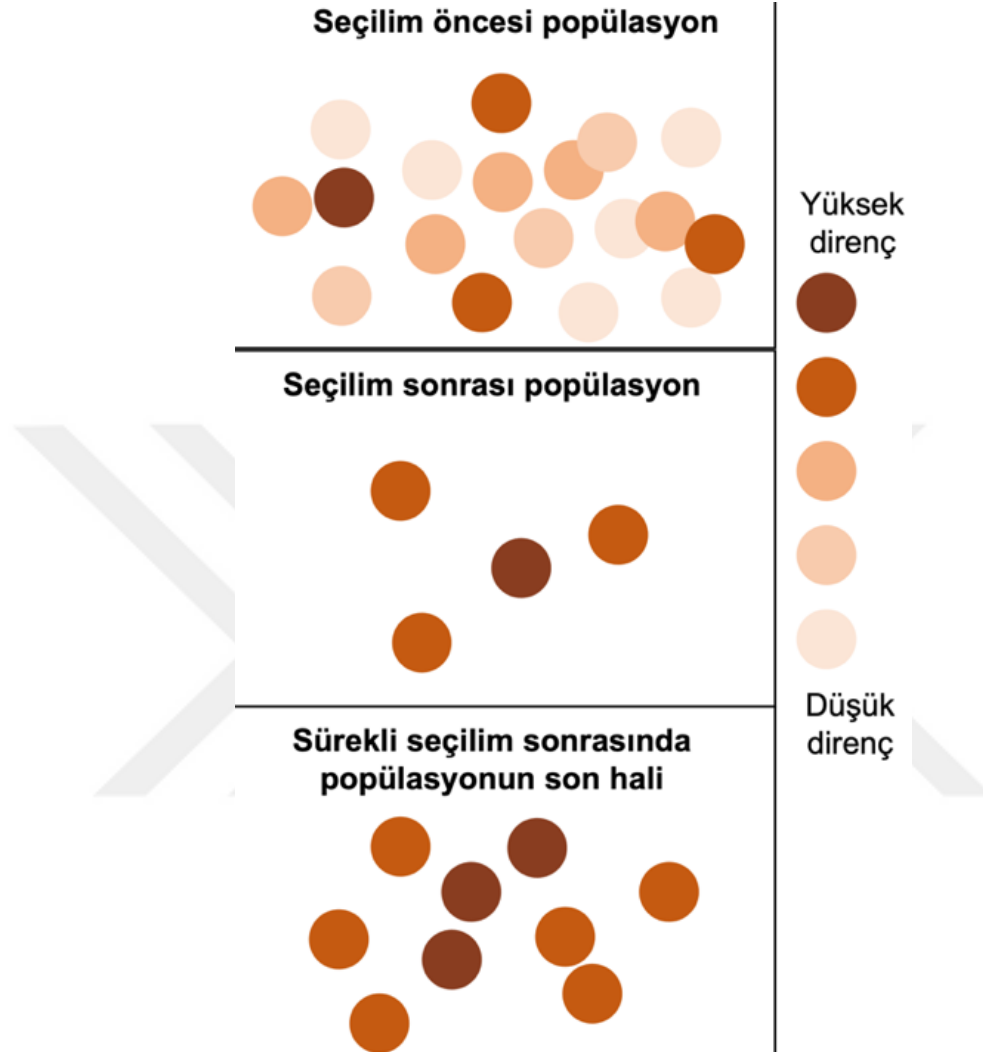
Genom çapında CRISPRi tarama ise hem esansiyel hem de esansiyel olmayan, tüm gen dizilerini hedeflemek üzere özgün tasarım kurallarına sahiptir. Oluşturulacak baskılama seviyesi azaltılarak esansiyel genler üzerinde çalışmalar yapılabilir. Ayrıca birden fazla sgRNA içerek genom çapında CRISPRi kütüphaneleri kullanımıyla kolayca istatistiksel analizler ve karşılaştırmalar yapılabilir. Spesifik bir gen alt kümesi hedeflenebilir ya da hücresel yollar tamamıyla inhibe edilerek fonksiyon çalışmaları yapılabilir. Küçük plazmit DNA'lar ile hedef organizmaya aktarılabilen CRISPRi kütüphanesi izole edilerek tekrar da kullanılabilir, daha az maliyet yönüyle de yöntem öne çıkmaktadır.

2.3 Bakteriyel Adaptasyon ve Antibiyotik Direnci

Mikroorganizmalar doğal seleksiyona bağlı olarak bulundukları ortamdaki çeşitli inhibitör moleküllerin varlığına zamanla adaptasyon sağlarlar. Antibiyotikler bu inhibitör moleküllerin en önemli sınıfıdır. Öyle ki artan antibiyotik direnci küresel bir sağlık krizi halinde gelmiştir. Bu yüzden bakteriyel adaptasyon ve antibiyotik direnci arasındaki sıkı ilişki önemli bir araştırma sahasıdır.

Antibiyotikler mikroorganizmanın büyümek veya hayatta kalmak için ihtiyaç duyduğu önemli hücresel faaliyetleri engelleyen küçük inhibitör moleküllerdir. Bakteri popülasyonu antibiyotik ile muamele edildiğinde, yaşamını devam ettirebilen bakterilerin adaptasyon göstermesi ve zamanla popülasyon içinde

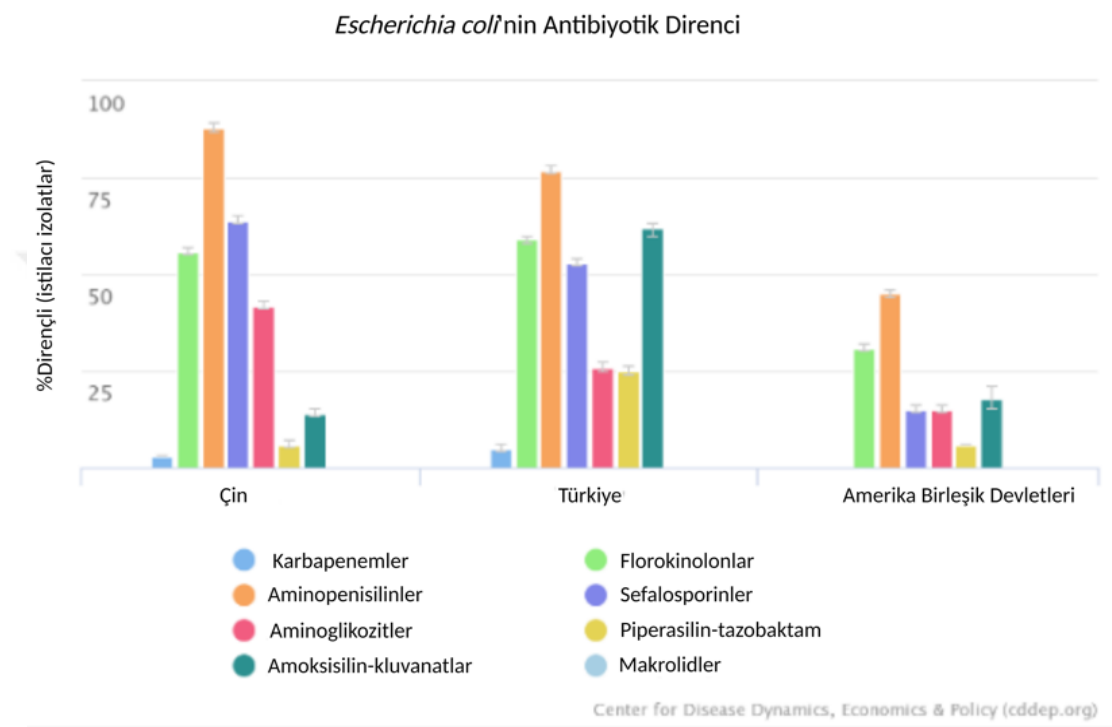
seçilerek çoğalmasıyla antibiyotik direnci oluşur [53]. Bakterilerin antibiyotik etkisinden kaçınmak üzere hızla geliştirdiği direnç ve adaptasyon yolları, birçok antimikrobiyal ilacı etkisiz hale getirmiştir.



Şekil 2. 7 Doğal seçilime bağlı olarak antibiyotik direncinin gelişimi.

Herhangi bir ilaca karşı direnç kazanan bakterilerin popülasyon içinde yaygın tür olma hızı, yeni bir jenerasyonun oluşma hızıyla doğru orantılıdır. Buna karşın dirence özgün yeni antibiyotiklerin tasarımı ve üretimi bakteriyel direncin gelişim hızına yetişememektedir. Antibiyotiklerin geniş spektrumlu etkinliğine karşın bakteriler bu durumdan kurtulmak için çeşitli yollarla direnç geliştirmektedirler ve ortaya çıkan antibiyotik direnci küresel çapta bir kriz haline gelmiştir [53]. Dünya Sağlık Örgütü ve birçok yetkili kurum, antibiyotik direncini 21. yüzyılın en önemli üçüncü sağlık sorunu olarak nitelendirmiştir. Antibiyotik direnci nedeniyle her yıl yaklaşık 700.000 kişi hayatını kaybetmektedir. Direncin önlenememesi

durumunda ise 2050 yılında bu rakamın 10.000.000 civarına ulaşacağı tahmin edilmektedir. Ayrıca, antibiyotik tüketimi ve antimikrobiyal direnç seviyesinin oldukça yüksek olduğu ülkelerden biri olan Türkiye'nin, 2050 yılına kadar 220 milyar ile 1,5 trilyon USD arasında bir ekonomik kayıp yaşama riski taşıdığı da öngörülmüştür [54]. Şekil 2.8'de Türkiye, Çin ve ABD'de *E. coli*'nin çeşitli antibiyotiklere direnç seviyesi gösterilmiştir.



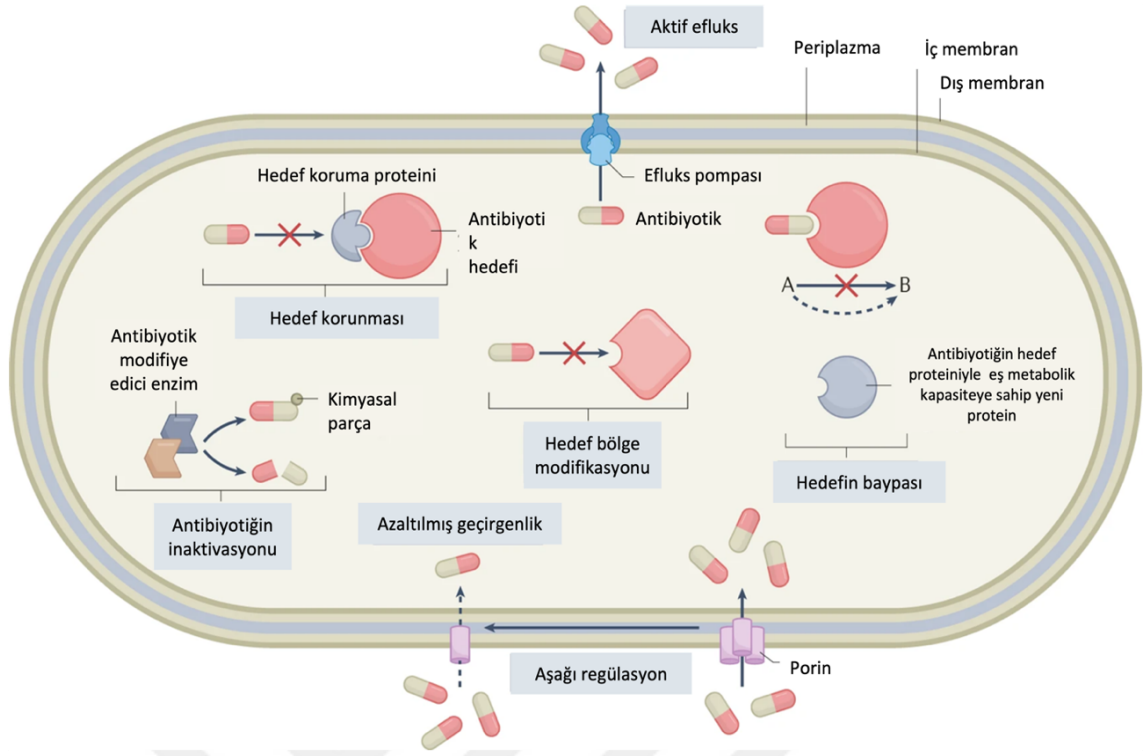
Şekil 2. 8 Türkiye, Çin ve ABD'de *E. coli*'nin çeşitli antibiyotiklere direnç seviyesi [55].

Bakteriler sahip olacakları birkaç nükleotit değişikliğiyle dahi antibiyotiklerin öldürücü etkisinden kolayca kaçabilmektedir ve direnci birbirleriyle de paylaşarak yaymaktadırlar. Sıklıkla bir antibiyotik sınıfına karşı gelişen direncin tek bir mekanizmayla açıklanamadığı ve mikroorganizmaların ilacın etki mekanizmasından bağımsız olarak çok farklı kompleks çözümlere sahip olduğu görülmüştür. Genetik temelleri ve mekanizmalarıyla antibiyotik direncinin detaylı incelenmesi ve bulguların ilişkilendirilerek dirence dayanıklı terapilerin önerilmesi soruna çözüm bulmak üzere atılması gereken önemli bir adımdır [14].

2.3.1 Antibiyotik Direncinin Moleküler Temelleri

Antibiyotikler bakteri hücre duvarı biyosentezine müdahale, protein sentezini inhibe etme, nükleik asit sentezini engelleme, metabolizma süreçlerini bloke etme veya bakteriyel membran bütünlüğünü bozma gibi farklı stratejilerle etkinlik göstermektedirler [56]. Bu amaçla doğal ve sentetik birkaç antibiyotik sınıfı ve etki mekanizması tanımlanmıştır [57].

Bir antibiyotiğe direnç, yabancıl tip bakterinin veya öldürmek için genellikle yeterli olan antibiyotik konsantrasyonu varlığında mutant mikroorganizmanın büyüebildiği ya da hayatta kalabildiği zaman gerçekleşir. Mikroorganizmalar bir antibiyotiğe doğal olarak dirençli olabilir ya da antibiyotiğe maruz kalınca ilacın etkisinden kaçabilecek organizasyondaki genotipler büyümeye devam edebilir. Belirli bir antibiyotiğe karşı kazanılan direnç, direnç mekanizmasını kodlayan kromozomal genlerde oluşan mutasyonlar veya bunu sağlayan genetik materyalin yatay gen transferiyle aktarımı sonucu oluşabilir. Antibiyotiğin hücre dışına taşınması, enzimlerle inaktivasyonu ve hedeflediği gende gerçekleşen mutasyonlar yaygın olarak klinik ve laboratuvar adaptasyon deneylerinde tespit edilen direnç yollarıdır. Direnç genlerinin transferi ise; konjugasyon, transformasyon, transdüksiyon veya integronlar aracılığıyla yatay gen aktarım mekanizmalarıyla gerçekleşebilir [58]. Şekil 2.9'da antibiyotik direncinin moleküler mekanizmaları gösterilmiştir.



Şekil 2. 9 Antibiyotik direncinin moleküler mekanizmaları [59].

Bakteriyel antibiyotik direncine aracılık eden mekanizmalar biyokimyasal olarak dört gruba ayrılır. İlki doğrudan antimikrobiyal molekülde yapılan modifikasyonlardır ve kimyasal değişimler ve hidrolizle açıklanır. İkinci gruptaki mekanizmalar bileşiğin spesifik antibiyotik hedefine ulaşmasını önlemek amacıyla zarda yapılan değişimler olup ilacın hücreye girişini sınırlamak ya da hücredeki konsantrasyonunu azaltmak gibi yollarla ilişkilidir. Hedef bölgede yapılan değişimlerde ilaç yerine hedefe bağlanan proteinler ve hedefi doğrudan değiştiren enzimatik ya da mutasyon stratejileri yer alır ve üçüncü grupta incelenir. Son olarak hücre antibiyotik stresine karşı global hücre adaptasyonu süreçlerini aktive ederek yanıt verebilir [60].

Hedefe erişimi engellemek için bakteri, zar geçirgenliğini azaltarak antibiyotik hücre içine girişini sınırlayabilir veya antibiyotiği aktif olarak hücre dışına pompalayabilir. Antibiyotik hedefinde mutasyonlarla kazanılan direnç mekanizmalarında ise antibiyotik hedefe düşük afiniteyle bağlanması ve etkinliğini daha az göstermesini sağlamaktır. Bunun için tek nokta mutasyonları bazı antibiyotiklere karşı etkin bir direnç sağlarken çoğu zaman birden fazla mutasyon gereklidir [61]. Düşük afiniteli fonksiyonel bir hedef oluşturmak için

genellikle antibiyotik hedefini kodlayan genlerde mutasyonlar veya bağlanacağı bölgede enzimatik değişiklikler oluşturabilecek mutasyonların varlığı raporlanmıştır [59]. Doğrudan hedefin modifikasyonu da direnç kazanılabilir, böylece antibiyotiğin bağlanma bölgesine ulaşımı engellenebilir. Bu mekanizma genellikle antibiyotikle yarışarak hedefine bağlanan başka bir yarışmalı inhibitör molekülün varlığıyla gerçekleşir [14]. Bakteriler enzimlerle antibiyotiği parçalayarak da etkisinden kaçabilir, bu stratejiye de hidroliziz denir [14].

Bakteri, enzimleriyle antibiyotiğin hedef bölgelerine aktardığı kimyasal gruplarla da sterik engeller oluşturabilir. Burada deasetilasyon, fosforilasyon veya adenilasyon gibi biyokimyasal tepkimeler tercih edilir. Ek olarak hücrede yapılan global değişimlerle antibiyotiğe direnç geliştirebilir. Belirtmek gerekir ki antibiyotik direnci birden fazla biyokimyasal yolla elde edilebilir ve bir bakteri hücresi, bir antibiyotiğin etkisinden kurtulmak için çoklu direnç mekanizmalarına sahip olabilir [60].

2.3.2 Bu Tez Çalışmasında Kullanılan Antibiyotikler ve Direnç Mekanizmaları

a) Ampisilin Direnci

Ampisilin, penisilin türevi bir antimikrobiyal ilaçtır ve Beta-laktamaz sınıfında yer alır. Penisilin Bağlanma Proteinlerine (PBP) bağlanarak hücre duvarı sentezini inhibe eder ve bakterisidal aktivite sergiler. Literatürde yer alan direnç mekanizmaları arasında antibiyotik hedefinin mutasyon yoluyla değiştirilmesi, aminoglikozit değiştiren enzimlerle (AME) doğrudan hedefin değişimi, hedefin korunması, Beta laktamaz enzimleri aktivitesiyle hidroliziz yoluyla antibiyotiğin inaktivasyonu, efluks proteinleriyle hücre zarından dışarı atılması ve zar geçirgenliğinin azaltılması gibi birden fazla moleküler mekanizma yer alır [62], [64].

b) Doksisiklin Direnci

Doksisiklin semi-sentetik tetrasiklin türüdür ve temel hücresel faaliyetlerden protein sentezini 30S ribozomal alt birimine allosterik bağlanmayla inhibe eder [65]. Doksisiklin direnci hücre zarından efluks edilmesi, Tet(M) ve Tet (O) ribozomal koruma proteinlerinin üretimi, hücre zarı geçirgenliğinin azaltılması,

hedef bölgede mutasyonlar ve enzimatik olarak ilacın degradasyonu ile ilişkilidir [66].

c) Kloramfenikol Direnci

Kloramfenikol; bakteriyel ribozomların 50S alt biriminin L16 proteinine tersinir şekilde bağlanır, böylece peptit bağı oluşumunu ve takiben protein sentezini inhibe eder [67]. Kloramfenikol direncinde temel mekanizma, plazmit kontrolünde sentezlenen ve intraselüler bir enzim olan kloramfenikol asetil transferaz enzimi (CAT) aktivitesidir. Enzim, kloramfenikol molekülünün 3' pozisyonundaki hidroksil grubunu asetile ederek ilacı modifiye eder ve ilaç ribozomlara bağlanamayınca protein sentezi normal şekliyle devam eder. CAT enzimleri plazmit veya transpozonlar ile aktarılabilir [61].

d) Oksasilin Direnci

Oksasilin, penisilinaz dirençli Beta laktam sınıfı bir antibiyotiktir. Etki mekanizması penisilin bağlanma proteinlerine bağlanarak hücre duvarı biyosentezinin inhibisyonudur. Beta-laktam duyarlı penisilin bağlayıcı proteinlerin varlığı, MdtEF-TolC eflüks pompasıyla hücre dışına atılımı, blaS1 ve mdeA genlerinde gerçekleşen mutasyonlar oksasiline karşı geliştirilen dirençle ilişkilendirilmiştir [67].

e) Spiramisin Direnci

Spiramisin, makrolid sınıfına ait bir antimikrobiyal ajandır. Bakteriyel ribozomların 50S alt birimine bağlanır ve protein sentezini engellemek üzere peptidil transfer aktivitesini inhibe eder [68]. erm genleri ve 23S rRNA'da tespit edilen mutasyonların spiramisin direncine sebep olduğu bilinmektedir [61].

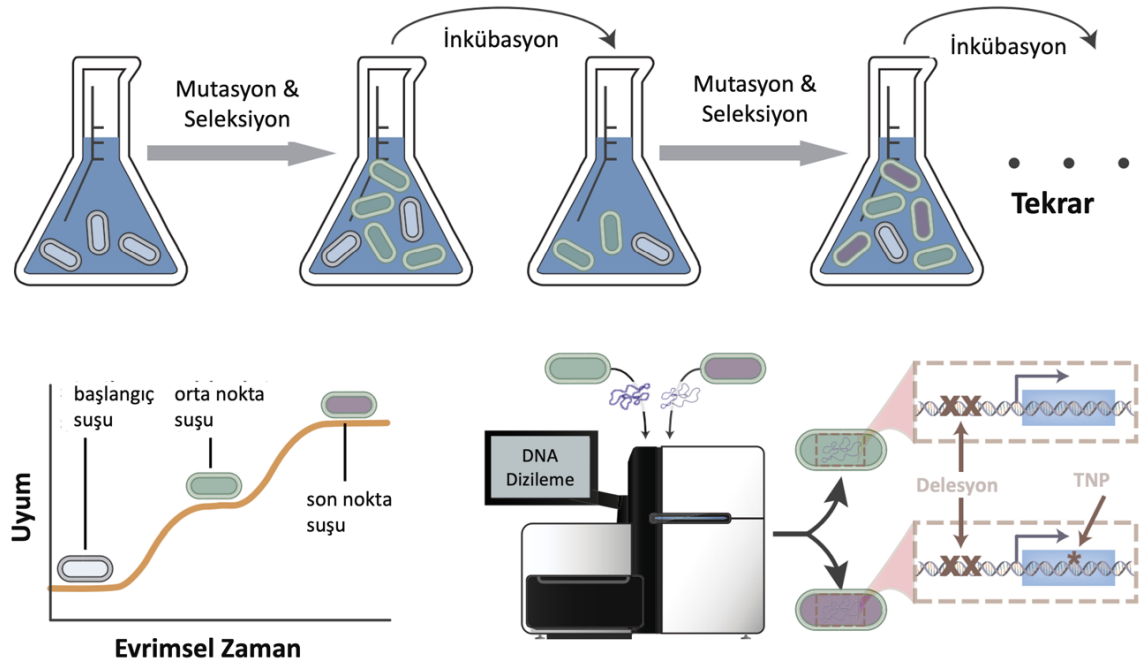
2.4 Adaptif Laboratuvar Evrimi Deneyleri

Adaptif laboratuvar evrimi (ALE) deneyleri, belirli bir fiziksel ve kimyasal etkene karşı adaptasyon sağlayan mikrobiyal suşların laboratuvar koşullarında üretilmesidir [15]. Deney sonucunda adaptasyon kazanan suşların moleküler tekniklerle incelenmesi ise gerçekleşen değişimleri anlamada önemli bir aşamadır.

Kısa jenerasyon süreleri (20 dakika < 10 saat), oldukça büyük popülasyon boyutları (10^8 – 10^{10} hücre), kolayca sağlanabilecek büyüme ortamları ve

deneylerin tekrarlanabilir olması; ALE deneylerinin mikroorganizmalarda uygulanması hususunda birçok avantaj sunar. Sahip oldukları küçük genomları sayesinde ALE süresince meydana gelen değişimler dizileme ve biyoinformatik çalışmalarıyla kolayca analiz edilebilir. Mikrobiyal ALE’de, seçilen mikroorganizma, kontrollü koşullar altında yeterince uzun süre boyunca büyütülür ve belirlenen biyokimyasal özelliklere sahip suşlar elde edilir. Deney boyunca istenilen özelliğe seçici baskı uygulayan ortamda en uygun tür gelişir ve popülasyonun büyük çoğunluğunu oluşturur [17].

ALE deneyleri; mikrobiyal genetik, mikrobiyal evrim, metabolizma mühendisliği ve biyoteknoloji gibi çalışma alanlarında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. ALE’de kullanılan deneysel teknikler Şekil 2.10’da gösterilmiştir [15]. En basit deney yönteminde, yararlı mutasyonlar oluşturan suşları doğal olarak seçmek için hazırlanan bir besiyeri ortamında hücreler uzun süre boyunca kültürlenir [17]. Bu protokol, mikroorganizmaların sıvı besiyeri ortamında, seçici bir baskı altında büyütülmesi ve kültürün belirli bir miktarının taze besiyerine aktarımıyla gerçekleştirilir. Protokol hedeflenen jenerasyon sayısı boyunca aynı işlemler uygulanarak tekrar edilir. ALE deneyleri, kemostat ve türbidostatlar gibi sürekli kültürlenme sağlayan cihazlarda da yapılmaktadır [15].



Şekil 2. 10 ALE deneylerinde kullanılan deneysel yöntemler [17].

ALE deneyleri laboratuvar ortamında mikroorganizmanın istenilen herhangi bir etkiye karşı adaptasyon kazanmasının sağlanmasıyla genotip ve fenotip arasında sıkı bir ilişki kurulmasını sağlar. Yöntem, özellikle antibiyotik direnci ve evrimsel biyoloji çalışmalarında oldukça önemli bir etkiye sahiptir. Uygun büyüme koşullarının sağlanması halinde herhangi bir mikroorganizmaya ALE deneyi uygulanabilir. Isı, sıcaklık, basınç gibi fiziksel etmenlere, herhangi bir kimyasal veya biyolojik maddeye karşı mikroorganizmanın adaptasyon kazanması sağlanabilir. Adaptasyon esnasında gerçekleşen değişimlerin genotiplendirilmesi için Yeni Nesil Dizileme tekniklerinden sıklıkla yararlanılır. Tüm Genom Dizileme ile adaptasyona aracılık eden mutasyonlar ve diğer genetik değişimler saptanır. Ayrıca RNA Dizileme ve Mikroarray gibi tekniklerin kullanımıyla da ekspresyon seviyesinde analizler yapılır ve dirençle ilişkisi incelenir [16], [62], [63].

Dizileme tekniklerinin Moleküler Biyoloji'yi altın çağına ulaştırmasıyla fonksiyonel genomik çalışmaları ve gen editleme araçları oldukça çeşitlenmiştir. CRISPR sistemleri bu araçlardan biridir ve araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Antibiyotik direnci çalışmalarında bakteriyi tekrar duyarlı hale getirmek veya antibiyotiğin gücünü artırmak için bakteriyel CRISPR sistemleri modüle edilmiştir [64]–[67]. CRISPRi araçları da bakterilerde fonksiyonel genomik çalışmalar için uygunluğu ile öne çıkmaktadır [68]. Özellikle; genom çapında CRISPRi tarama deneylerinin birçok organizma ve farklı seçici ortamlarda uygulanması gen ve aktivitesine özgün analizlerin yapılmasını sağlamıştır. Yöntemin indüklenebilir, seviyesinin ayarlanabilir ve kolay tasarım kuralları büyük bir potansiyel taşımaktadır [69]. ALE ve CRISPRi yönteminin birlikte kullanıldığı bu tez çalışmasında antibiyotiklere dirençli hale getirilen *E. coli* hücrelerinde adaptasyondan sonra farklılaşan genler ortaya çıkarılmıştır.

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

- Mikroplaka okuyucu, Hidex Sense Microplate Reader
- Santrifüj cihazı, Hettich Rotofix 32A
- Mikrosantrifüj cihazı, Nüve Bench Top Centrifuge NF048
- Su banyosu, Stuart Shaking Water Bath SBS40
- İnkübatör, Nüve Incubator EN032
- Nanodrop cihazı, Nabi Microdigital Nanodrop
- Çalkalamalı inkübatör, MRC Orbital Shaker Incubator
- Ultra saf su cihazı, Purelab Elga Flex
- Konvansiyonel PZR cihazı, Biorad T100 Thermal Cycler
- Elektroforez, MultiSUB Mini, Cleaver Scientific
- Jel görüntüleme cihazı, Chemidoc Tmp Imaging System
- Isıtıcı, DragonLab MS-H-S Heater
- Elektroporasyon cihazı, Biorad Micro Pulser
- Elektronik tartı, Shimadzu Corporation Electronic Balance
- Dondurucu, Nüve DF 290
- Florometrik ölçüm cihazı, Qubit 4 Fluorometer, Invitrogen
- NovaSeq 6000, Illumina

3.1.2 Kullanılan Mikroorganizma Suşları

Kromozoma eklenmiş dCas9 eksprese eden LCE-75 isimli *E. coli* MG1655 K-12 türevi suş Addgene firmasından (#115925) temin edilmiştir. Kullanılan suş, zayıf P_{tet} promotorundan dCas9 ekspresyonu yapmak üzere optimize edilmiş RBS kütüphanesine sahiptir [39].

3.1.3 Kullanılan Antibiyotikler

Bu tez çalışmasında kullanılan antibiyotikler ve üretici firma bilgileri aşağıdaki gibidir:

- Anhidrotetrasiklin: Anhydrotetracycline(hydrochloride) (Cayman #10009542)
- Ampisilin: Ampicillin Sodium Salt (WISENT MULTICELL #400-110 IG)
- Doksisisiklin: Doxycycline Hyclat (Genaxxon #M3147.0005)
- Kloramfenikol: Chloramphenicol (WISENT MULTICELL #400-120 IG)
- Spiramisin, Spiramycin (Cayman #20267)
- Oksasilin: Oxacillin sodium salt (Cayman #23954)
- Kanamisin: Kanamycin Monosulfate (WISENT MULTICELL #400-145 IG)

3.1.4 Kullanılan Besiyerleri

Deneylerde kullanılan besiyerleri LB-Agar (Miller) (Merck #1.10283.0500), LB Broth (Lennox) (Sigma-Aldrich #L3022), LB Broth (Miller) (Sigma-Aldrich #L3522), LB Broth (Luria) (Sigma-Aldrich #L3397) ve SOC Medium (İnvitrogen #15544034) temin edilmiş ve üretici talimatlarına uygun olarak hazırlanmıştır.

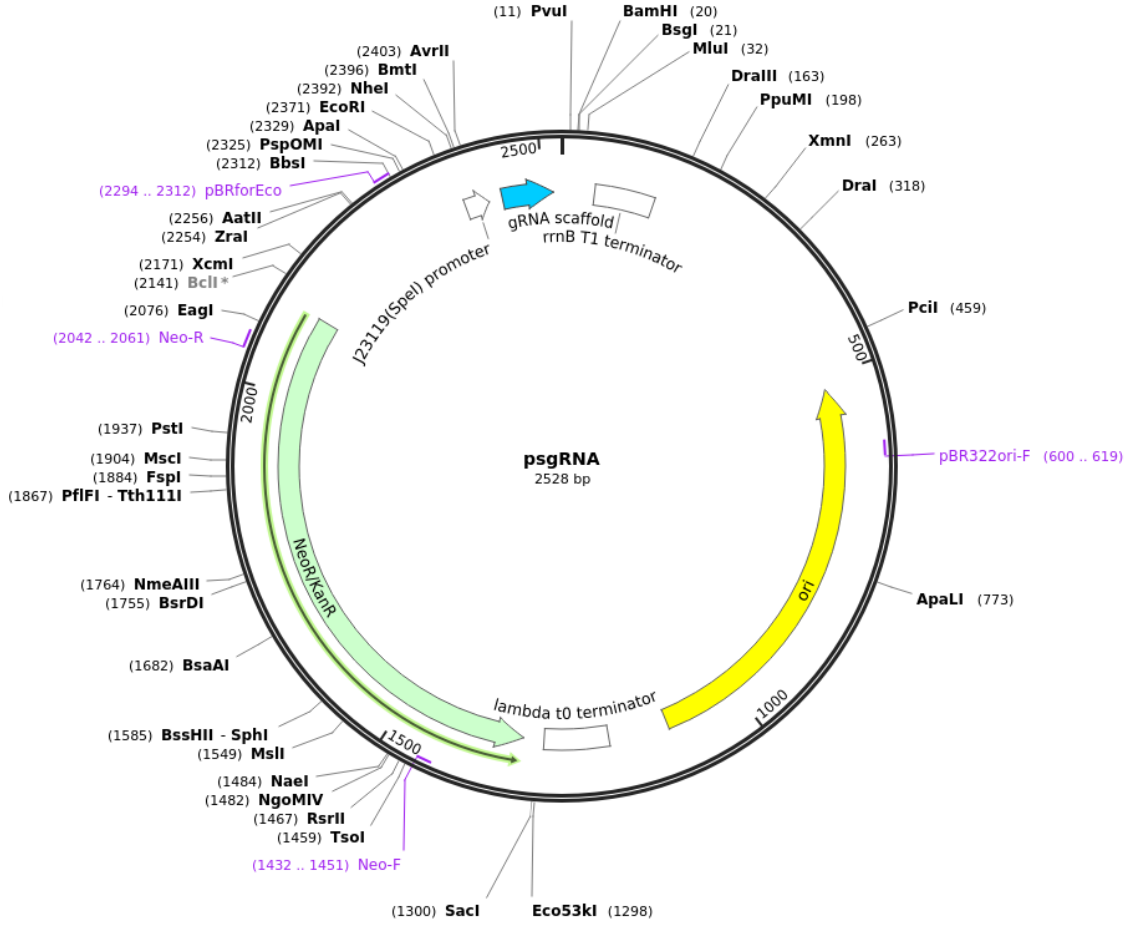
3.1.5 Plazmit DNA İzolasyonu

QIAprep Spin Miniprep Kit (250) (Qiagen #27106) ürünü ve üreticinin önerdiği protokol kullanılmıştır.

3.1.6 Genom Çapında CRISPRi Kütüphanesi

Bu tez çalışmasında kullanılan genom çapında sgRNA kütüphanesi Addgene firmasından (Bikard Lab-EcoWG1: *E. coli* Genome-wide Inhibition Library, #1311625) temin edilmiştir. Bu kütüphane *E. coli* MG1655 kromozomundaki her

bir genin açık okuma çerçevesinin şablon olmayan zincirini hedefleyen ~20.000 benzersiz sgRNA içermektedir. Kütüphane sgRNA oligo havuzunun Gibson Birleştirme yöntemiyle psgRNA (Addgene, #114005) ekspresyon plazmitine klonlanmasıyla oluşturulmuştur [10]. Kullanılan ekspresyon plazmitinin haritası Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3. 1 Genom çapında CRISPRi kütüphanesini oluşturan plazmitlerin dizi haritası [39].

3.1.7 Elektroforez Reaktifleri

- Agaroz: Agarose (Biomax #HS-8000)
- Marker: Generuler 1Kb DNA Ladder (Thermo Scientific # LSG-SM0314)
- 10X TBE Çözeltilisi: Tris-Borate-EDTA Buffer 10X (WISSENT MULTICELL #880-545)
- Etidyum Bromür: Ethidium Bromide (BIOMATİK #A2510)

3.1.8 Agaroz Jelden DNA Saflaştırılması

Bu tez çalışmasında yapılan deneylerde NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (50) (MACHEREY NAGEL #740609.50) ürünü ve üretici talimatları uygulanmıştır.

3.1.9 PZR Reaktifleri

PZR işlemlerinde Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs #M0491) ve 5X Q5® Reaction Buffer ürünleri kullanılmıştır.

3.1.10 Kullanılan Primerler

Deneyler esnasında kullanılan primerler Tablo 3.1’ de listelenmiştir. Tüm primerler Macrogen firmasından temin edilmiştir.

Tablo 3. 1 Bu tez çalışmasında kullanılan primerlerin listesi.

Primer Adı	Primer Dizisi
ortak ileri primer	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCTCAGTCCTAGGT ATAATACTA
ortak geri primer	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAGCCTTTCGTTTTA TTTGATGC
P5-N501-read1	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTAGATCGCTCGTCGGCAG CGTCAGATGTGTATA
P5-N502-read1	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTCTCTATTCGTCGGCAGC GTCAGATGTGTATA
P5-N503-read1	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATCCTCTTCGTCGGCAGC GTCAGATGTGTATA
P5-N504-read1	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGAGTAGATCGTCGGCAG CGTCAGATGTGTATA
P7-N701-read2	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCGCCTTAGTCTCGTGGGCTCGG AGATGTGTAT
P7-N702-read2	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTAGTACGGTCTCGTGGGCTCGG AGATGTGTAT

Tablo 3. 1 Bu tez çalışmasında kullanılan primerlerin listesi (devamı).

P7-N703-read2	CAAGCAGAAGACGGGCATACGAGATTTCTGCCTGTCTCGTGGGCTCGG AGATGTGTAT
P7-N704-read2	CAAGCAGAAGACGGGCATACGAGATGCTCAGGAGTCTCGTGGGCTCGG AGATGTGTAT
P7-N705-read2	CAAGCAGAAGACGGGCATACGAGATAGGAGTCCGTCTCGTGGGCTCGG AGATGTGTAT
P7-N706-read2	CAAGCAGAAGACGGGCATACGAGATCATGCCTAGTCTCGTGGGCTCGG AGATGTGTAT

3.1.11 Elektroporasyon Küveti

Çalışma esnasında sgRNA kütüphanesinin elektrokompetent hücrelere transformasyonu için Gene Pulser/MicroPulser Electroporation Cuvettes, 0,1 cm gap (BIORAD #165208) ürünü kullanılmıştır.

3.1.12 Florometrik Hassas DNA Miktarı Ölçüm Kiti

Florometrik ölçümler yapılırken Qubit™ dsDNA HS and BR Assay Kit (Invitrogen #Q32851) kullanılmış ve üreticinin talimatları uygulanmıştır.

3.1.13 Yeni Nesil Dizileme Cihazı ve Akış Hücresi

Bu tez çalışmasının desteklendiği projenin hizmet alımı kapsamında Sağlık Bilimleri Üniversitesi Deneysel Tıp ve Uygulama Merkezi'nde yer alan NovaSeq 6000 Sequencing System cihazı (Illumina) ve NovaSeq 6000 SP Flowcell v1.5 (x300) (Illumina) akış hücresi kullanılarak Yeni Nesil Dizileme işlemleri gerçekleştirilmiştir.

3.1.14 Kullanılan Bilgisayar Yazılımları

Bu tez çalışmasında yapılan tüm analizler, oluşturulan şekil ve grafikler özel komutlar kullanılarak MATLAB R2022b yazılımında gerçekleştirilmiştir. Kullanılan MATLAB komutları Ekler A'da yer almaktadır.

3.2 Metot

3.2.1 Adaptif Laboratuvar Evrimi Deneyleri

Adaptif laboratuvar deneylerine başlanmadan önce, kromozomuna entegre olarak dCas9 taşıyan LCE-75 hücrelerinin beş farklı antibiyotik için minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) tespit edilmiştir. Bu amaçla yapılan işlemler aşağıdaki gibidir:

1. Üreticinin talimatları takip edilerek ampicilin, kloramfenikol, doksisisiklin, oksasilin ve spiramisin stok konsantrasyonları hazırlanmıştır.
2. Her bir antibiyotiğin stok konsantrasyonundan 2 kat azalan 10 adet çalışma konsantrasyonu uygun çözücüler ile seyreltilerek hazırlanmıştır.
3. Gece boyu LB-Miller Broth besiyerinde büyütülen LCE-75 hücreleri 5×10^5 kob/mL'ye seyreltilmiştir.
4. Seyreltilen hücreler 96 oyuklu bir plakada ampicilin, kloramfenikol, doksisisiklin, oksasilin ve spiramisin hazırlanan 10 konsantrasyonu varlığında 37°C, 300 rpm, 16 saat boyunca inkübe edilmiştir.
5. 16 saat boyunca her 10 dakikada bir OD₆₀₀ ölçümü alan mikroparka okuyucu verileri analiz edilerek MİK ve MİK/2 değerleri belirlenmiştir.

ALE deneyleri aşağıdaki gibi uygulanmıştır:

1. Birinci deney gününde, LCE-75 hücreleri 5×10^5 kob/mL'ye seyreltilmiştir. Belirlenen MİK/2, MİK ve 2xMİK konsantrasyonlarında ampicilin, kloramfenikol, doksisisiklin, oksasilin ve spiramisin 5 mL'lik seyreltilen LCE-75 hücrelerinin bulunduğu tüplere eklenmiştir. 37°C, 210 rpm, 22 saat boyunca inkübe edilmiştir.
2. İnkübasyon tamamlandığında her bir antibiyotik ile muamele edilen deney grubu için en yüksek konsantrasyonda büyüyen hücrenin OD₆₀₀ ölçümü yapılmıştır. Büyüyen hücreler tekrar inkübe olmak üzere taze 5 mL LB-Broth besiyerinde OD₆₀₀=0.003'e seyreltilmiştir.
3. Her bir antibiyotiğin büyüyen en yüksek konsantrasyonundan yeniden artan iki kat konsantrasyonları hazırlanarak sıvı kültürlerle eklenmiştir. Tekrar 37°C, 210 rpm, 22 saat boyunca inkübe edilmiştir.

4. 2 ve 3 numaraları işlemler 8 gün boyunca uygulanmıştır.

ALE deneyleri süresince protokolün her bir aşaması dikkatle tüm deney grupları için uygulanarak kontrollü şartlar sağlanmıştır. Deney süresince eş zamanlı olarak aynı atasal yabanıl tip (YT) LCE-75 hücresinden farklı antibiyotiklere direnç kazandırılan mutant tip (MT) 2 farklı hücre hattı oluşturulmuştur. Her bir inkübasyon günü sonunda alınan kültür örnekleri % 50 nihai gliserol konsantrasyonu -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2 Genom Çapında CRISPRi Kütüphanesinin Transformasyonu

Elektroporasyon işlemlerinden önce antibiyotiklere dirençli MT ve YT LCE-75 hücreleri elektrokompotent hale getirilmiştir [10]. Elektroporasyon işleminin verimliliğini korumak için her bir hücre hattından en az 10^{10} kob/mL konsantrasyonunda elektrokompotent hücre eldesi hedeflenmiştir. Protokolün detayları aşağıdaki gibi listelenmiştir:

1. Her bir hücre hattından elde edilen bireysel koloniler, LB-Luria besiyerinde 37°C, 250 rpm, 16 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde büyütülmüştür.
2. Gecelik kültürlerden 3 mL alınarak 1:100 oranında 300 LB-Luria besiyeri ortamına inoküle edilmiş ve 37°C, 250 rpm'de çalkalamalı inkübatörde OD₆₀₀ değeri 1'e ulaşana kadar büyütülmüştür.
3. Hücreler yeterli büyümeye ulaştığında, her bir hücre kültüründen 50 mL alınarak 6 adet santrifüj tüpüne aktarılmış ve 1000 g'de 20 dakika (4°C) santrifüjlenmiştir.
4. Santrifüj işleminin ardından oluşan süpernatant tüplerden uzaklaştırılmış ve pellet soğuk, steril ddH₂O ile tekrar çözülmüştür.
5. Her 2 tüpteki pellet birleştirilerek toplam hacim soğuk, steril ddH₂O ile 50 mL'ye tamamlanmıştır, ardından 3 ve 4 numaralı basamaklar tekrar edilmiştir.
6. Soğuk, steril ddH₂O ile son yıkamanın ardından kalan son 2 tüpteki pellet soğuk, steril % 10 gliserol ile çözülmüştür.
7. Tüpler 1000 g'de 20 dakika (4°C) santrifüj edilmiştir ve süpernatantlar atıldıktan sonra pelletler birleştirilmiştir.

8. Tüm hücre hatlarından elde edilen nihai pelletler 500 μ L soğuk, steril % 10 gliserol ile yeniden süspanse edilmiştir. Elde edilen alikuatlar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Elde edilen elektrokompotent YT ve MT LCE-75 hücreleri, 1X PBS ile seyreltilmiştir. Hücreler LB agar plakaları üzerinde eşit hacimli damlacıklar yapılarak 37°C etüvde, 16 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlandığında seyreltme faktörü ve koloni sayısı çarpılarak hücre sayısı hesaplanmıştır.

Elektroporasyon aşamasında yüksek tuz miktarı ve hücre yoğunluğu sebebiyle oluşan, ani elektrik boşalması olarak tanımlanan 'arc' durumundan kaçınmak için elektrokompotent hücre sayısı ve transforme edilen DNA miktarı optimize edilmiştir. YT ve MT elektrokompotent LCE-75 hücrelerine sgRNA kütüphanesi (Addgene, #1311625) transforme edilmiştir. Yöntemin detayları aşağıdaki gibidir [10]:

1. -80°C'de muhafaza edilen elektrokompotent YT ve MT LCE-75 hücreleri buz üzerinde çözdürülmüştür. Uygun hücre yoğunluğunu sağlamak üzere soğuk, steril ddH₂O ile 1:2 oranında seyreltme yapılmıştır.
2. Optimum DNA konsantrasyonunu sağlamak üzere temin edilen sgRNA plazmit kütüphanesi 1:10 oranında seyreltilmiştir (50 ng/ μ L).
3. 20 μ L elektrokompotent LCE-75 hücrelerine 0.1 μ L sgRNA plazmit kütüphanesi eklenerek pipetaj uygulanmıştır.
4. Elektrokompotent hücre ve sgRNA kütüphanesi karışımı 1 mm'lik elektroporasyon küvetlerine aktarılmıştır. Küvetler elektroporasyon cihazına yerleştirildikten sonra (1.8 kV, 25uF, 200 Ω) parametrelerinde elektrik akımı uygulanmıştır. Bu işlem, her bir hücre hattı için en az 3 başarılı sonuç (ani elektrik boşalması oluşmadan) elde edilene kadar tekrar edilmiştir.
5. Akım uygulandıktan hemen sonra elektroporasyon küvetlerine 980 μ L SOC besiyeri eklenerek transforme hücreler epondorf tüplere aktarılmıştır.
6. Transforme hücrelerin iyileşebilmesi için 37°C, 250 rpm'de 1 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

7. Takiben, seçim için 50 $\mu\text{g/mL}$ kanamisin içeren LB agar plakaları üzerinde yayılarak 37°C etüvde, 5 saat boyunca inkübe edilmiştir.

8. İnkübasyon süresi tamamlandığında agar plakalara 10 mL LB-Broth eklenerek transformant hücreler hücre yayıcı ile toplanmıştır. Bu aşamada her bir hücre grubu kendi içinde birleştirilmiştir.

9. Birleştirilen hücreler -80°C'de % 20 final gliserol konsantrasyonu sağlanarak muhafaza edilmiştir.

Eş zamanlı olarak, başarıyla transforme olan canlı hücre sayısını kontrol etmek amacıyla rekombinant YT ve MT LCE-75 hücreleri, 1X PBS ile 1:10 oranında seyreltilmiştir. 50 $\mu\text{g/mL}$ kanamisin içeren LB agar plakaları üzerinde eşit hacimli damlacıklar yapılarak yayılmıştır ve 37°C etüvde 16 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlandığında oluşan koloni sayısı ve seyreltme faktörü çarpılarak hücre sayısı hesaplanmıştır.

3.2.3 Genom Çapında CRISPRi Tarama Deneyleri

Genom çapında CRISPRi kütüphanesi tarama deneylerinde uygulanan yöntemin basamakları aşağıdaki gibidir [10]:

1. sgRNA kütüphanesi ile transforme edilen ve -80°C'de korunan rekombinant YT ve MT LCE-75 hücreleri 100 mL taze, antibiyotik içermeyen LB Broth (Miller) besiyeri içine 1 mL eklenerek 1:100 oranında seyreltilmiştir.

2. Hücreler, OD₆₀₀ değeri 0.2'ye ulaşana kadar 37°C, 250 rpm'de çalkalamalı inkübatörde büyütülmüştür.

3. Kültürler yeterli büyümeye ulaştığında, plazmit DNA izolasyonu ve -80°C'de muhafaza için 50 mL numune ayrılmıştır (zaman noktası=0).

3. Aynı kültürlerden alınan 1 mL numune 1:5 oranında 4 mL taze LB Broth (Miller) besiyeri içerisine seyreltilmiştir.

4. Seyreltilen kültürlerin her 1 mL'si 5 adet 1 μM anhidrotetrasiklin içeren LB agar plakaları üzerinde yayılmıştır ve 37°C etüvde 20 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bu aşamada; anhidrotetrasiklinin sulu çözeltilerdeki stabilitesi 24 saat içinde azaldığı için taze agar plakalar kullanılmıştır.

5. İnkübasyon süresi tamamlandığında, her bir plakaya 10 mL taze LB Broth (Miller) eklenmiştir ve hücreler agar plakalardan hücre yayıcı kullanılarak toplanmıştır. Bu aşamada her bir deney grubunun 5 agar plakasından toplanan hücreler birleştirilmiştir (zaman noktası= 20).

6. Üretici firmanın önerdiği kit talimatları izlenerek (QiaQuick Miniprep Kit, Qiagen) her bir zaman noktasında (zaman noktası=0, zaman noktası=20) alınan kültür örneklerinden plazmit DNA'ları saflaştırılmıştır.

7. Saflaştırılan plazmit DNA örnekleri, %0,8 agaroz jele yüklenerek 100 V, 60 dakika boyunca elektroforez işlemine tabii tutulmuştur.

8. Jel görüntülemesi yapılarak sgRNA kütüphanesinde yer alan sgRNA ekspresyon plazmitlerinin uzunluğu (~2.5 kb) doğrulanmıştır.

3.2.4 Yeni Nesil Dizileme Kütüphanesinin Hazırlanması ve Dizileme

CRISPRi kütüphanesini içeren YT ve MT LCE-5 hücreleri büyütülerek, indüksiyondan önce (zaman noktası=0) ve dCas9 ekspresyonu indüklendikten sonra (zaman noktası=20) alınan kültür örneklerinden plazmit DNA'lar saflaştırılmıştır, hücrelerden CRISPRi kütüphaneleri ekstrakte edilmiştir (Metot 3.2.3). Ekstrakte edilen plazmitlerin sgRNA içeren bölgeleri PZR ile çoğaltılarak Yeni Nesil Dizileme kütüphaneleri oluşturulmuştur. YND kütüphanesinin manuel olarak hazırlığında iki adımlı PZR işlemi gerçekleştirilmiştir [12].

Birinci PZR aşamasında sgRNA ekspresyon plazmitlerinin sgRNA içeren ve çevresini kapsayan bölge kopyalanmıştır. Birinci PZR aşamasında kullanılan primerlerin uçlarında yer alan evrensel bağlanma dizileri (read1, read2) amplikonların YND platformuna uyumunu sağlamaktadır. Elde edilen fragmanlara ikinci bir PZR muamelesiyle deney grupları ve deney zamanına göre barkotlamayı sağlayan Illumina adaptör (P5-P7) ve indeks (N501-504, N701-708) dizileri eklenmiştir [12]. Uygulanan tekniğin detayları aşağıdaki gibidir:

1. Birinci PZR adımında, kütüphanede yer alan sgRNA ekspresyon plazmitlerinin sgRNA içeren bölgelerini çoğaltmak için her bir plazmit üzerinde ortak ileri ve geri primerler kullanılmıştır. Bu işlem tüm deney gruplarından zaman noktası=0 ve 20'de elde edilen plazmit örnekleri için aynı şekilde uygulanmıştır. Hazırlanan

PZR reaksiyonu içeriği Tablo 3.2’de listelenmiştir. Tablo 3.3’te belirtilen ısıl döngü koşullarında PZR işlemi gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3. 2 Birinci PZR Reaksiyon Karışımı (25 μ L).

Reaksiyon içeriği	Reaksiyona giren miktar
1° PZR ileri primeri (10 μ M)	1.25 μ L (0.5 μ M)
1° PZR geri primeri (10 μ M)	1.25 μ L (0.5 μ M)
10 mM dNTP karışımı	0.5 μ L (200 μ M)
Ekstrakte edilen plazmit örnekleri	25 ng (her bir örnek için hesaplanmıştır)
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0.25 μ L (0.02 U/ μ L)
5X Q5 Reaction Buffer	5 μ L (1X)
Nükleaz içermeyen dH ₂ O	Toplam hacim 25 μ L’ye tamamlanmıştır

Tablo 3. 3 Birinci PZR işleminde uygulanan ısıl döngü koşulları.

Termal Döngü Basamağı	Uygulanan Sıcaklık ve Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	98 °C’de 30 saniye	1
Uzama/Primer Bağlanma	98 °C’de 10 saniye	25
	62 °C’de 15 saniye	
	72 °C’de 45 saniye	
Son Uzama	72 °C’de 2 dakika	1

2. Her deney grubundan elde edilen birinci PZR ürünleri % 0,8 agaroz jele yüklenerek 60 V, 150 dakika elektroforeze tabii tutulmuştur. 264 baz çiftlik fragmanların yer aldığı bölge jelden dikkatle kesilmiş ve hassas terazi ile tartılmıştır.

3. Kesilen jel parçalarındaki DNA fragmanları, üreticinin talimatları takip edilerek NucleoSpin Gel ve PZR Clean-up Mini Kit (Macherey Nagel) kullanılarak saflaştırılmıştır.

4. Saflaştırılan fragmanlar hesaplama jeline yüklenmiş ve elektroforez uygulanmıştır. Jel görüntüleme cihazından alınan resimde her bir bant için parlaklık seviyesi tespit edilmiş ve özel bir MATLAB koduyla fragmanların konsantrasyonu hesaplanmıştır.

5. Jelden saflaştırılan ve konsantrasyonu hesaplanan fragmanların deney grupları ve zamanlarına göre barkotlamasını amaçlayan ikinci bir PZR adımı daha gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada kullanılan primerler Tablo 3.1’te listelenmiştir. Deney gruplarına ve deney zamanına göre planlanan ikili indeks kullanımıyla tüm örneklerin barkotlama düzeni ise Tablo 3.4’te gösterilmiştir. İkili indeksleme uygulanırken temel strateji, ileri primerde yer alan bir indeksle hücre hattı ve deney zamanını etiketlemek ve geri primerde yer alan diğer indeksle YT ve MT deney gruplarını ayırt etmektir. Bu işlem sekanslama sonrasında elde edilen okumalarının ayrıştırılmasında önem arz etmektedir. İkinci PZR işlemi için hazırlanan reaksiyon içeriği ve ısıl döngü koşulları Tablo 3.5 ve Tablo 3.6’da belirtilmiştir.

Tablo 3. 4 YND kütüphanesi hazırlığında uygulanan ikili indeksleme planı.

Deney Grubu	İNDEKS	Deney Grubu	İNDEKS
YT.A T.0	F: P5-N501-read1 R: P7-N701-read2	DOX.A T.0	F: P5-N501-read1 R: P7-N704-read2
YT.A T.20	F: P5-N503-read1 R: P7-N701-read2	DOX.A T.20	F: P5-N503-read1 R: P7-N704-read2

Tablo 3. 4 YND kütüphanesi hazırlığında uygulanan ikili indeksleme planı
(devamı).

YT.B T.0	F: P5-N502-read1 R: P7-N701-read2	DOX.B T.0	F: P5-N503-read1 R: P7-N704-read2
YT.B T.20	F: P5-N504-read1 R: P7-N701-read2	DOX.B T.20	F: P5-N504-read1 R: P7-N704-read2
AMP.A T.0	F: P5-N501-read1 R: P7-N702-read2	OXA.A T.0	F: P5-N501-read1 R: P7-N705-read2
AMP.A T.20	F: P5-N503-read1 R: P7-N702-read2	OXA.A T.20	F: P5-N503-read1 R: P7-N705-read2
AMP.B T.0	F: P5-N502-read1 R: P7-N702-read2	OXA.B T.0	F: P5-N503-read1 R: P7-N705-read2
AMP.B T.20	F: P5-N504-read1 R: P7-N702-read2	OXA.B T.20	F: P5-N504-read1 R: P7-N705-read2
CHL.A T0	F: P5-N501-read1 R: P7-N703-read2	SPR.A T.0	F: P5-N501-read1 R: P7-N706-read2
CHL.A T20	F: P5-N503-read1 R: P7-N703-read2	SPR.A T.20	F: P5-N503-read1 R: P7-N706-read2
CHL.B T0	F: P5-N502-read1 R: P7-N703-read2	SPR.B T.0	F: P5-N502-read1 R: P7-N706-read2
CHL.B T20	F: P5-N504-read1 R: P7-N703-read2	SPR.B T.20	F: P5-N504-read1 R: P7-N706-read2

Tablo 3. 5 İkinci PZR Reaksiyon Karışımı (25 µL).

Reaksiyon içeriği	Reaksiyona giren miktar
2° PZR ileri primeri (10 µM)	0.5 µL (0.1 µM)
2° PZR geri primeri (10 µM)	0.5 µL (0.1 µM)
10 mM dNTP karışımı	0.5 µL (200 µM)
Ekstrakte edilen plazmit örnekleri	10 ng (her bir örnek için hesaplanmıştır)
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0.25 µL (0.02 U/µL)
5X Q5 Reaction Buffer	5 µL (1X)
Nükleaz içermeyen dH ₂ O	Toplam hacim 25 µL'ye tamamlanmıştır

Tablo 3. 6 İkinci PZR işleminde uygulanan ısı döngü koşulları.

Termal Döngü Basamağı	Uygulanan Sıcaklık ve Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95 °C'de 30 saniye	1
Uzama/Primer Bağlanma	95 °C'de 15 saniye	25
	55 °C'de 15 saniye	
	72 °C'de 30 saniye	
Son Uzama	72 °C'de 5 dakika	1

6. Birinci PZR işleminde elde edilen fragmanların şablon olarak kullanımıyla gerçekleştirilen ikinci PZR aşaması her bir örneğin 421 baz çiftlik uzunluğundaki fragmanı ile sonuçlanmıştır. Elde edilen tüm fragmanlar % 0.8 agaroz jelle yüklenerek 60 V, 150 dakika elektroforez edilmiştir ve agaroz jel görüntülenerek fragman boyutu kontrol edilmiştir.

7. Fragmanların konsantrasyonunun hassas ölçümü için florometrik DNA ölçümü gerçekleştirilmiştir (Qubit™ dsDNA HS and BR Assay Kit). Her bir deney grubuna ait örneğin 150 ng için gereken hacmi hesaplanarak tüm fragmanlar bir tüpte birleştirilmiştir. Böylece YND kütüphanesi hazırlanmıştır.

8. Birleştirilen YND kütüphanesinden alınan 20 µL örnek % 0,8 agaroz jel üzerinde 50 V, 150 dakikada yürütülmüştür. Kütüphanenin yer aldığı spesifik bant (421 baz çifti) jelden dikkatle kesilmiş ve hassas teraziyle tartılmıştır.

9. Kesilen jel parçası, üreticinin talimatları takip edilerek NucleoSpin Gel ve PCR Clean-up Mini Kit kullanılarak saflaştırılmıştır.

10. Saflaştırılan YND kütüphanesinin son konsantrasyonu florometrik DNA ölçümü cihazı ve Qubit™ dsDNA HS and BR Assay Kit kullanılarak ölçülmüştür (10.9 ng/µL). Bu konsantrasyona karşılık gelen molarite değeri hesaplanmıştır (40 nM).

11. YND kütüphanesi, NovaSeq 6000 SP Flowcell'ine yüklenmek üzere 10 mM TrisHCl ile 1.5 nM'ye seyreltilmiştir. Sekanslama esnasında gerçekleşebilecek aşırı kümelenme sorunlarını önlemek için % 40 pHix eklenmiştir.

12. YND kütüphanesi, oda sıcaklığında 8 dakika 0.2 N NaOH ile denatüre edilmiştir. Reaksiyon eşit hacimde 400 nM Tris-HCl ile durdurulmuştur.

13. Sekanslamaya hazır hale getirilen YND kütüphanesi, 300 döngülü 150X2 okuma derinliğinde NovaSeq 6000 SP Flowcell'e yüklenmiştir. Kütüphane NovaSeq 6000 dizileme cihazında sekanslanmıştır.

3.2.5 Yeni Nesil Dizileme Veri Setlerinin Analizi

Bu tez çalışmasında; antibiyotiklere direnç kazandırılan MT ve YT LCE-75 hücrelerinde YND ile sgRNA plazmitlerinin indüksiyon öncesi ve sonrası değişimi

okuma sayısına dayalı olarak analiz edilmiştir. YND veri setlerinin analizi için uygulanan adımlar sırasıyla aşağıdaki gibidir [10]:

1. Dizileme işlemi sonrasında elde edilen ham okuma dosyaları (BCL) hizmet alımı kapsamında kurum tarafından FASTQ formatına çevrilmiştir.
2. FASTQ dosyalarından Illumina adaptör dizileri kırılmıştır.
3. YND kütüphanesi hazırlığında oluşturulan indeksleme planına göre deney grupları için veri setleri ayrıştırılmıştır.
4. 151 baz çifti uzunluğundaki FASTQ dosyaları özel bir MATLAB komutuyla taranmıştır. Her bir okumada +25-46 pozisyonunda yer alan 20 nükleotitik sgRNA dizileri CRISPRi kütüphanesinde bulunan her bir sgRNA'ya eşlenerek sayılmıştır. Böylece her bir deney grubunun zaman noktası=20 ve zaman noktası=0 için sgRNA okuma sayılarını gösteren okuma sayıları veri seti oluşturulmuştur.
5. Zaman noktası=0'da eşlenen sgRNA okuma sayıları kontrol edilerek 20'den az olanlar tüm deney grubu verilerinden çıkarılmıştır [10].
6. Zaman noktası=20'de 0 olarak sayılan sgRNA'lar 1'e çevrilerek sonraki işlemler kolaylaştırılmıştır [10].
7. Çalışmada kullanılan genom çapında sgRNA kütüphanesinde yer alan toplam 21416 sgRNA içinde her bir geni hedefleyen ortalama sgRNA sayısı ortalama 5 olması gerektiği için, 5'ten az sayıda okuma sayısı veren sgRNA'lar tüm deney grubu veri setlerinden çıkarılmıştır [10].
8. Tüm veriler Denklem 3.1'de verilen normalizasyon formülü kullanılarak normalize edilmiştir.

$$\text{Normalizasyon faktörü } i = \text{Okuma sayısı } i / (\sum_{i=1}^n \text{Okuma sayısı}) \quad [10] \quad (3.1)$$

9. Veri setinde yer alan her bir deney grubunda dCas9 indüksiyonundan sonra alınan sgRNA okuma sayısı (zaman noktası t=20), indüksiyon öncesi (zaman noktası t=0) alınan sgRNA okuma sayısına bölünerek her bir sgRNA'nın kat değişimi hesaplanmıştır. Kullanılan formül Denklem 3.2'de gösterilmiştir.

$$\text{Kat değişimi} = \log_2 \left(\frac{\text{Okuma sayısı } (t=20)}{\text{Okuma sayısı } (t=0)} \right) \quad [10] \quad (3.2)$$

10. Her bir geni hedefleyen 5 sgRNA'nın kat değişim değerinin medyanı alınarak gene özgün kat değişim değerleri saptanmıştır [10].

3.2.6 Veri Setinin Doğruluğunun Karşılaştırılması

Antibiyotikle muamele edilmeyen yabancıl tip hücrelerinden elde edilen veri setinin *E. coli* esansiyel genleri tahmin etme yeteneği test edilmiştir. Bu amaçla YT. A ve B deney gruplarından alınan sgRNA okuma sayıları verileri Metot 3.2.5'te sıralanan aşamaların uygulanmasıyla işlenmiştir. Biyolojik replika olan A ve B deney grubunun ortalaması alınmıştır. Her bir gene ait kat değişimi değeri, esansiyel gen tahmininde altın standart olarak kabul edilen Tradis ve EcoGene veri setiyle karşılaştırılmıştır [50], [52]. Karşılaştırma sırasında kat değişimi aralıklarında esansiyel ya da esansiyel olmayan genler Tradis ve Ecogene'deki veri setindeki varlığıyla doğru ya da yanlış şeklinde ikili sınıflandırma stratejisi uygulanmıştır. Elde edilen doğru pozitif, yanlış pozitif, doğru negatif ve yanlış negatif oranıyla Alıcı İşletim Karakteristiği (ROC) analizi yapılmış ve grafiği çizilmiştir [70]. Eğrinin altında kalan alan (AUC) hesaplanarak sgRNA kütüphanesinin kalitesi esansiyel gen tahmini kabiliyetine bağlı olarak analiz edilmiştir.

3.2.7 Adaptasyondan Sonra Önemi Artan Genlerin Belirlenmesi

Antibiyotiklere direnç kazanarak genotipi değişen MT LCE-75 hücreleri ve YT LCE-75 hücreleri karşılaştırılarak adaptasyondan sonra önemi artan genleri belirlenmiştir. Önemi artan genleri saptamak için stratejik olarak YT hücrelerde kat değişim değeri yüksek olan, MT hücrelerde düşük kat değişim değerine sahip olan genler elde edilen veri setlerinde incelenmiştir.

Yöntemin detayları şöyledir:

1. Her bir geni ve kat değişimini içeren veri setinde YT deney gruplarında medyan kat değişim değeri -1'den daha yüksek olan genler listeden ayrıştırılmıştır. Bu işlem veri setinde sadece esansiyel olmayan genlerin kalması için uygulanmıştır. 3530 gen içeren liste ile analiz sürdürülmüştür.
2. Elde edilen listede antibiyotiklere dirençli deney gruplarında (AMP.A, AMP.B, CHL.A, CHL.B, DOX.A, DOX.B, OXA.A, OXA.B, SPR.A, SPR.B) medyan kat değişim

deęeri -2'den dūřuk olan genler filtrelenmiřtir. Bu iřlem esansiyel hale gelerek adaptasyondan sonra önemi artan genlerin belirlenmesi için uygulanmıřtır [10].

- ◆ Elde edilen gen listelerinin görev aldıkları hücresel yollar ECOCYC evrimii aracı kullanılarak belirlenmiştir [71].
- ◆ Proteinler arasındaki fonksiyonel ve fiziksel ilişkileri incelemek için STRING evrimii aracından faydalanılmıştır [72].
- ◆ Zenginleşen genlerin analizi için KOBAS-i evrimii aracı kullanılmıştır [73].



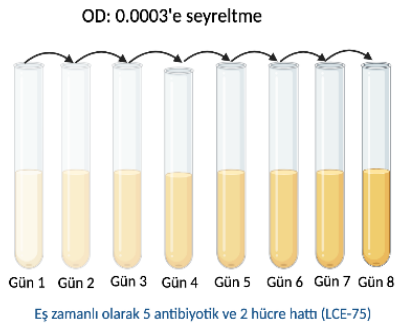
4

SONUÇ VE ÖNERİLER

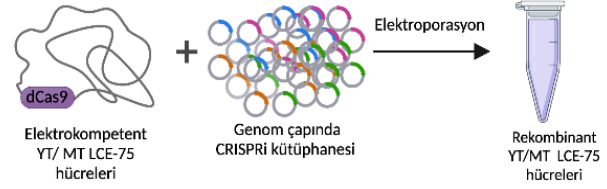
4.1 Deneysel Bulgular

Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen tüm deney aşamaları Şekil 4.1’de görselleştirilmiştir.

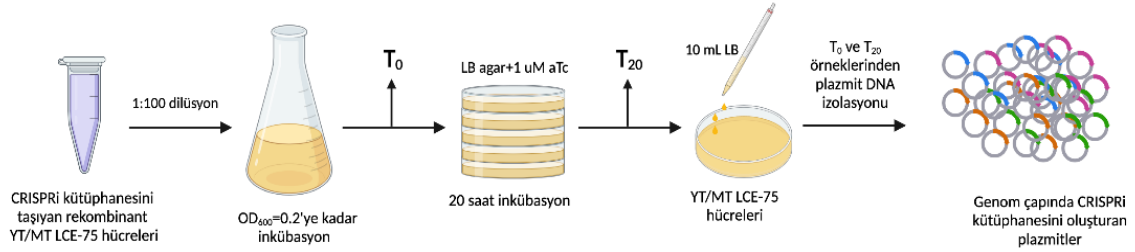
1. Adaptif Laboratuvar Evrimi Deneyleri



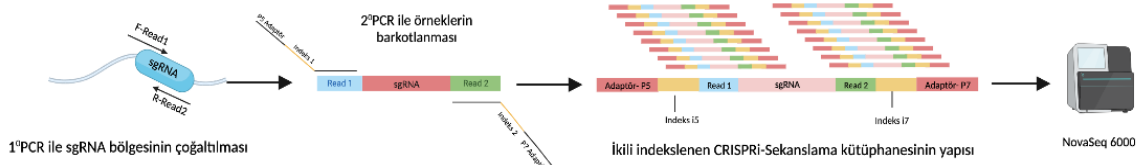
2. CRISPRi Kütüphanesinin Transformasyonu



3. Genom Çapında CRISPRi Kütüphanesi Tarama Deneyleri



4. Yeni Nesil Dizileme Kütüphanesinin Hazırlanması ve CRISPRi Sekanslama



Şekil 4. 1 Bu tez çalışmasında uygulanan deneysel yöntemlerin akış şeması.

4.1.1 Adaptif Laboratuvar Evrimi Deney Sonuçları

Bu tez çalışmasında ALE deneyleri uygulanarak LCE-75 hücreleri Tablo 4.1’de listelenen antibiyotikler varlığında dirençli hale getirilmiştir. Adaptif laboratuvar

evrimi deneylerine başlanmadan önce, hücrenin yeterli inhibisyon altında bırakılmasını sağlayan ve aynı zamanda büyüebilmesine izin veren antibiyotik konsantrasyonlarının belirlenmesine önem verilmiştir. Bu amaçla LCE-75 hücrelerinin ampisilin, doksisisiklin, kloramfenikol, oksasilin ve spiramisin varlığında büyüyebildiği MİK değeri tespit edilmiştir. Tablo 4.1’de ALE deneylerine başlamak için seçilen antibiyotik konsantrasyonları listelenmiştir.

Tablo 4. 1 LCE-75 hücrelerinin antibiyotikler için MİK değerleri.

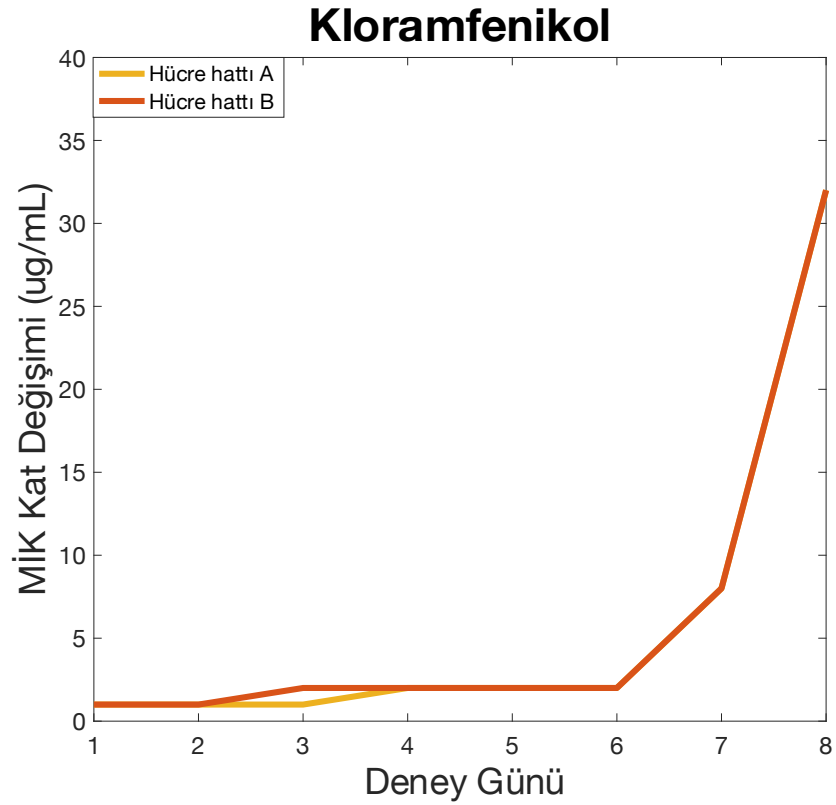
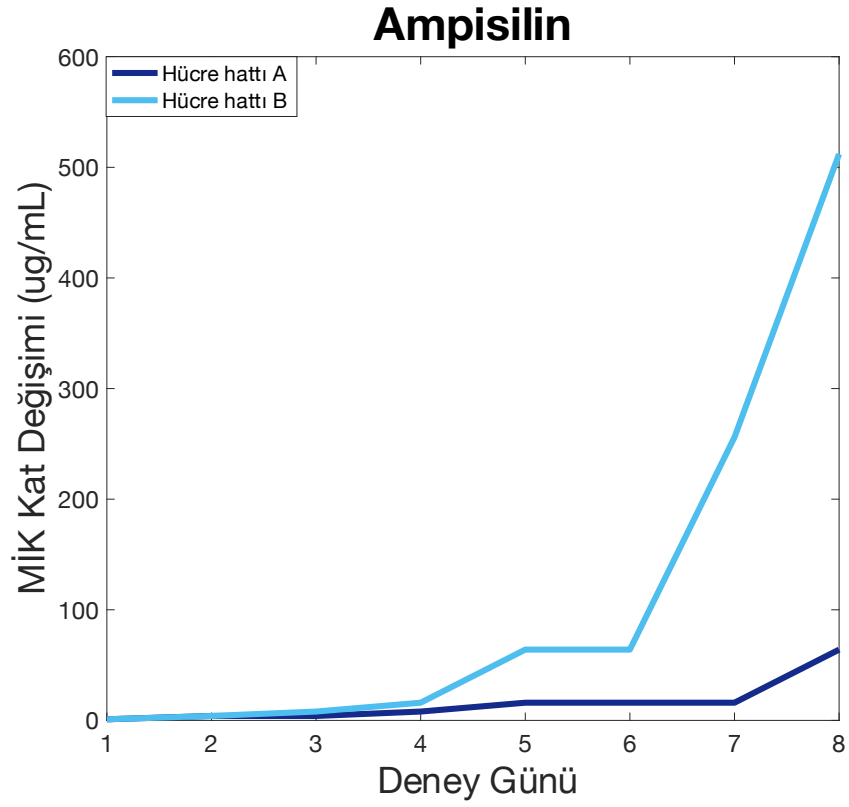
Antibiyotik	MİK ($\mu\text{g/ml}$)	ALE Başlangıç Konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$)
Ampisilin	12	6
Kloramfenikol	12	6
Doksisisiklin	3	1.5
Oksasilin	350	175
Spiramisin	300	150

Adaptif laboratuvar evrim deneyleri süresince LCE-75 hücrelerine, Tablo 4.1’de belirtilen başlangıç konsantrasyonları ve iki kat artan konsantrasyonlarıyla 8 deney günü boyunca belirlenen antibiyotikler varlığında adaptasyon kazandırılmıştır. Aynı atadan üretilen hücrelerin her biri 2 farklı hücre hattı şeklinde çalışılmıştır. Deney süresince farklı antibiyotiklere maruz bırakılarak adaptasyon kazandırılan LCE-75 hücrelerinin her bir inkübasyon döngüsü sonunda büyüdüğü en yüksek konsantrasyon değerleri kaydedilmiştir. Tablo 4.2’de 8 deney günü boyunca LCE-75 hücrelerinin her bir antibiyotik için kaydedilen MİK değeri artışı listelenmektedir.

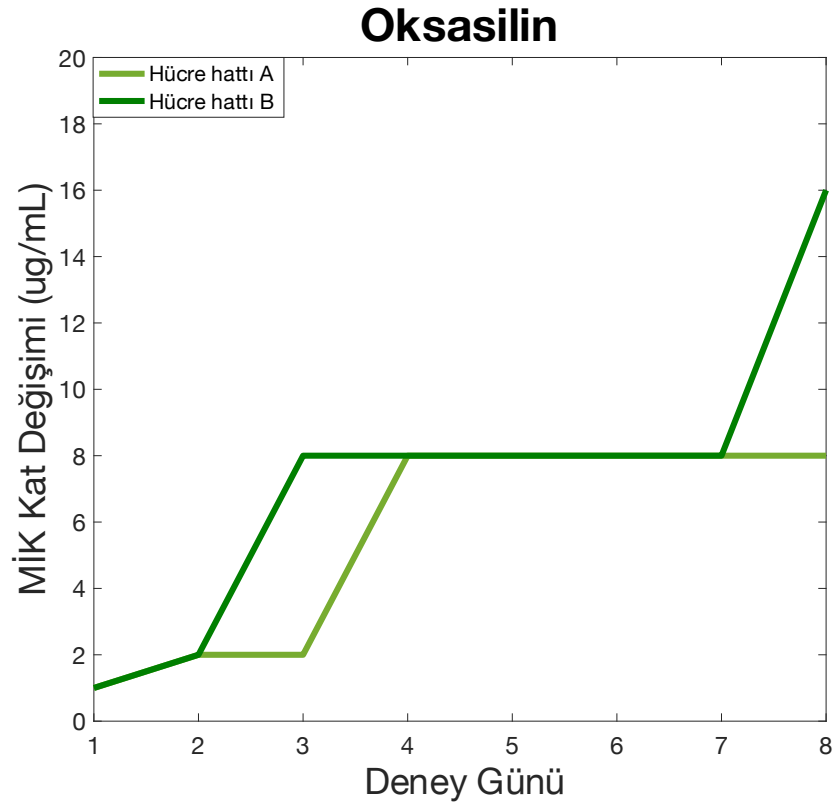
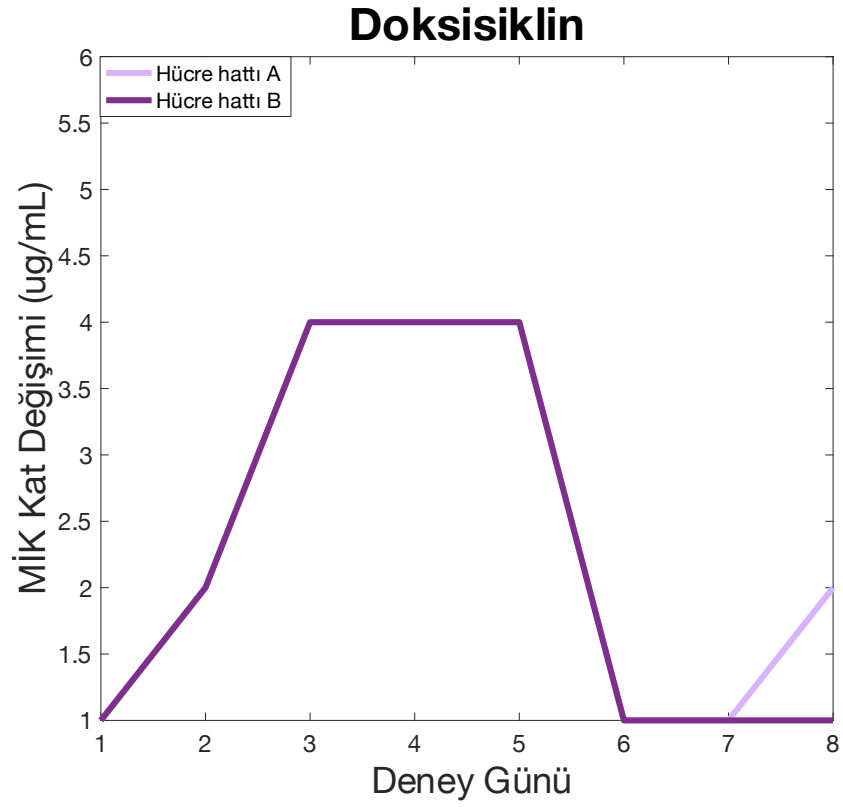
Tablo 4. 2 ALE boyunca her deney gününde LCE-75'in büyüdüğü en yüksek MİK değerleri ($\mu\text{g/mL}$).

ALE Hücre Hattı	Gün 1	Gün 2	Gün 3	Gün 4	Gün 5	Gün 6	Gün 7	Gün 8
Ampisilin A	6	24	24	48	96	96	96	384
Ampisilin B	6	24	48	96	384	384	1.536	3.072
Kloramfenikol A	6	6	6	12	12	12	48	192
Kloramfenikol B	6	6	12	12	12	12	48	192
Doksisiklin A	1.5	3	6	6	6	9	1.5	3
Doksisiklin B	2.5	3	6	6	6	1.5	1.5	1.5
Oksasilin A	175	350	350	1.400	1.400	1.400	1.400	1.400
Oksasilin B	175	350	1.400	1.400	1.400	1.400	1.400	2.800
Spiramisin A	150	600	600	600	600	600	2.400	4.800
Spiramisin B	150	600	600	600	600	1.200	1.200	4.800

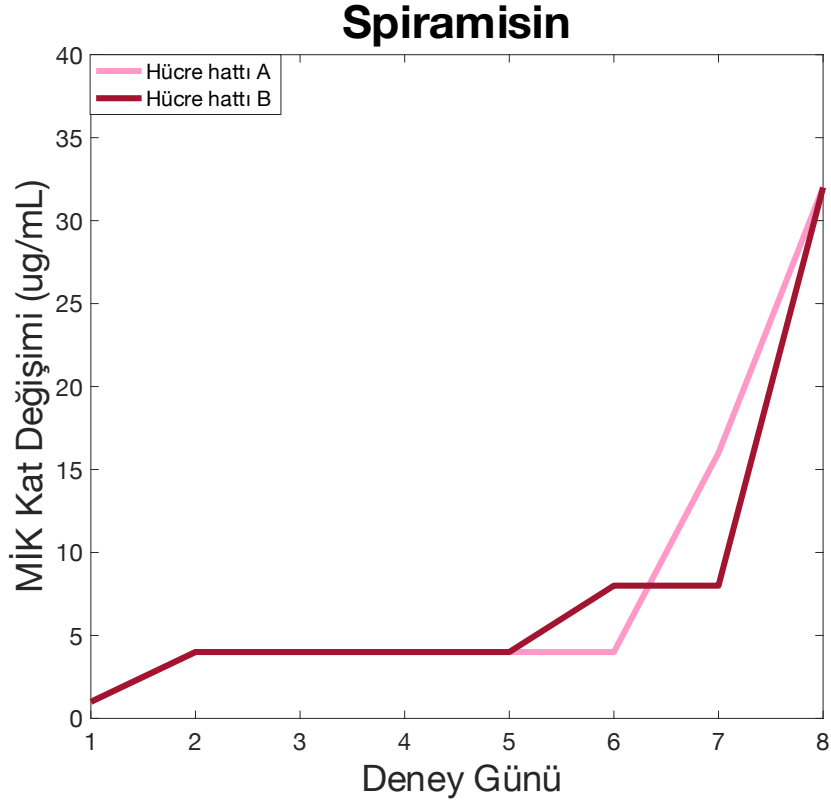
Doksisikline maruz bırakılarak adaptasyona zorlanan LCE-75 hücrelerinde beklenmedik bir şekilde 6. deney gününde direnç seviyesi düşmüştür. A hücre hattı 8. deney gününde tekrar bir yüksek konsantrasyonda büyüme göstermiştir. B hücre hattı ise 6. deney gününü takiben daha yüksek doksisiklin konsantrasyonlarında büyüme göstermemiştir. Ampisiline maruz bırakılarak 8 deney günü sonunda ölçülen MİK değerinin 256 kat daha yüksek konsantrasyonunda büyüebilen B hücre hattı tüm hücre hatları arasında en çok MİK artışı gösteren MT hücre olmuştur. Şekil 4.2'de her deney günü gözlemlenen MİK değişimi gösterilmiştir.



Şekil 4. 2 ALE deneyi süresince antibiyotiklere direnç kazanan LCE-75 hücrelerinin MİK değişimi ($\mu\text{g/mL}$).



Şekil 4.2 ALE deneyi süresince antibiyotiklere direnç kazanan LCE-75 hücrelerinin MİK değişimi ($\mu\text{g/mL}$) (devamı).



Şekil 4.2 ALE deneyi süresince antibiyotiklere direnç kazanan LCE-75 hücrelerinin MİK değişimi ($\mu\text{g/mL}$) (devamı).

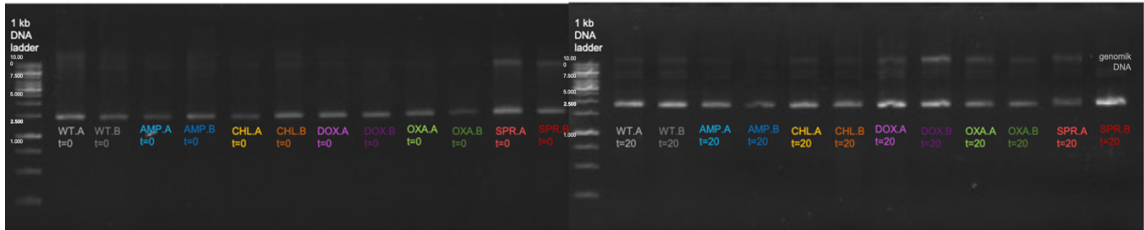
4.1.2 Genom Çapında CRISPRi Tarama Deneyleri Sonuçları

Antibiyotiklere direnç kazanan mutant tip (MT) ve yabanıl tip (YT) LCE-75 hücrelerine CRISPRi kütüphanesinin transformasyonu için ilk aşamada bu hücreler elektrokompotent hale getirilmiştir. Hücrelerin tekrarlı olarak yıkanması ve çöktürülmesi sonucunda tüm deney gruplarından başarıyla elektrokompotent hücreler elde edilmiştir. Bu protokol esnasında elektroporasyon işleminin verimliliğini korumak için her bir hücre hattından en az 10^{10} kob/mL konsantrasyonunda elektrokompotent hücre eldesi hedeflenmiştir. Elde edilen elektrokompotent YT ve MT LCE-75 hücreleri seyreltme metoduyla sayılmıştır. Sonuç olarak, tüm hücre hatlarından ortalama 10^{10} kob/mL canlı elektrokompotent hücre elde edildiği doğrulanmıştır.

Genom çapında CRISPRi kütüphanesi YT ve MT LCE-75 hücrelerine elektroporasyon metoduyla transforme edildikten sonra kütüphanenin kaç hücreye girdiği yöntemin başarısını etkileyen önemli bir parametreydi. Bu amaçla transformasyondan sonra başarıyla kütüphaneyi hücre içine alan canlı hücre sayısı

yine seyreltme yöntemiyle agar plakalarda sayılmıştır. Hücre sayımı sonucunda transformasyon verimi için kritik eşik olan kütüphanedeki sgRNA sayısından en az 100 kat daha fazla koloni eldesi ($\sim 2 \times 10^6$) tüm deney gruplarında sağlanmıştır.

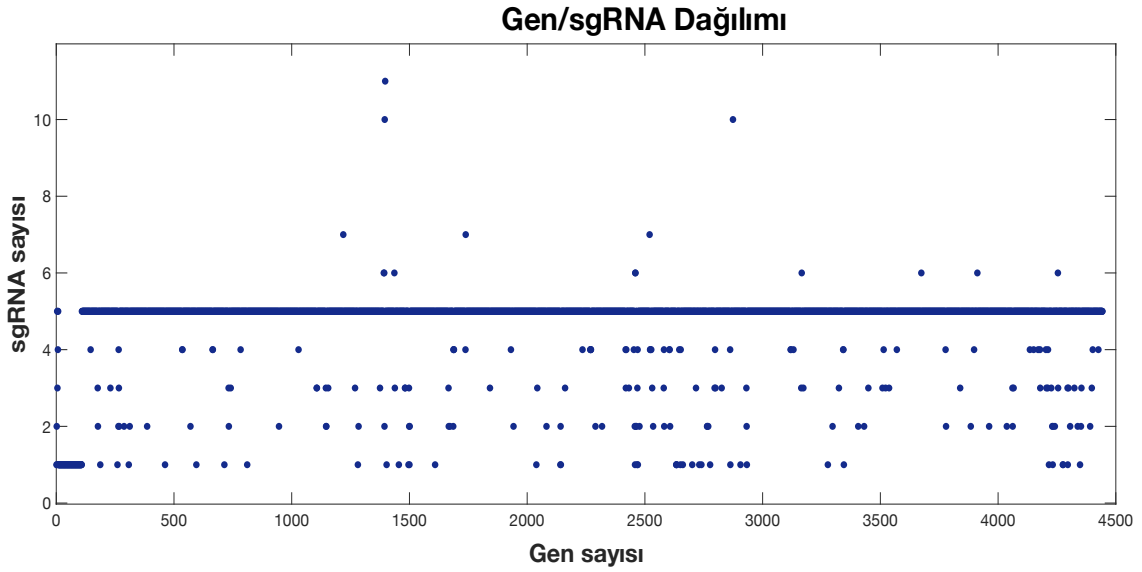
Tüm genomu hedefleyen CRISPRi kütüphanesini antibiyotiklere adaptasyon sağlayan MT ve YT LCE-75 hücrelerinde aktive ederek tarama deneyleri gerçekleştirilmiştir. Deney esnasında her bir deney grubundan eş zamanlı olarak indüksiyondan önce (zaman noktası=0) ve indükleyicinin varlığında 20 saat inkübasyon sonrasında (zaman noktası=20) kültür örnekleri alınarak kütüphaneyi oluşturan sgRNA ekspresyon plazmitleri saflaştırılmıştır. Yeni Nesil Dizileme kitaplığı oluşturmak için şablon DNA olacak bu plazmitler agaroz jelde elektroforez edilmiştir. Böylece genom çapında CRISPRi kütüphanesini oluşturan sgRNA plazmitlerinin varlığı kontrol edilmiştir. Jel görüntülemesi yapılarak sgRNA kütüphanesinde yer alan sgRNA ekspresyon plazmitlerinin uzunluğu (~ 2.5 kb) ve deney gruplarındaki varlığı doğrulanmıştır.



Şekil 4. 3 Tüm deney gruplarından elde edilen plazmit örneklerinin elektroforez görüntüsü.

4.1.3 Yeni Nesil Dizileme Verilerinin Analiz Sonuçları

Bu tez çalışmasında, *E. coli* MG1655 genomunda bulunan tüm genleri hedefleyen CRISPRi kütüphanesi YT ve MT hücrelere transforme edilmiştir, CRISPRi tarama deneyleri yapılmıştır ve her bir deney grubunda bulunan sgRNA plazmitlerinin sayısı Yeni Nesil Dizileme tekniğiyle elde edilmiştir. Kullanılan genom çapında CRISPRi kütüphanesi toplamda 4.444 geni 21.417 sgRNA ile hedeflemektedir. Kütüphanede her bir gen için ortalama 5 farklı sgRNA bulunmaktadır. Kütüphanenin içerdiği sgRNA sayısı kontrol edilmek üzere YT. A T.0 deney grubundan YND ile edilen okumaların sgRNA haritasına eşlendiği veriler kullanılmıştır. Şekil 4.4'te sgRNA'ların sayıca dağılımı gösterilmiştir.

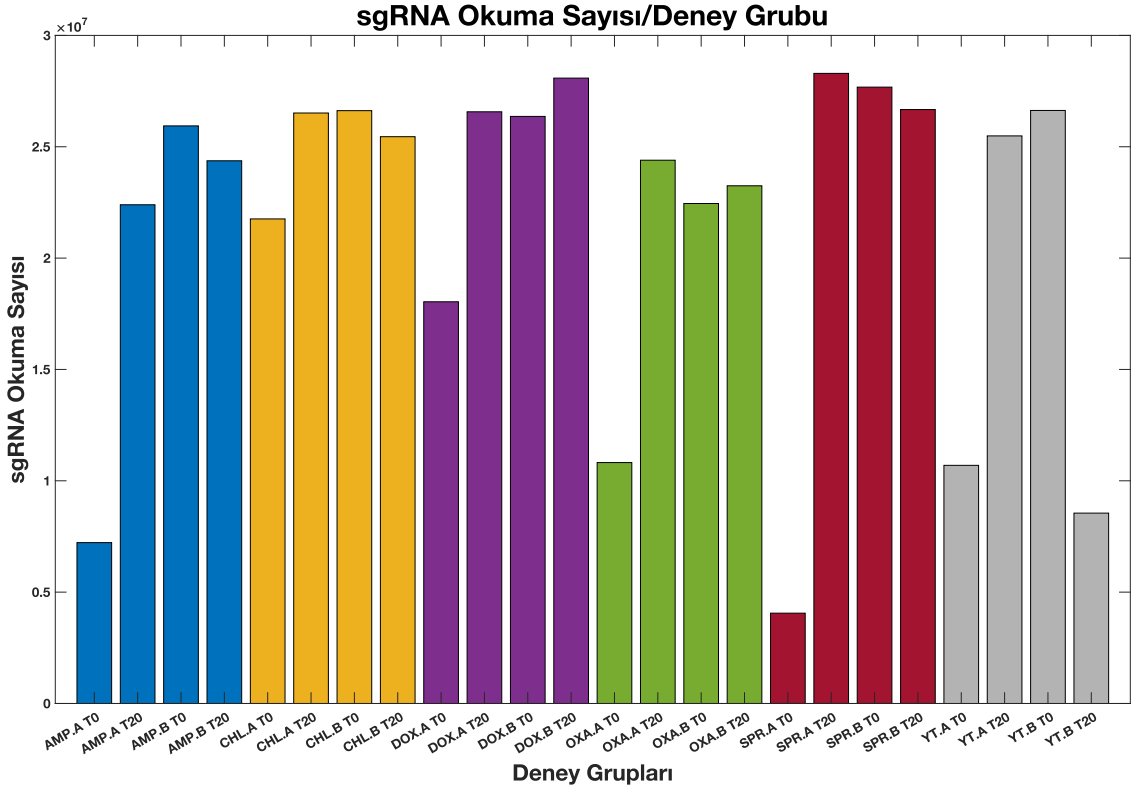


Şekil 4. 4 YT.A T.0 deney grubunda yer alan her bir geni hedefleyen sgRNA sayısının dağılımı.

YND ile kütüphanede yer alan sgRNA plazmitlerinin indüksiyon öncesi ve sonrası büyümeye bağlı değişimi sgRNA okuma sayısı verileriyle analiz edilmiştir. Hücrelere transforme edilen genom çapında CRISPRi kütüphanesinin içerdiği 21417 sgRNA listesi ve karşılık geldiği hedef bölgeler FASTQ okuma dosyaları taranarak eşleştirilmiş ve sayılmıştır. Tüm deney gruplarında, listede eşleşen toplam sgRNA sayısı 21416 olarak belirlenmiştir. 1 sgRNA'nın deney sırasında ya da laboratuvara ulaşımı esnasında kütüphaneden eksildiği tespit edilmiştir. Kütüphaneyi oluşturan sgRNA'lardan alınan toplam okuma sayıları incelendiğinde, her bir deney grubunda ortalama $1,06 \times 10^7$ okumanın gerçekleştiği belirlenmiştir. Spiramisine adaptasyon sağlayan A hücre hattının zaman noktası=0'da (SPR.A T0) elde edilen toplam okuma sayısı $\sim 4 \times 10^6$ olup, tüm veri setinde en az okuma sayısı veren deney grubu olarak saptanmıştır. Aynı deney grubunun zaman noktası=20'de (SPR.A T20) verdiği toplam okuma sayısı $\sim 28 \times 10^6$ olarak belirlenmiştir. Yöntemin uygun şekilde çalışması için hedefleyen 100X kapsamada yapılan YND sonrasında yüksek sayıda okumaların elde edilmesi başarılmıştır. Tablo 4.3'te toplam okuma sayıları listelenmiştir.

Tablo 4. 3 Tüm deney gruplarında elde edilen toplam sgRNA okuma sayıları.

Deney Grubu	Okuma Sayısı	Deney Grubu	Okuma Sayısı
YT.A T.0	10.693.583	DOX.A T.0	18.038.563
YT.A T.20	25.487.463	DOX.A T.20	26.569.601
YT.B T.0	26.630.170	DOX.B T.0	26.362.934
YT.B T.20	8.548.577	DOX.B T.20	28.082.624
AMP.A T.0	7.223.268	OXA.A T.0	10.818.095
AMP.A T.20	22.394.699	OXA.A T.20	24.395.931
AMP.B T.0	25.936.462	OXA.B T.0	22.451.837
AMP.B T.20	24.369.833	OXA.B T.20	23.247.362
CHL.A T0	21.759.348	SPR.A T0	4.056.036
CHL.A T20	26.515.312	SPR.A T20	28.294.729
CHL.B T0	26.621.150	SPR.B T0	27.677.704
CHL.B T20	25.451.794	SPR.B T20	26.671.424



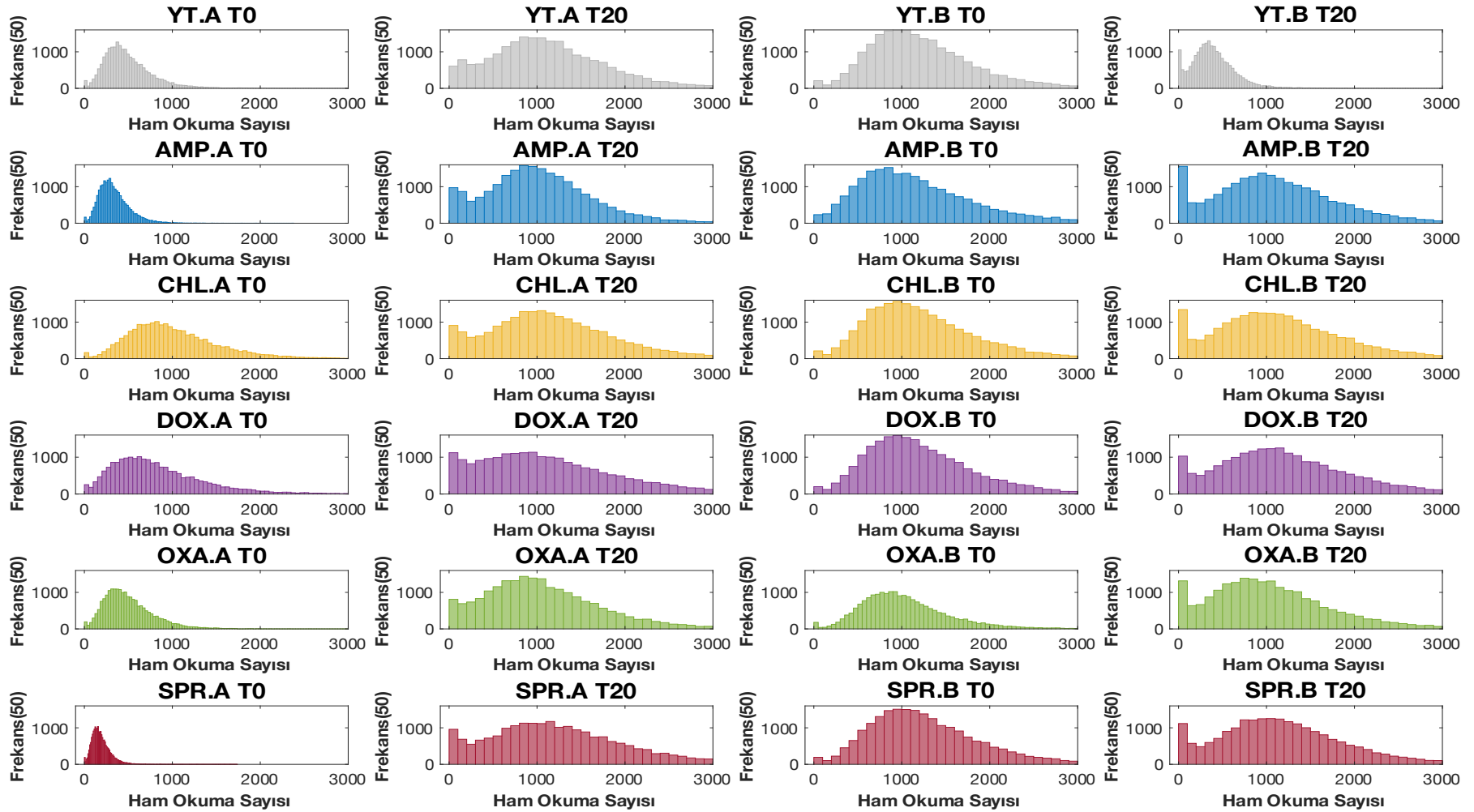
Şekil 4. 5 YND sonucu elde edilen toplam okuma sayıları.

Genom çapında CRISPRi kütüphanesine eşleştirilerek sayılan sgRNA okuma sayısı veri setinde zaman noktası=0'da 20'den az okuma veren sgRNA'lar istatistiki olarak anlamsız olduğu için tüm deney grubu verilerinden çıkarılmıştır [10]. Tüm deney grubundan çıkarılan sgRNA sayısı 269 olup 258 farklı geni hedeflemektedir. Sonuç olarak tüm sgRNA kütüphanesinin %1,2'lik kısmı çıkarılmıştır. Veri setinden çıkarılan genlerden yalnızca 4 tanesi Tradis [52] veri setinde esansiyel olarak nitelendirilen genlerdir. Bu genler glmU, nusB, trpS ve tsf olarak belirlenmiştir. Aynı şekilde çıkarılan genlerden Tradis veri setinde esansiyel olmayan gen olarak sınıflandırılan 41 gen tespit edilmiştir. Diğer genlerin esansiyellik durumu literatürde yer alan diğer veri setlerinde değişkenlik göstermektedir [50].

Kullanılan kütüphanede yer alan toplam 21416 sgRNA'dan bir geni en az 5 sgRNA ile hedeflemeyenler tüm deney gruplarındaki veri setlerinden çıkarılmıştır. 3905 geni hedefleyen 19589 sgRNA ile analiz işlemlerine devam edilmiştir. Genom

apında CRISPRi kütüphanesine eşleştirilerek sayılan ham sgRNA okuma sayılarının dağılımı histogram ile şekil 4.6'da gösterilmiştir.

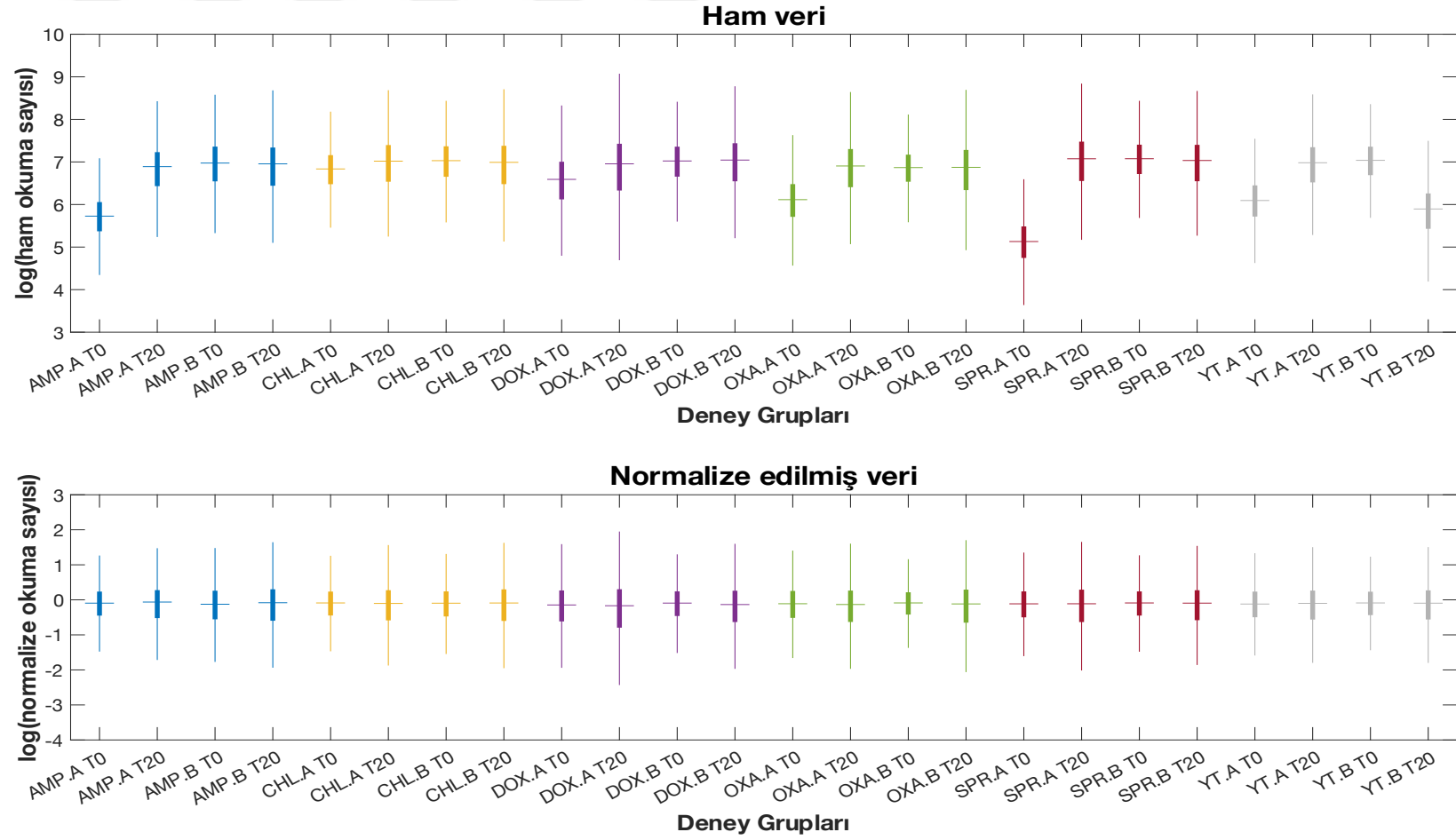




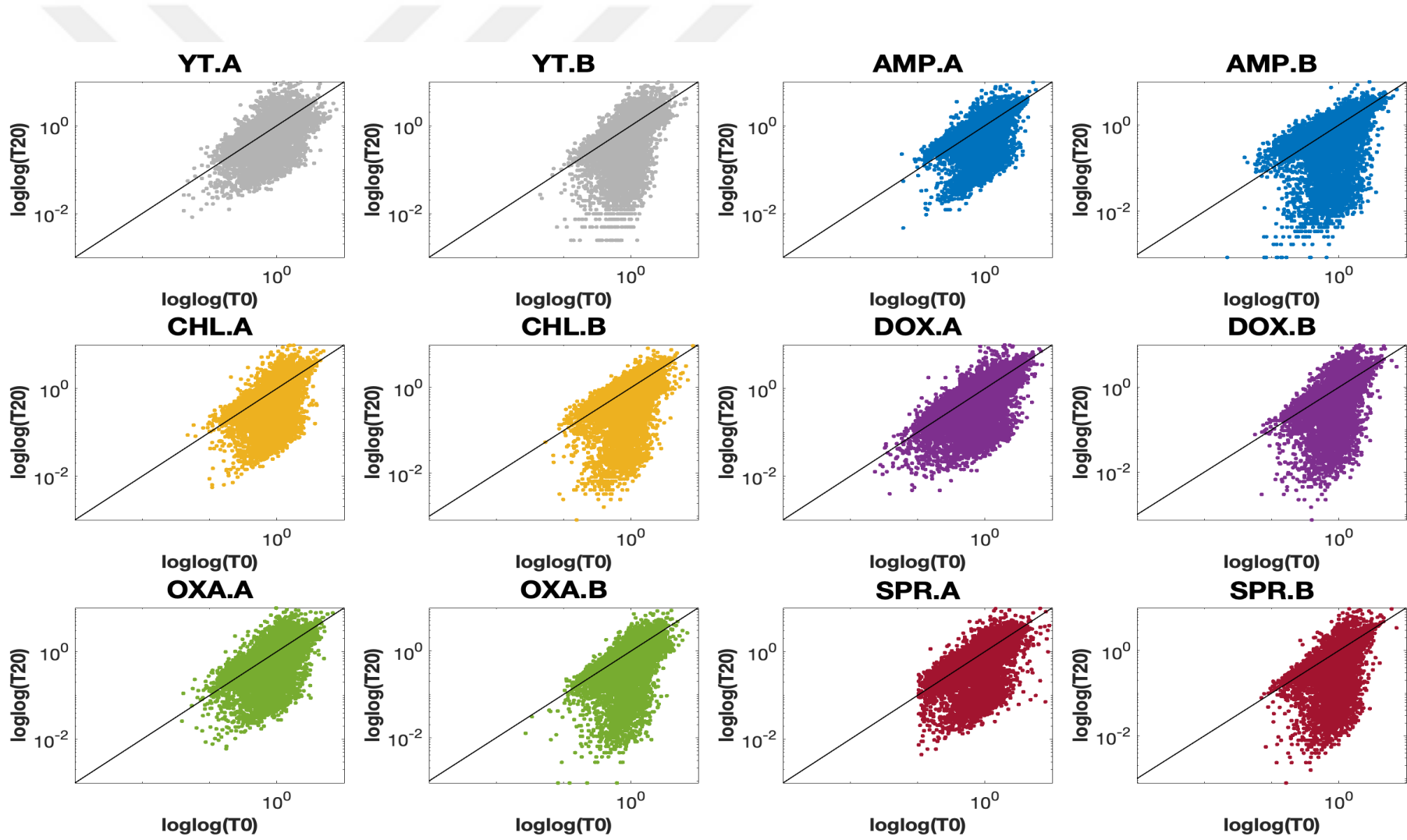
Şekil 4. 6 Ham sgRNA okuma sayılarının deney grupları arasındaki dağılımı.

Hedeflenen yüksek okuma sayısı başarıyla gerçekleştirilmiştir fakat deney grupları arasında birkaç katlık fark tespit edilmiştir. Normalizasyon biyolojik olmayan farklılıkları veri setinden çıkarmak ve homojen bir dağılım elde etmek için uygulanır [74]. Elde edilen tüm veri setinin normal bir dağılım göstermesi için veri setinin ortalaması alınarak (Denklem 3.1) normalize edilmiştir. Ham veri ve normalize edilen veri setinin farkı Şekil 4.7’de gösterilmiştir. Şekil 4.8’de ise normalize edilen veri setinin deney grupları arasında zaman noktası=20 ve zaman noktası=0’a göre dağılımı yer almaktadır.





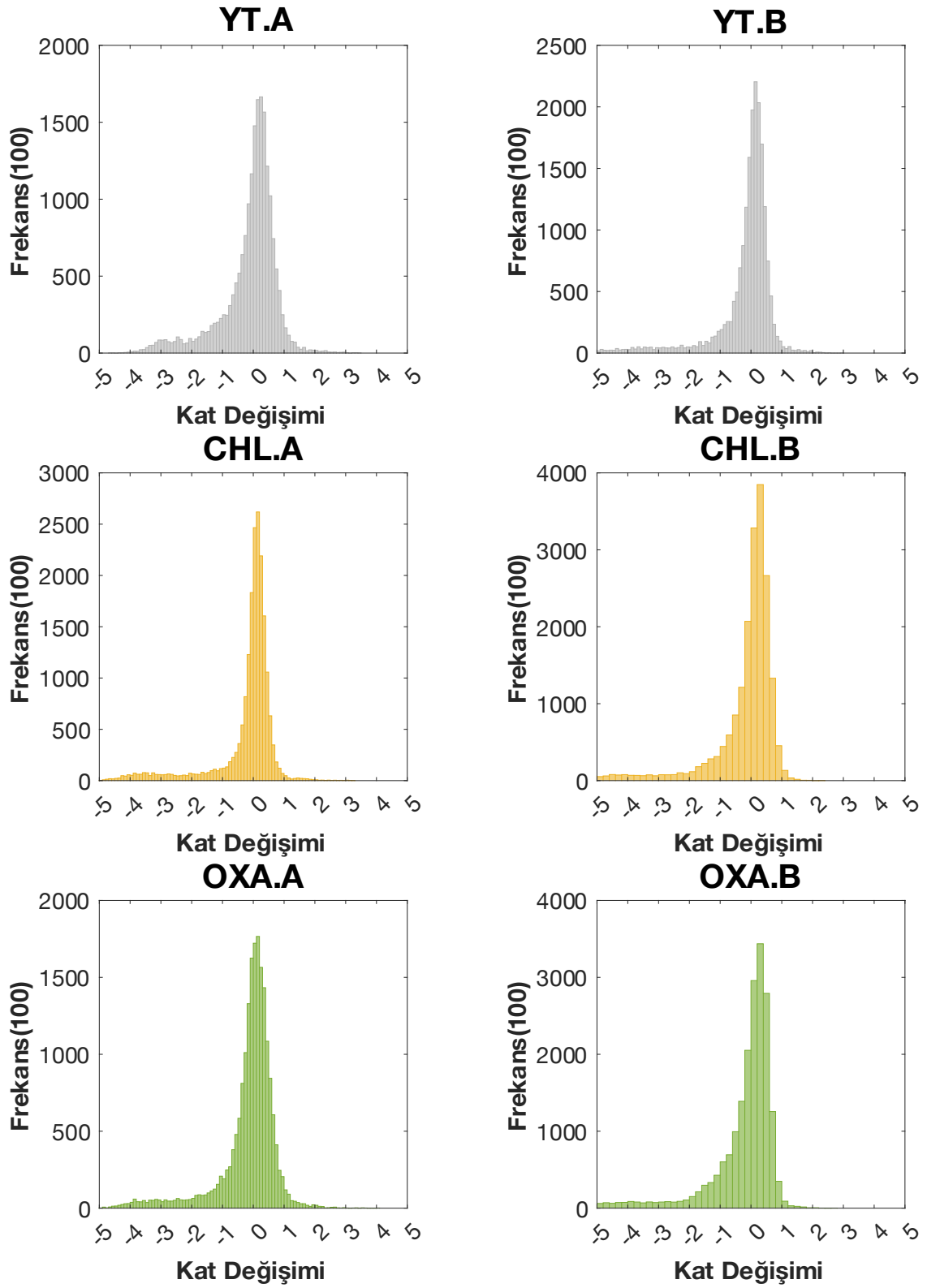
Şekil 4. 7 Ham ve normalize edilmiş veri setinin karşılaştırılması (Her kutuda, ortadaki işaret medyanı, kutunun alt ve üst kenarları sırasıyla 25. ve 75. yüzdalık dilimleri gösterir).



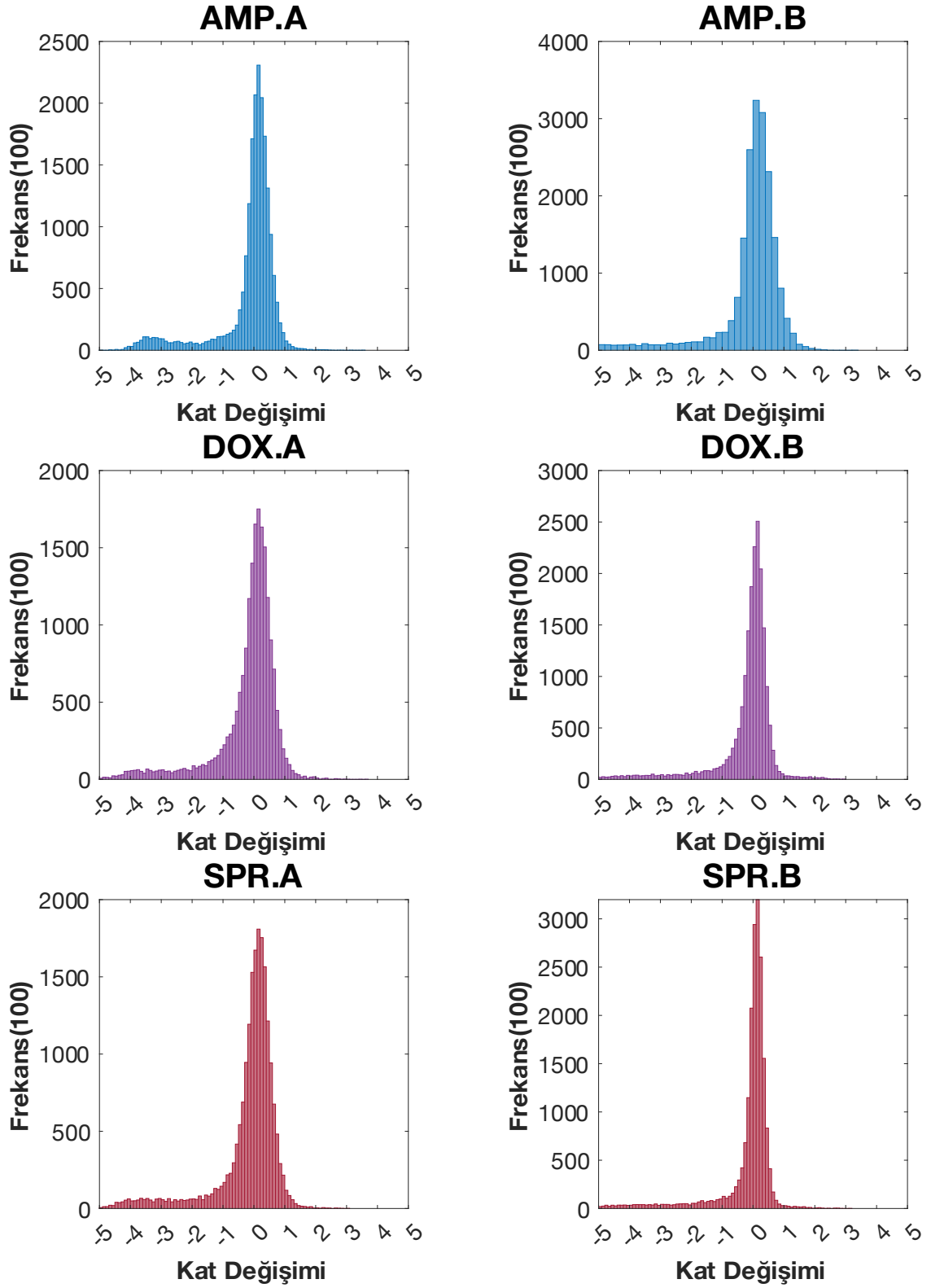
Şekil 4. 8 Normalize edilmiş veri setlerinin deney grupları, zaman noktası=20 ve zaman noktası=0'a göre dağılımı (Her bir nokta 1 sgRNA'yı temsil etmektedir).

Genom apında CRISPRi kütüphanesinde yer alan her bir sgRNA'nın kat değişim değeri, normalize edilen zaman noktası=20'deki sgRNA okuma değerinin zaman noktası=0'daki değere bölünmesi ve log2 tabanına çevrimiyle hesaplanmıştır. Bu hesaplama tekniği RNA Dizileme verilerinin analizinde de uygulanmaktadır [75]. şekil 4.9'de her bir deney grubunun kat değişimi dağılımı histogram ile görselleştirilmiştir. Deney grupları arasında kat değişiminin dağılımı -5'ten +5' e kadar farklılık göstermektedir. Kat değişiminin 0 olduğu bölgede tüm deney grupları belirgin bir yığılım davranışı göstermektedir.





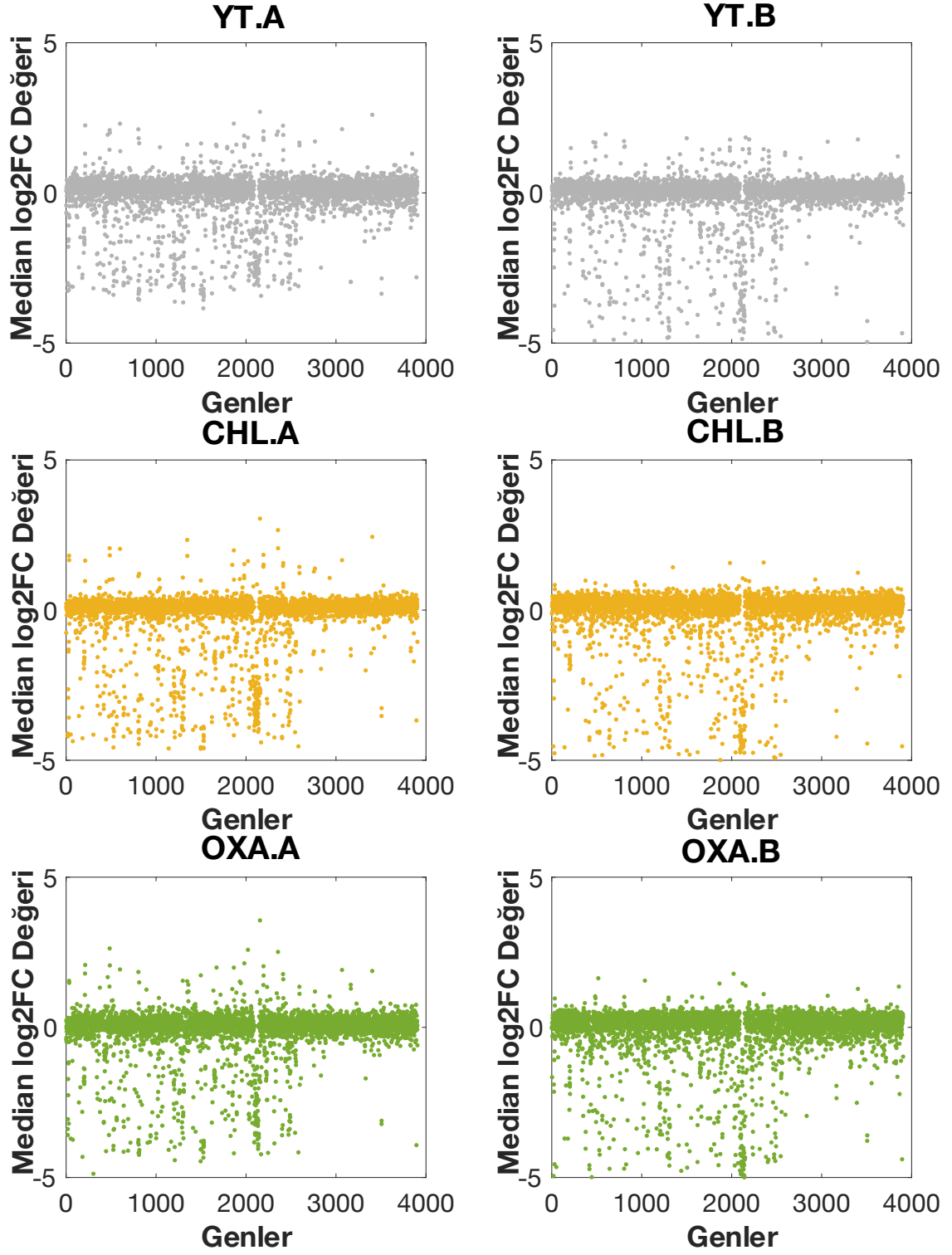
Şekil 4. 9 Her bir deney grubunun kat değişiminin dağılımını gösteren histogram grafikleri.



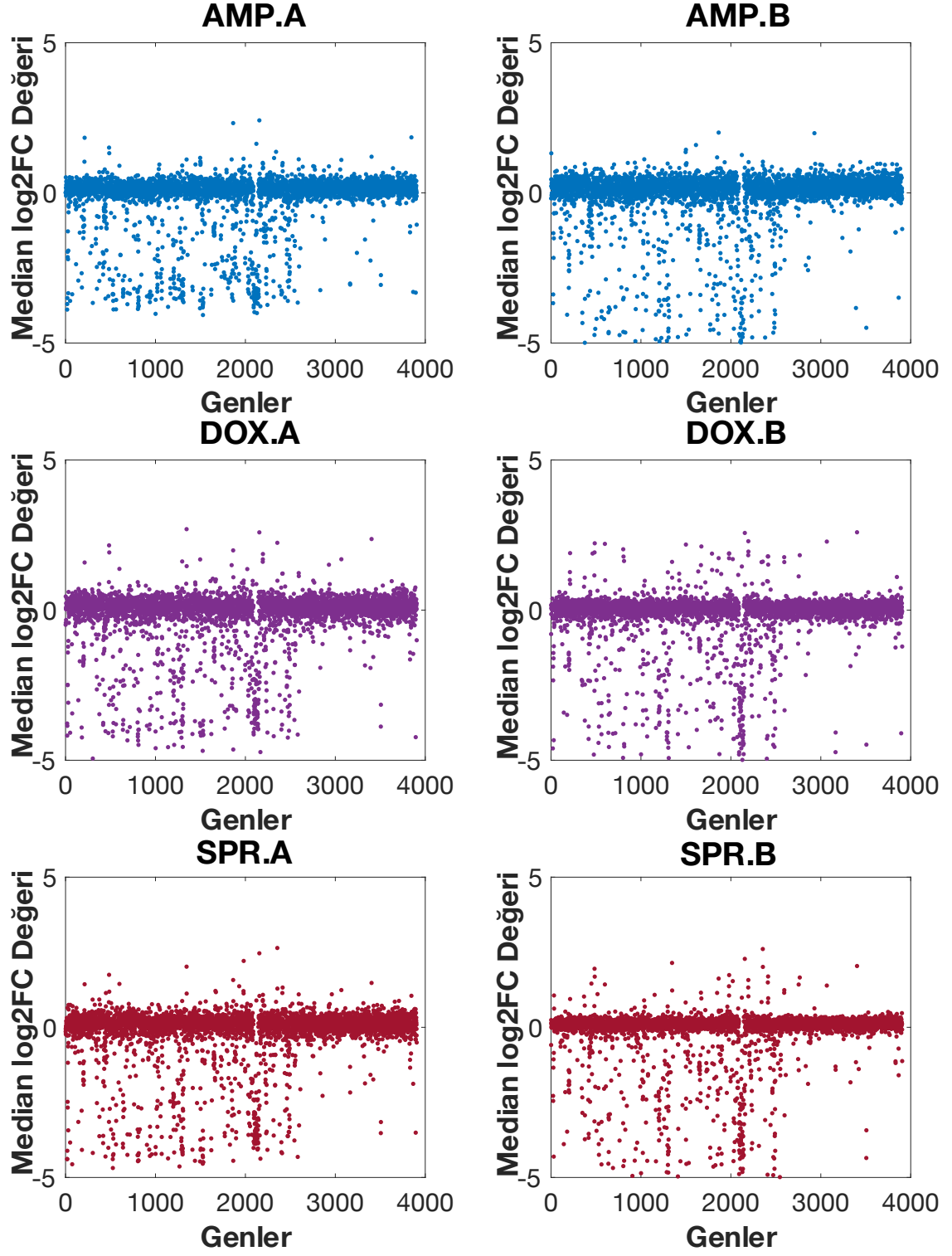
Şekil 4.9 Her bir deney grubunun kat değişiminin dağılımını gösteren histogram grafikleri (devamı).

Kütüphanede yer alan sgRNA'ların her biri genomdaki bir geni 5 farklı pozisyondan hedeflemek üzere tasarlanmıştır. Bu durum hedeflenen pozisyondan bağımsız olarak dCas9 inhibisyonunu ölçmek ve aynı zamanda transformasyon esnasında yaşanacak kayıpları analiz esnasında azaltmak için uygulanan bir stratejidir [12], [76]. Her bir sgRNA'nın hedeflediği genin kat değişimi hesaplanmak için özgün kat değişimi grubunun medyanı alınmıştır [10]. Veri setinden istatistiksel olarak anlamsız ölçümlerin çıkarılmasıyla kalan toplam 19589 sgRNA'nın her 5'inin hedeflediği 3905 *E. coli* geni için gen kat değişimi elde edilmiştir [9]. Şekil 4.10 'da her bir deney grubunun gene özgün kat değişim değerlerinin dağılımı gösterilmiştir.





Şekil 4. 10 Her bir deney grubunun medyan kat değişim değerlerinin dağılımı.

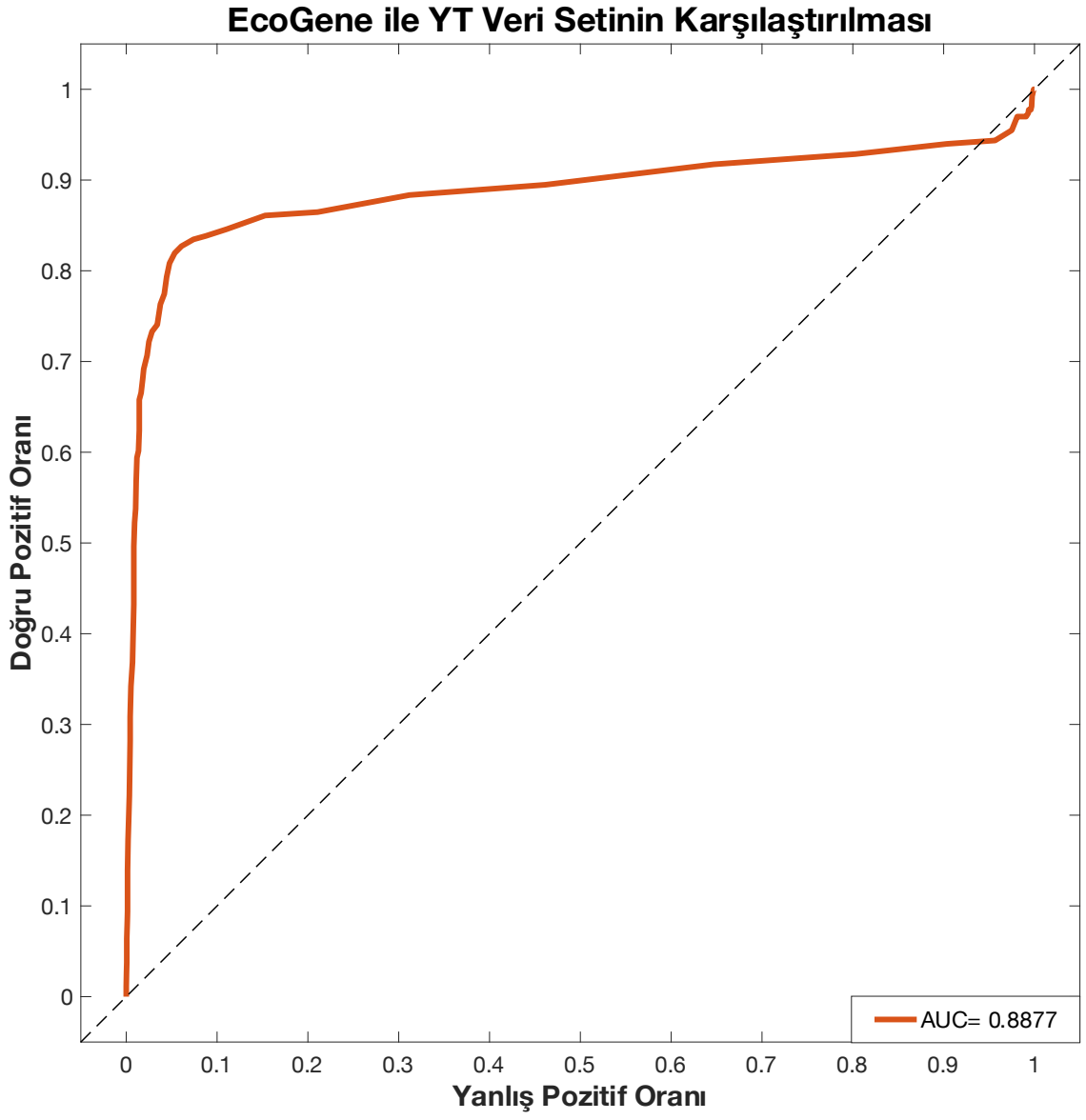


Şekil 4. 10 Her bir deney grubunun medyan kat değişim değerlerinin dağılımı (devamı).

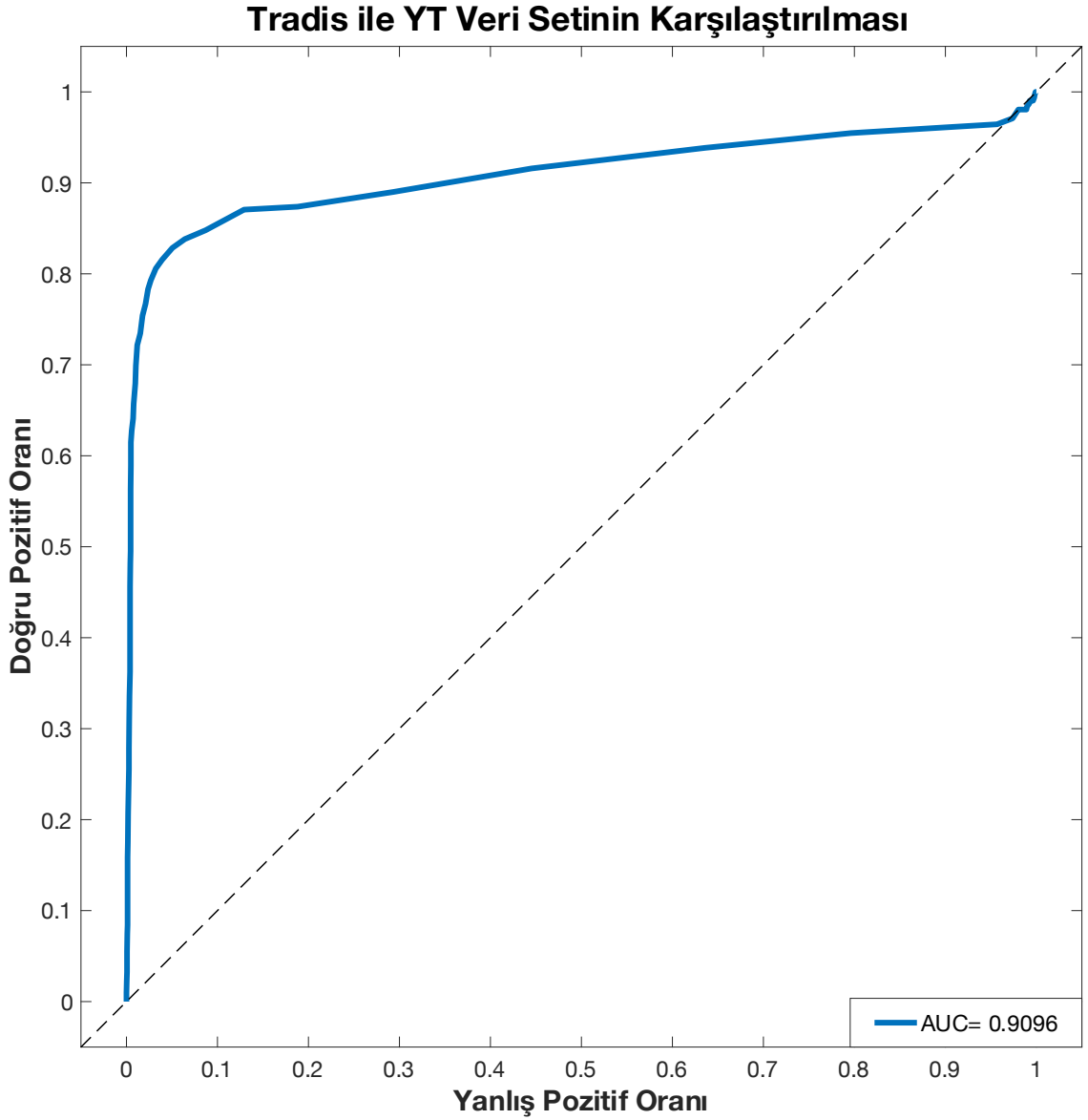
4.1.4 Veri Setinin Doğruluğunun Karşılaştırılma Sonuçları

Esansiyel bir gen sgRNA ile hedeflendiğinde dCas9'un RNA polimeraza yapacağı sterik engel sonucunda gen ifade seviyesi azalır. Bu esansiyel genin fonksiyonunu yerine getirememesi de hücrenin büyümesine olumsuz etki yapar. Genom çapında CRISPRi kütüphanesinde esansiyel genleri hedefleyen sgRNA'ları taşıyan plazmitler de hücrenin normal şekilde büyümesine engel olur. Bu kütüphanenin YND ile profillemesi sonucunda elde edilen sgRNA okuma sayısı hücre sayısı azaldığı için azalır. Bu sonuçların nicel bir değeri olan kat değişimi ise doğru orantılı olarak büyümede etkisi görece daha az olan esansiyel olmayan genlere göre daha belirgin bir düşüş gösterir.

Bu tez çalışmasında kullanılan genom çapında CRISPRi kütüphanesinin güvenilirliği literatürde incelenen referans çalışmalarda yapıldığı gibi diğer esansiyel gen veri setleri ile karşılaştırılarak esansiyel gen tahmini yeteneğine göre test edilmiştir [9]–[11]. Antibiyotiklere adaptasyon kazanarak genotipi değişen MT LCE-75 hücrelerinden oluşturulan veri seti bu analizde kullanılmamıştır. Kontrol amacıyla deney gruplarına dahil edilen antibiyotiklerle muamele edilmeyen yabanıl tip LCE-75 hücrelerinin veri setleri işlenmiştir. Veri setinde yer alan 3905 gen için hesaplanan kat değişim değeri, literatürde yer alan deneysel olarak doğruluğu kanıtlanmış esansiyel gen veri setleri ile ikili sınıflandırma yapılarak ROC analizi ile karşılaştırılmıştır. Grafiğin altında kalan alan (AUC) değeri hesaplanarak yorumlanmıştır. YT deney gruplarından elde edilen veri setinin TraDis ile karşılaştırılması sonucu eğrinin altında kalan alan 0.9096; EcoGene ile karşılaştırılması sonucu ise 0.8877 değerini vermiştir. Bu alanın büyüklüğü veri setinin esansiyel genleri ayırma yeteneğinin oldukça iyi olduğunu ifade eder [70]. Veri setine ve uygulanan metotlara güvenilerek analizler sürdürülmüştür. Tradis ve EcoGene veri setleri ile karşılaştırılarak YT deney gruplarının esansiyel gen tahminini gösteren ROC grafikleri Şekil 4.11 ve 4.12'de yer almaktadır.



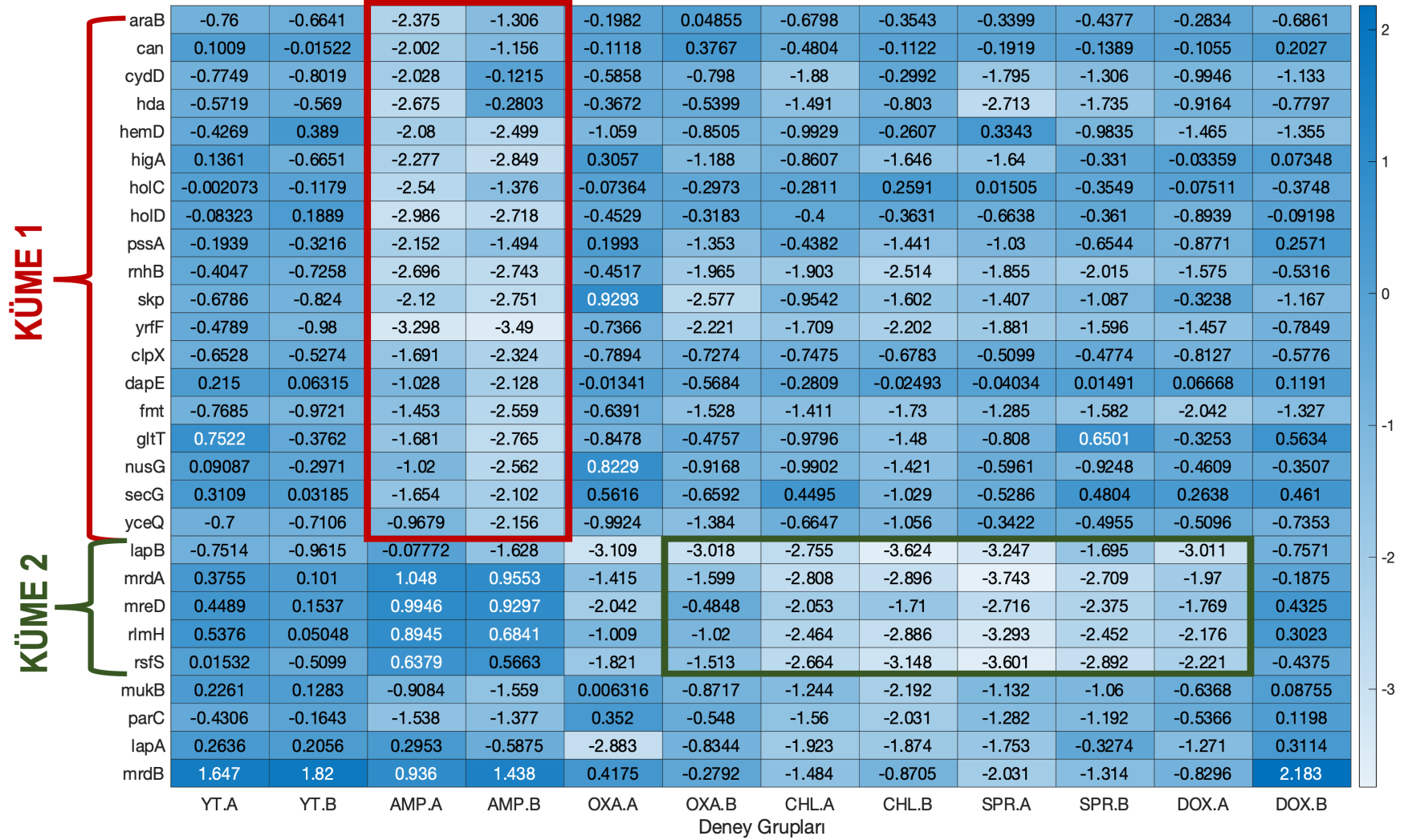
Şekil 4. 11 Yabancıl Tip deney gruplarından elde edilen veri setinin EcoGene veri setiyle karşılaştırılması sonucunun ROC grafiği ile gösterimi.



Şekil 4. 12 Yabancı Tip deney gruplarından elde edilen veri setinin Tradis veri setiyle karşılaştırılması sonucunun ROC grafiği ile gösterimi.

4.1.5 Adaptasyondan Sonra Önemi Artan Genler

Her bir deney grubu için hesaplanan kat değişimi değerlerinin filtre edilmesiyle adaptasyondan sonra önemi artan genler belirlenmiştir. Bu genlerin kat değişimini gösteren sıcaklık grafiği Şekil 4.13'te gösterilmiştir.



Şekil 4. 13 Adaptasyondan sonra önemi artan genlerin deney gruplarına göre değişimini gösteren sıcaklık grafiği.

Adaptasyondan sonra önemi artan genlerin belirlenmesi için, veri setinde YT grupta -1'den daha büyük ve MT grupta -2'den daha küçük kat değişim değerlerine sahip olması gerektiği kabul edilmiştir. Belirlenen -2 kat değişim değeri, CRISPRi kütüphanesini tasarlayan araştırmacıların belirlediği esansiyel gen tespiti için belirlenen eşik değeridir [10]. Ek olarak, Metot 3.2.6'da veri setinin doğruluğunu test etmek üzere yapılan ROC analizinde de doğru pozitif oranının en yüksek olduğu kat değişim değeri -2 olarak belirlenmiştir.

YT grupta -1 değerinden daha büyük olan genlerin filtre edilmesinin gerekçesi ise; sadece esansiyel olmayan genlerin seçilimi içindir. -1'den yüksek olan kat değişim değerli genlerin esansiyel olmaması beklenir. Çünkü -2'den değerinden 2 kat daha yüksektir. Şekil 4.9 ve 4.10'da görüldüğü gibi kat değişimlerinin kahir ekseriyeti -1'den yüksektir. Bu değerden yüksek kat değişimlerine sahip genlerin, esansiyel veya esansiyel olmaması ayırt edilemez. Böylelikle YT gruptaki -1'den yüksek olarak filtrelenen genlerin esansiyel olmaları beklenmez. Rakamsal olarak değerlendirildiğinde; YT grupların ortalaması alındığında -1 değerinden yüksek genler filtrelendiğinde; bu liste içindeki esansiyel genlerin bütün genlere oranı % 2.2'dir (Yanlış İhmal Oranı (FOR)). Böylece adaptasyondan sonra YT hücrelerde büyüme kusurlarına sebep olmayan; fakat MT hücrelerde düşük kat değişimi vererek yüksek büyüme kusuru gösteren genler seçilmiştir.

Her bir deney grubunda en düşük kat değişimi gösteren genler Tablo 4.4'te gösterilmiştir. Ancak, doksisisikline direnç kazandırılan B hücre hattında -2'den daha düşük herhangi bir tespit edilmemiştir.

Tablo 4. 4 Her bir deney grubunda en düşük kat değişimi gösteren genler.

Deney Grubu	Gen	Kat Değişimi
AMP.A	yrfF	-3.298
AMP.B	yrfF	-3.49
CHL.A	mrdA	-2.808
CHL.B	lapB	-3.624

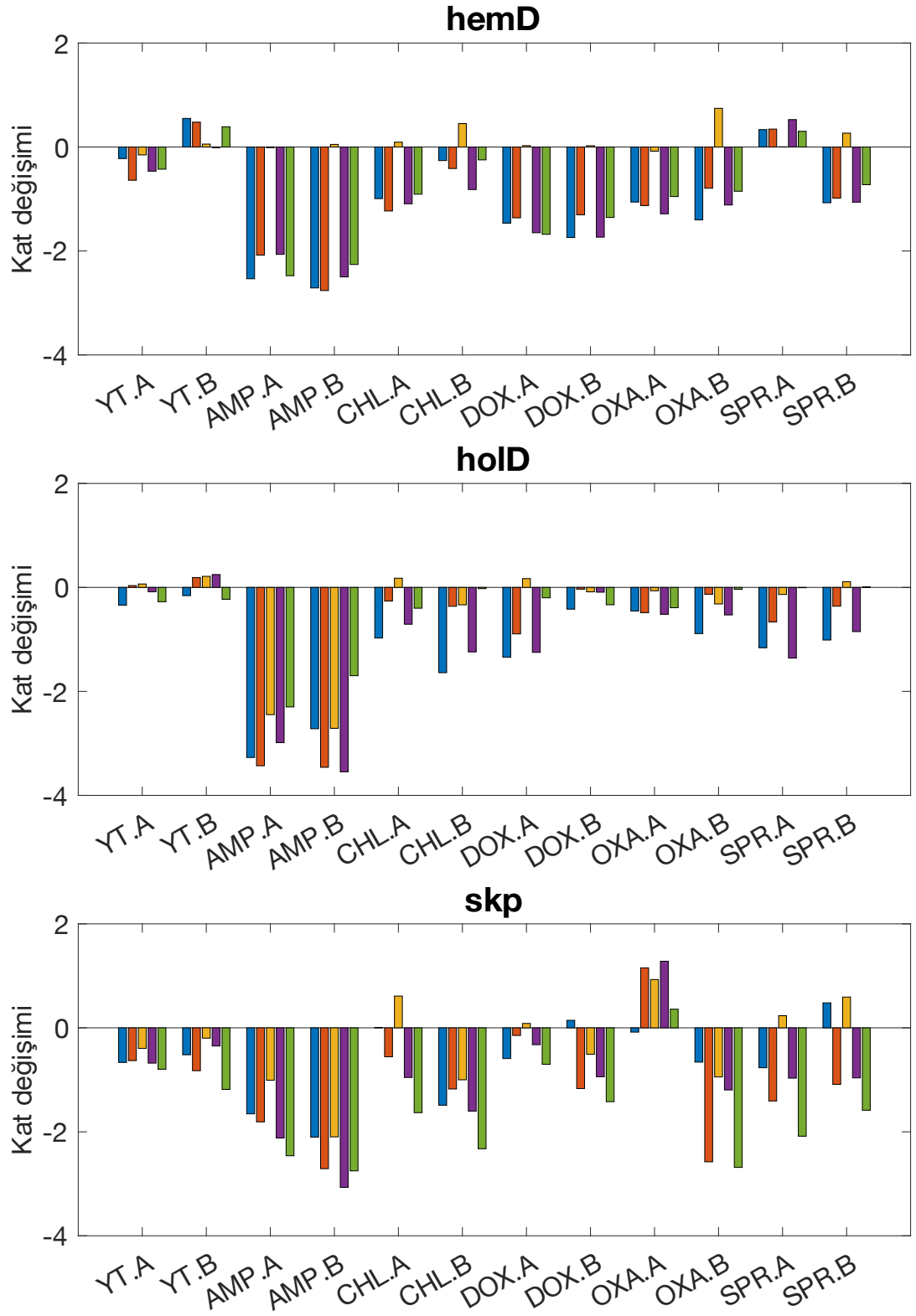
Tablo 4. 4 Her bir deney grubunda en düşük kat değişimi gösteren genler
(devamı).

DOX.A	lapB	-3.011
DOX.B	-	-
OXA.A	lapB	-3.109
OXA.B	lapB	-3.018
SPR.A	mrda	-3.743
SPR.B	rsfS	-2.892

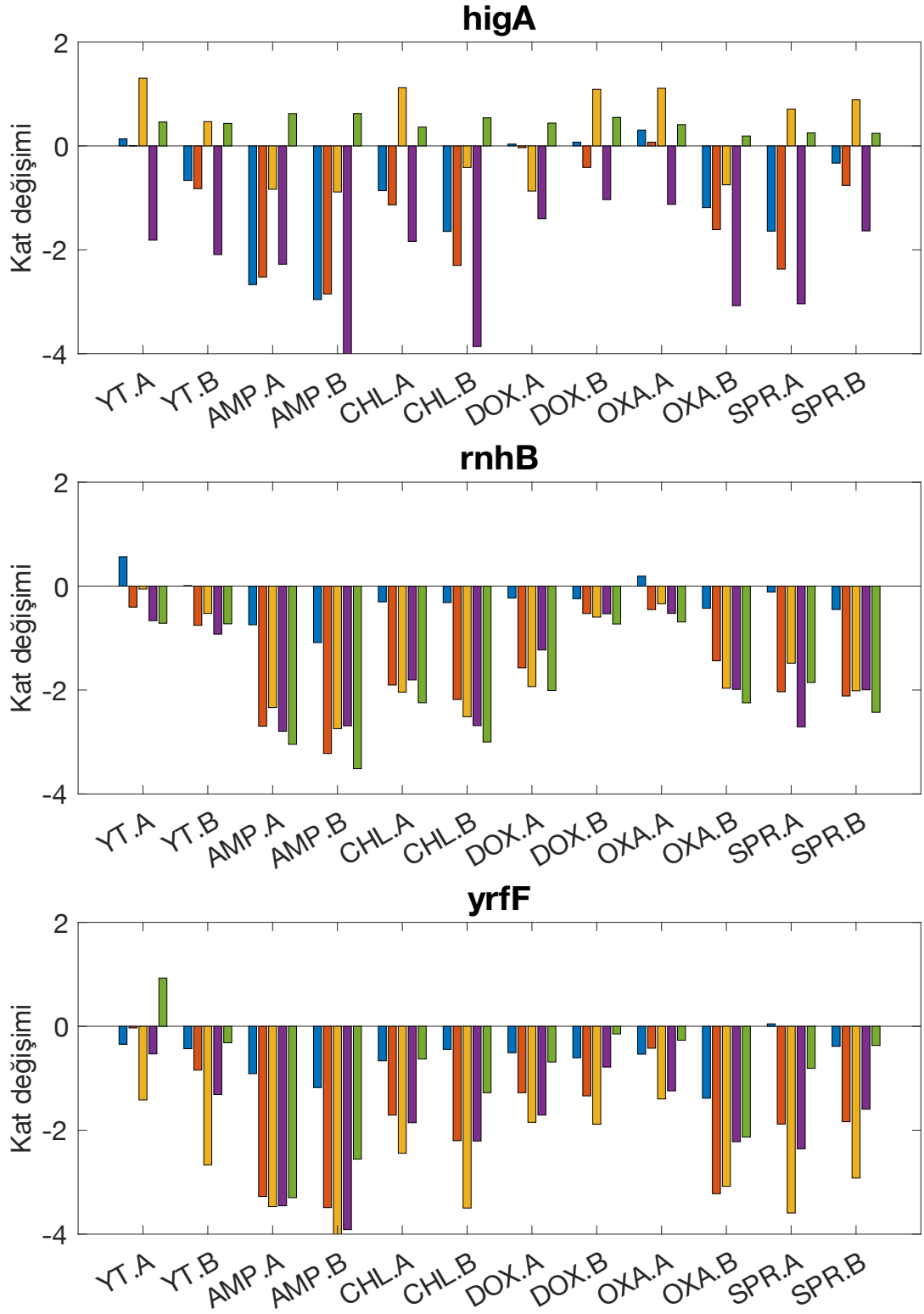
şekil 4.13'te yer alan sıcaklık grafiği incelendiğinde; ampsiline dirençli hale getirilen A ve B deney gruplarındaki (AMP.A, AMP.B) genlerin diğer gruplara kıyasla ayrıştığı gözlemlenmiştir. Bu iki grupta toplam 19 genin kat değişim değeri -2'den az olarak ölçülmüştür. A ve B deney grubunda 6 gen (hemD, higA, holD, rnhB, skp, yrfF) ortaktır. araB, can, cydD, hda, holC ve pssA sadece AMP.A grubunda önem kazanan genlerdir. clpX, dapE, fmt, gltT, nusG, secG ve yceQ olan 7 gen ise AMP.B grubundadır. Bu 19 gen Küme 1-Ortak, Küme 1-AMP.A ve Küme 1-AMP.B olarak üç alt kümeye daha bölünmüştür. Bu kümelerde yer alan genlerin fonksiyonları Tablo 4.5, 4.6 ve 4.7'de listelenmiştir. Tanımlanan 3 alt kümede yer alan genleri hedefleyen 5 sgRNA için ölçülen kat değişim değerleri şekil 4.14, 4.15 ve 4.16'da yer almaktadır.

Tablo 4. 5 Küme-1 Ortak grubunda yer alan genler ve fonksiyonları.

GEN	FONKSİYON	REF.	AMP.A	AMP.B
hemD	Üroporpihirinojen-III-sentaz kodlar, tetra pirol biyosentezinde görevlidir.	Alwan vd., 1989	X	X
higA	Ribozom bağımlı mRNA interferaz toksini HigB'nin antitoksinini kodlar, çevresel stresle indüklenir.	Christensen-Dalsgaard vd., 2010	X	X
holD	DNA polimeraz- III ψ alt ünitesini kodlar.	Xiao vd., 1993	X	X
rnhB	RNA-DNA etkileşimlerini düzenleyen RNAaz HIII proteini kodlamaktadır.	Hussein vd., 2018	X	X
yrfF	RCs Sinyal Transdüksiyon Sistemini inhibe eden iç membran proteinidir, envelop stresıyla ilişkilidir.	McDonald vd., 2012	X	X
skp	Periplazmik şaperon proteinidir ve dış membran biyogenezinde işlev görür.	de Cock vd., 1999	X	X



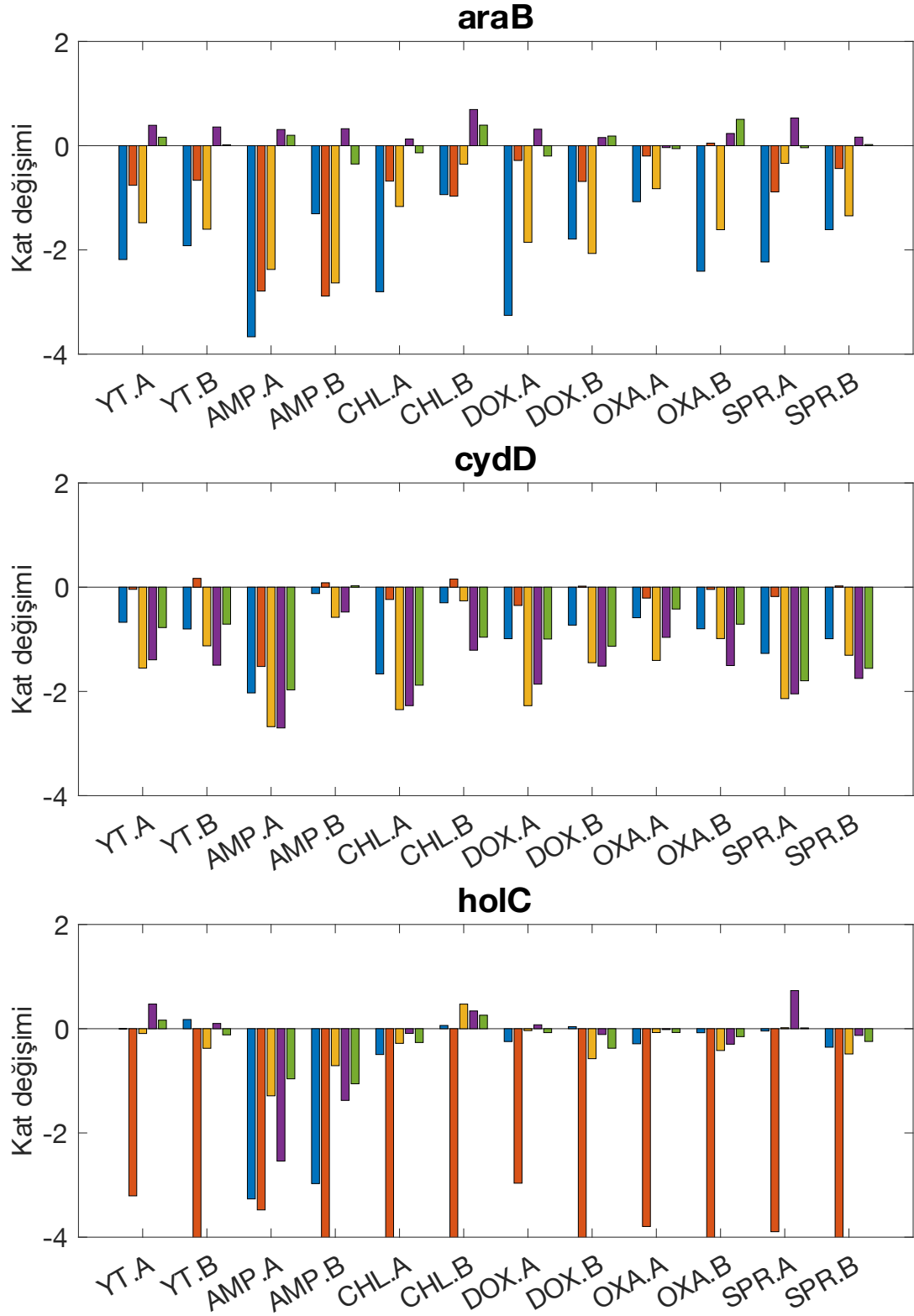
Şekil 4. 14 Küme-1 Ortak grubunda yer alan genleri hedefleyen 5 sgRNA'nın kat değışimi.



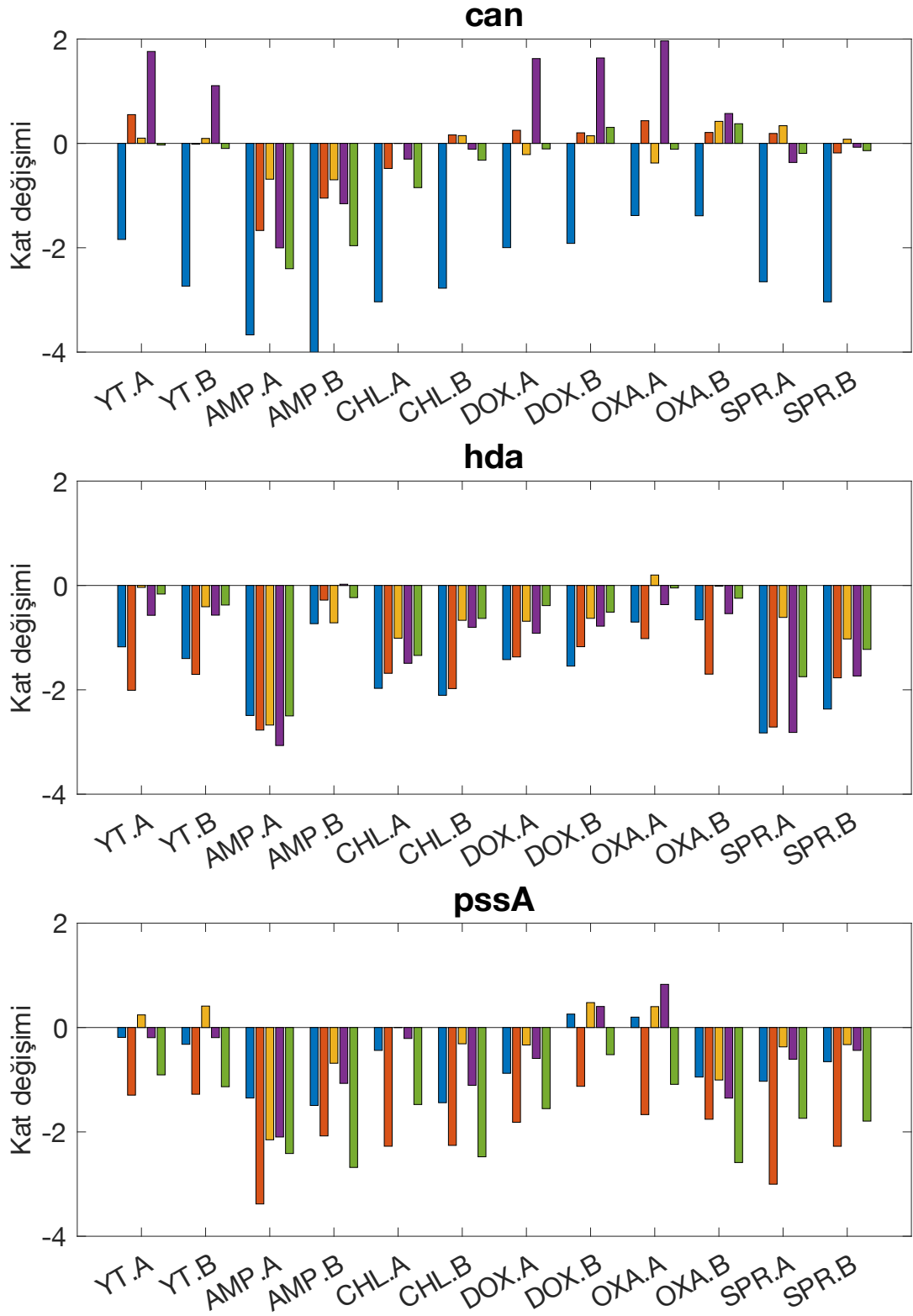
Şekil 4. 14 Küme-1 Ortak grubunda yer alan genleri hedefleyen 5 sgRNA'nın kat değişimi (devamı).

Tablo 4. 6 Küme 1-AMP.A grubunda yer alan genler ve fonksiyonları.

GEN	FONKSİYON	REF.	AMP.A	AMP.B
araB	L-arabinoz degradasyonunda görevlidir.	Reeder & Schleif, 1991	X	
can	Karbonik anhidraz2 enzimini kodlar ve pCO ₂ 'de büyüme için gereklidir.	Hashimoto & Kato, 2003	X	
cydD	L-sistein ve glutatyon transportudur, oksijenli solunumda sitokrom c kompleksinin birleşiminde etkilidir.	Poole vd., 1993	X	
hda	DNA replikasyonu tekrar başlatma inhibitörüdür, hücre bölünme döngüsünü kontrol eder.	Kato & Katayama, 2001	X	
holC	DNA polimeraz- III x alt ünitesini kodlar, replikasyon kompleksinin parçasıdır.	Nonaka vd., 2006	X	
pssA	Fosfotidil serin sentaz kodlar, fosfolipid biyosentezinde yer alan bazı enzimler etkileşime girer.	Salamon vd., 2000	X	



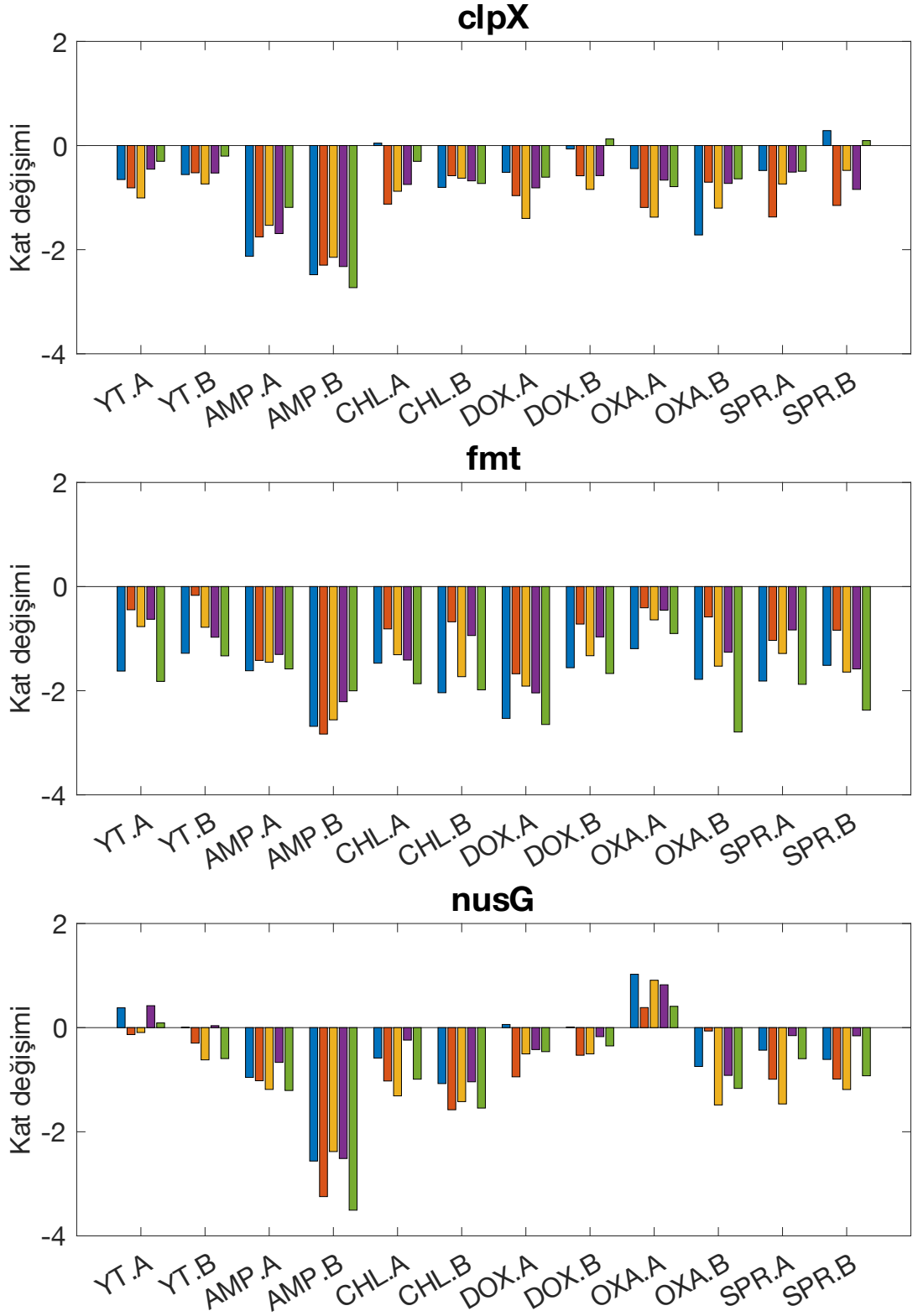
Şekil 4. 15 Küme 1-AMP.A grubunda yer alan genleri hedefleyen 5 sgRNA'nın kat değışimi.



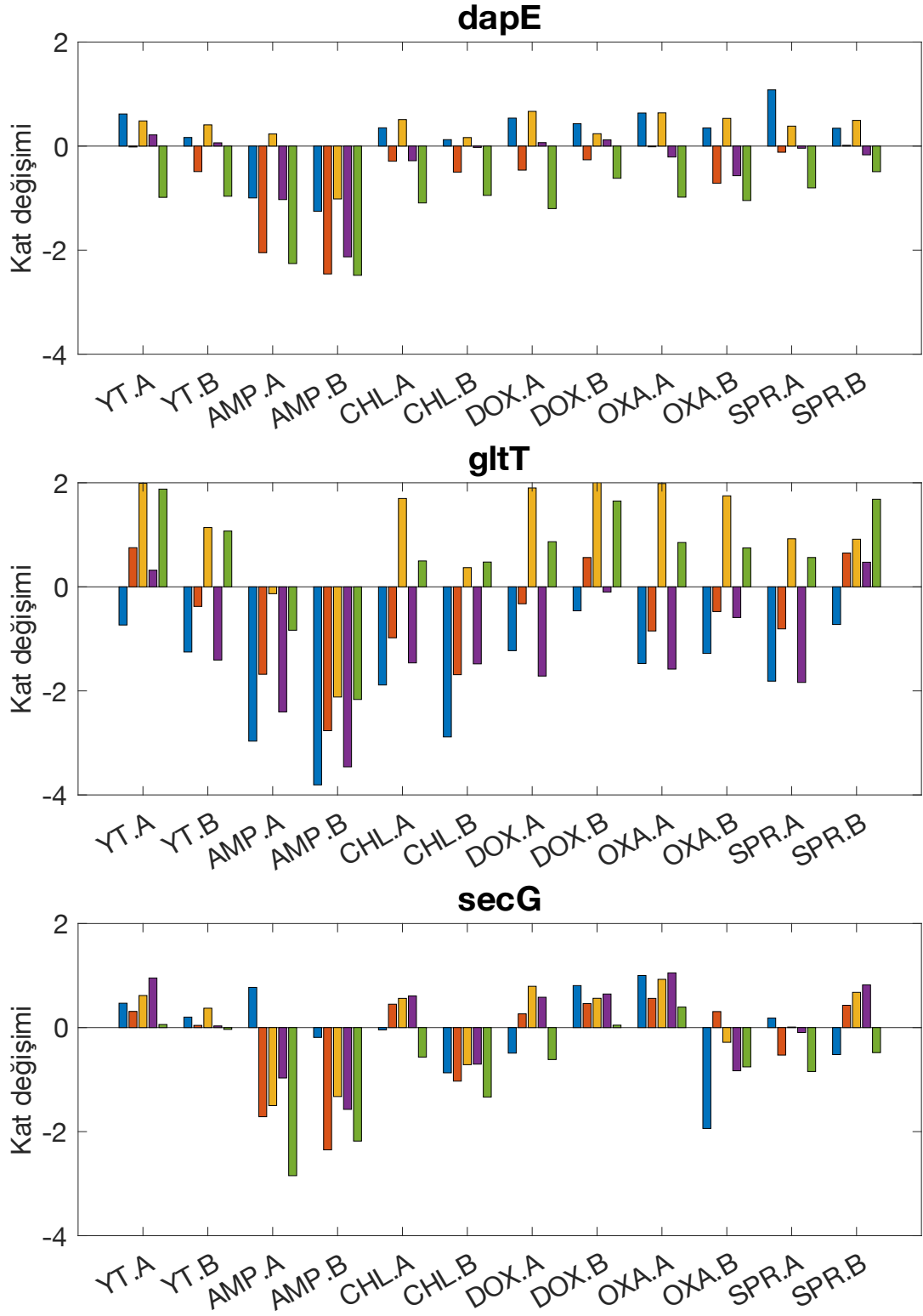
Şekil 4. 15 Küme 1-AMP.A grubunda yer alan genleri hedefleyen 5 sgRNA'nın kat değışimi (devamı).

Tablo 4. 7 Küme 1-AMP.B grubunda yer alan genler ve fonksiyonları.

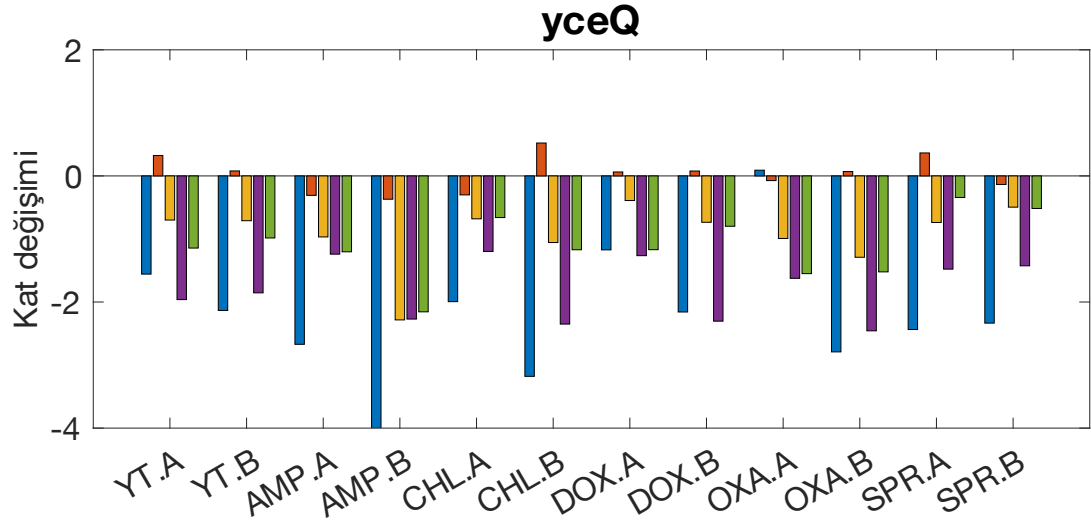
GEN	FONKSİYON	REF.	AMP.A	AMP.B
clpX	ClpXP ve ClpAXP proteaz komplekslerinde görevlidir.	Singh vd., 2001		X
dapE	Süksinil-diaminopimelat desüksinilaz kodlar ve lizin biyosentezinde yer alır.	Du & Lutkenhaus, 2017		X
fmt	L-metiyonil-tRNA(fMet)N-formiltransferaz kodlar.	KAHN vd., 1980		X
gltT	A-Glu(UUC) kodlayan tRNA'dır..	Paul vd., 2004		X
nusG	Rho-bağımlı terminasyon ve antiterminasyonda görevlidir.	Sullivan & Gottesman, 1992		X
secG	SecYEG preprotein translokazının bir bileşenidir, protein eksportunda görevlidir.	Bost & Belin, 1995		X
yceQ	DUF2655 domain içeren protein, fonksiyonu belirlenmemiştir.	Keseler vd., 2021		X



Şekil 4. 16 Küme 1-AMP.B grubunda yer alan genleri hedefleyen 5 sgRNA'nın kat değışimi.



Şekil 4. 16 Küme 1-AMP.B grubunda yer alan genleri hedefleyen 5 sgRNA'nın kat değışimi (devamı).

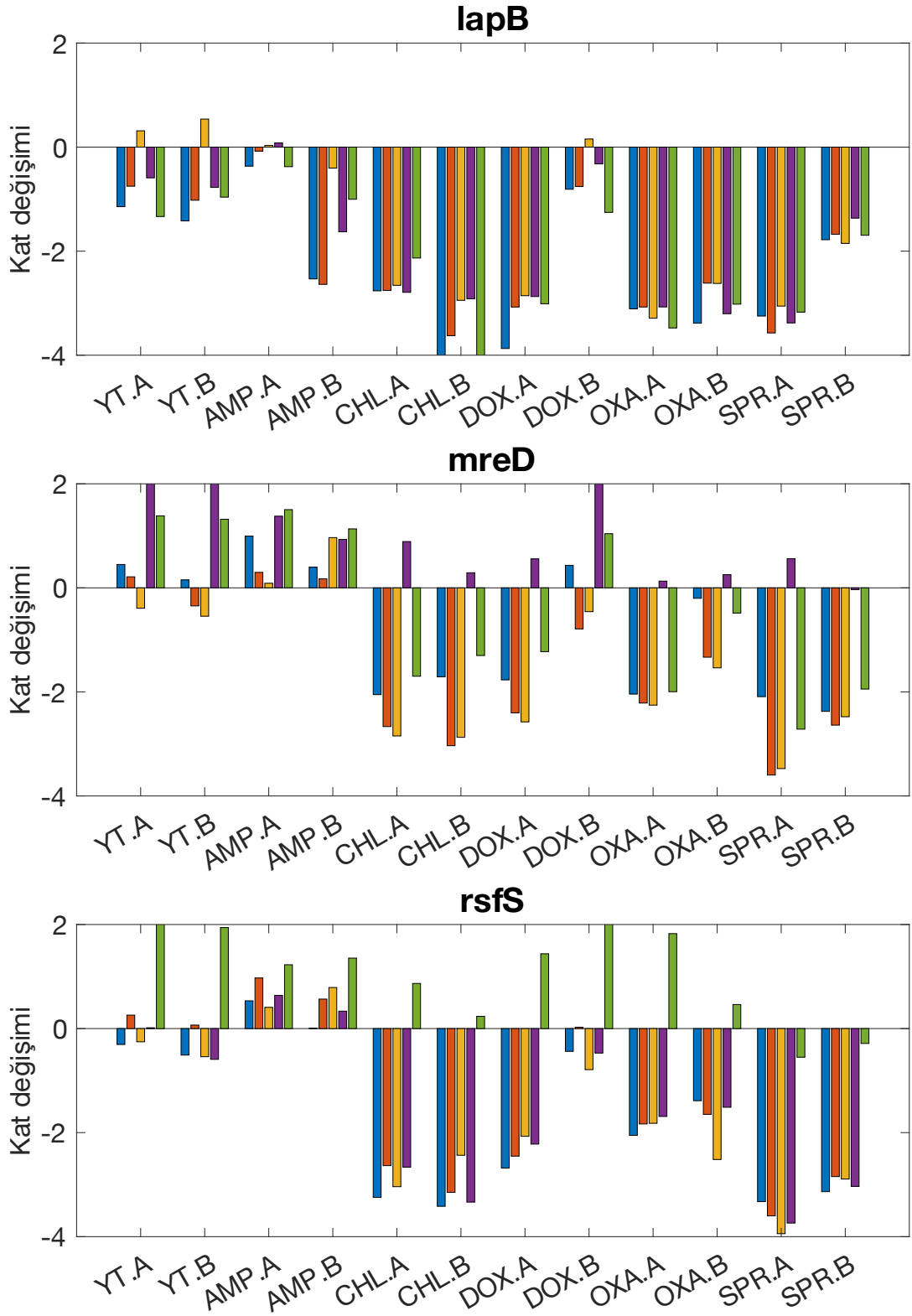


Şekil 4. 16 Küme 1-AMP.B grubunda yer alan genleri hedefleyen 5 sgRNA'nın kat değışimi (devamı).

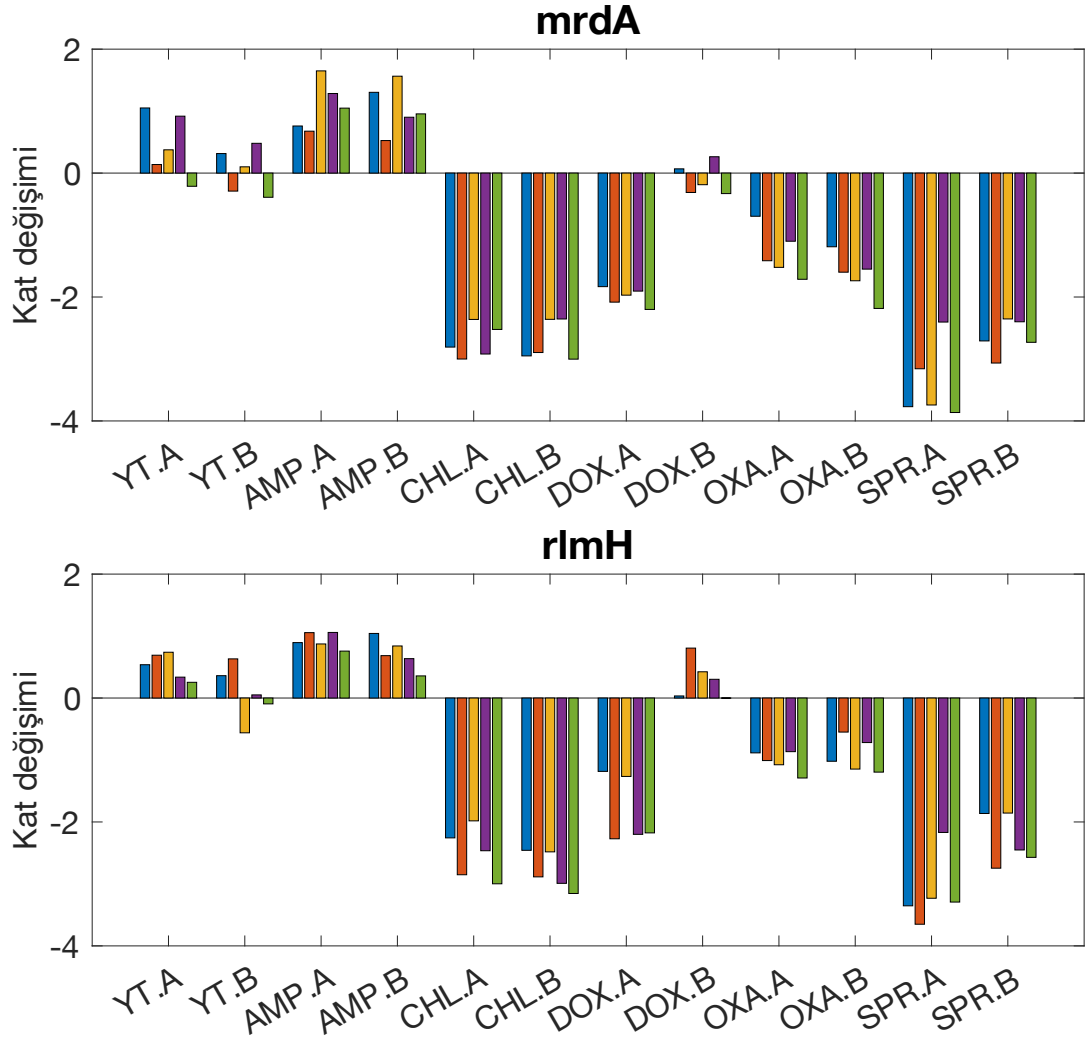
Ampisilin harici diğerk antibiyotiklere direnç kazandırılan kloramfenikol, doksisisiklin, oksasilin ve spiramisin hücrelerinde 5 genin ortaklaşarak (lapB, mrda, mreD, rlmH, rsfS) ayrı bir küme oluşturduğı tespit edilmiştir. Bu genlerin tümü Küme 2 olarak tanımlanmıştır ve Tablo 4.8'de ilişkili oldukları fonksiyonlar listelenmiştir. Şekil 4.17'de bu genleri hedefleyen 5 sgRNA için hesaplanan kat değışim değerklerinin gruplar arasındaki değışimi gösterilmiştir.

GEN	FONKSİYON	REF.	CHL.A	CHL.B	SPR.A	SPR.B	OXA.A	OXA.B	DOX.A
lapB	LPS birleşme proteindir, lapA ile membran proteinlerinin homeostazını regüle eder.	Klein vd., 2014	X	X	X		X	X	X
mrda	PBP2'yi kodlar. mrdb ile birleşerek peptidoglikan sentezini gerçekleştirir.	Rohs vd., 2018	X	X	X	X			
mreD	Hücre şeklinin oluşumunda görevlidir ve inhibisyonuyla hücre küresel hale gelir.	Häuser vd., 2012	X		X	X	X		
rlmH	23S rRNA metiltransferaz kodlar. Ribozomla 23S rRNA'nın etkileşimini sağlar.	Ero vd., 2008	X	X	X	X			X
rsfS	Ribozomal susturma faktörüdür. Ribozomal alt ünitelerin birleşmesini engeller	Häuser vd., 2012	X	X	X	X		X	

Tablo 4. 8 Küme 2 grubunda yer alan genler ve işlevleri.



Şekil 4. 17 Küme 2 grubunda yer alan genleri hedefleyen 5 sgRNA'nın kat değişimi.

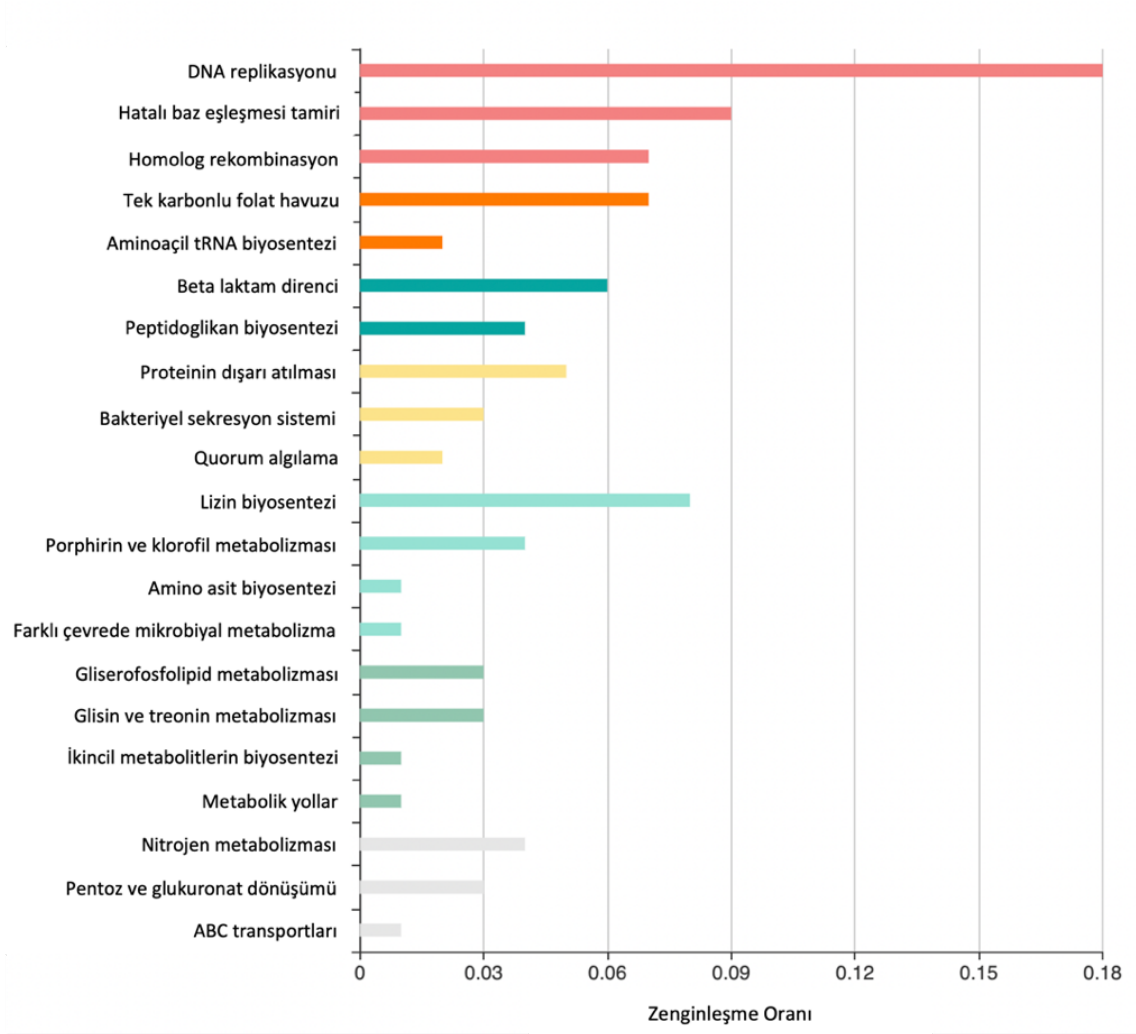


Şekil 4. 17 Küme 2 grubunda yer alan genleri hedefleyen 5 sgRNA'nın kat değışimi (devamı).

Yabanıl tip hücrelerde büyümeye fazla etki etmeyerek daha yüksek kat değışim değeriyle ayırt edilen genler, antibiyotiklere adaptasyon kazandıran hücrelerde daha düşük kat değışim değeri göstererek hücre büyümesinde önemli derecede azalmaya sebebiyet vermiştir. Bu genlerden *dapE*, *fmt*, *hemD*, *yrfF* (*igaA*), *mrdA*, *mrdB*, *mukB*, *parC* ve *pssA*; toplamda 9 tanesi *E. coli* esansiyel gen veri setlerinde zorunlu esansiyel olarak tanımlanmıştır [50], [52] . Diğer birçok genin esansiyel olup olmadığı araştırmalar arasında değışiklik göstermekte; bu nedenle şarta bağı esansiyel olarak sınıflandırılmaktadırlar [71]. *araB*, *clpX*, *gltT*, *secG*, *skp* ve *rfsS*'nin de inhibisyonu halinde hücre büyümesinde herhangi bir değışiklik olmadığı belirlenmiştir, bu yüzden esansiyel olmayan genler sınıfında yer

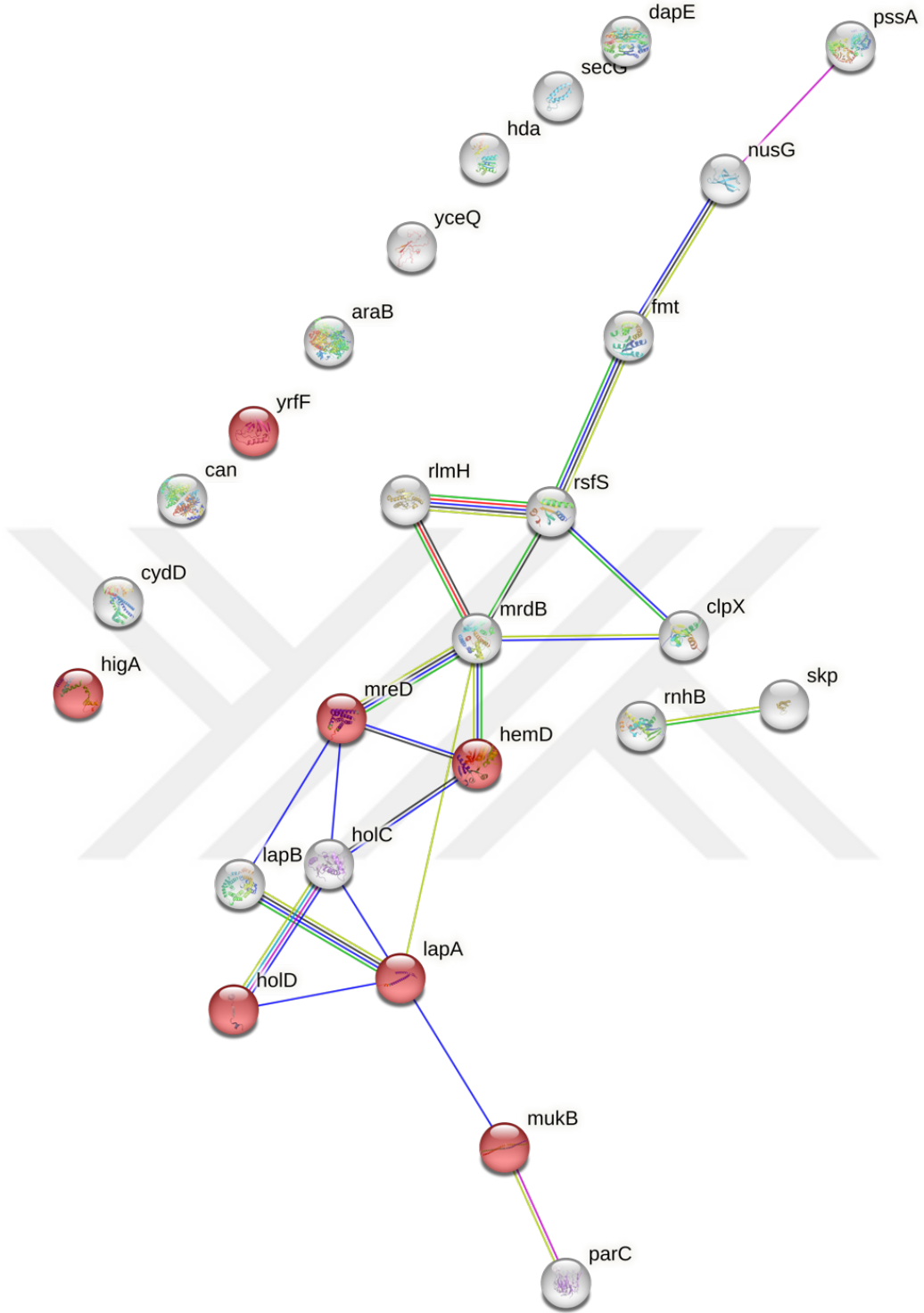
almaktadırlar [50], [52]. Ancak bu genler farklı antibiyotiklere dirençli *E. coli* hücrelerinde düşük kat değişimi göstererek yüksek derecede hücre büyümesine etki göstermiştir. Yabancıl tip hücrelerde aynı etki görülmediği için bu genlerin adaptasyondan sonra daha önemli hale geldiği sonucu çıkarılmıştır.

Elde edilen bu 28 genin görev aldıkları metabolizma yolları ve ilişkili fonksiyonlarda ortaklaşma olup olmadığı bakterilerin adaptasyon esnasında değiştirdiği hücresel davranışları anlamak için önemlidir. Bu amaçla KOBAS çevrimiçi aracı kullanılarak ortaya çıkarılan genlerin zenginleşme analizi yapılmıştır [73]. Sonuçta en çok zenginleşen hücresel faaliyetler sırasıyla; DNA replikasyonu, lizin biyosentezi, yanlış eşleşme tamiri, homolog rekombinasyon, folat aracılı tek karbon havuzu ve peptidoglikan biyosentezi olmuştur. DNA replikasyonu ile doğrudan bağlantılı olan *holC*, *holD* ve *rnhB* genlerinin varlığı en çok zenginleşen hücresel yolun DNA replikasyonu olmasını sağlamıştır. Şekil 4.18'de KOBAS-I analizi sonucu gösterilmiştir.



Şekil 4. 18 Adaptasyondan sonra önem kazanan genlerin zenginleşme analizi ($p < 0.05$).

Antibiyotiklere adaptasyondan sonra önemi arttığı tespit edilen genlerin birbiriyle kurdukları fiziksel ve genetik interaksiyonlar STRING çevrim içi aracında analiz edilmiştir [72]. Her bir gen ile benzer yollarda işlev gören genler arasındaki interaksiyon ağı deneysel ve informatik yöntemlerle belirlenmiştir. Şekil 4.19'da STRING analizi sonucu gösterilmiştir. Bu genlerden ydD, yceQ, dapE, hda, araB, can, higA, secG ve yrfF genlerinin diğer genlerle ilişkisi bulunmadığı tespit edilmiştir. Güçlü interaksiyon ağı kuran genler ise DNA replikasyonu ile ilişkili holC, holD ve rnhB genleri (FDR 0.02) olmuştur. Kırmızı ile renklendirilen genlerin yakın zamanlı bir çalışmada antimikrobiyal hedef olma potansiyeli tespit edilmiştir [77].



Şekil 4. 19 Adaptasyondan sonra önem seviyesi artan genlerin interaksiyon ağı (FDR < 0.02).

4.2 Sonuç ve Öneriler

Bu tez çalışmasında; farklı antibiyotiklere ALE deneyleri yapılan *E. coli* bakterisinde CRISPRi tarama kullanılarak önemi artan genler saptanmıştır. Araştırmanın hipotezi; genom çapında CRISPRi tarama protokolünün antibiyotiklere dirençli bakterilerde uygulanması ile, adaptasyondan sonra hücre için daha önemli hale gelen genlerin belirlenebileceği fikrinden yola çıkılarak oluşturulmuştur.

Sonuçta toplam 28 genin adaptasyondan sonra hücre büyümesi için daha önemli hale geldiği belirlenmiştir. Özel olarak 4 gen; *yrff*, *mrda*, *lapB* ve *rsfS* en düşük kat değişim değerini göstermiştir.

lapB farklı deney gruplarında önemli hale gelmesi sebebiyle özel bir ilgi çekmiştir. Bu gen 4 deney grubunda en düşük; ek olarak 2 deney grubunda da -2'den az kat değişim değerini vermiştir. *lapB*, hücre duvarındaki lipopolisakkarit seviyelerini *LpxC* regülasyonu ile ayarlayan ve lipid A biyosentezini sağlayan bir gendir [78]. *LapA* proteini ile aktivitesi, lipopolisakkarit birleşimi ve yerleşimini sağlar [79]. Ayrıca; ALE deneyleri sonrasında bu gende tespit edilen *LapB_{E3K}* mutasyonunun kolistin varlığında bakteriyel uyuma katkı sağladığı tespit edilmiştir [80]. Literatür ve elde ettiğimiz deneysel verilere göre; *lapB*, bakterinin direnç kazanmasını sağlarken bakterinin bu gene olan bağımlılığı artmıştır. Elde edilen verilerde *lapA* geninin OXA.A deney grubunda da önemli hale geldiği tespit edilmiştir. Direnç sağlayıcı etkisi, bakterinin bu gene bağımlılığının artması ve dirençli birçok grupta en düşük kat değişim değerini vermesi *lapB*'nin dirençli bakterilerde son derece özgün bir antibiyotik hedefi olma potansiyelini ortaya koyar. Nitekim, 2021 yılında yapılan *in silico* bir çalışmada; *lapB*'nin hücre fonksiyonuna yardımcı olan *lapA* geninin antimikrobiyal ilaç hedefi olduğu belirlenmiştir [77].

yrff, iç zar proteinidir [81]. Bu genin aktivitesi doğrudan hücre çeperi stresiyle ilişkilidir ve peptidoglikan bozunmasına yanıt olarak oto-fosforilasyon reaksiyonlarını tetikler [82]. Elde edilen verilerde ampiciline dirençli iki hücre hattında da en düşük kat değişim değerini verdiği tespit edilmiştir. *yrff* geninin baskılanması Rcs (Kapsüler Sentez Düzenleyici) Sinyal Transdüksiyon Sistemini aktif hale getirir. Bu sistem de Çeper Stres Yanıt Sistemini (ESRS) etkinleştirerek

hücre çeperinde oluşan hasarların tamirini sağlar [81]. *yrff*'nin ampicilin gibi peptidoglikan tabakasını hedefleyen ilaçlara karşı direnç yollarında yer alması beklenen bir sonuçtur. Fakat bu genin hangi yollarla hücreyi aktivitesine daha bağımlı hale getirdiği çalışılmaya değer bulunmuştur.

mrda, kloramfenikol ve spiramisine dirençli deney gruplarında en düşük kat değişim değerini vermiştir. Bu gen peptidoglikan sentezinde görevlidir [79]. Ampicilinin hedefi olan PBP2'yi sentezler [83]. Fakat elde edilen verilerde ampiciline dirençli deney gruplarında bu genin önemi artmamıştır. Aksine, diğer 4 grupta (CHL.A, CHL.B, SPR.A, SPR.B) önemli hale gelmesi ve bu grupların peptidoglikan sentezini hedeflemiyor olması *mrda*'nın kendi hücreSEL fonksiyonuyla ilintili olabilir. *mrda*, hücrenin çubuk formu ya da küresel formunu almasında etkili olduğu için; hücre şeklinin dirençli bakterideki durumu ve regülasyonu bu geni önemli hale getirmiş olabilir. Hücrelerin morfolojisini değiştirerek yuvarlak hale getirmesi ile antibiyotiklere direnç kazandığı bilinmektedir [84]. Morfolojisini değiştirmiş olan dirençli bakterilerin *mrda*'ya daha bağımlı hale gelmesi mümkün olabilir.

rsfS geni, SPR.B'de en düşük kat değişim değerini vermiştir. Bu gen 30S ve 50S alt ünitelerin birleşmesini engeller ve translasyonu inhibe eder. İnaktivasyonu halinde; hücre, besinin zayıf olduğu büyüme koşullarına yavaş uyum sağlar. Durağan fazda ise hücre canlılığı olumsuz etkilenir [85]. Önemli olarak *rsfS*'nin hücreSEL fonksiyonu ve bakteriyel metabolizma ilişkili olabilir. Bakteriyel metabolizmanın azaltılması direnç kazanma yollarından biridir [86]. Bir bütün olarak, bakteri zengin besin ortamına tekrar uyum sağlayamadan bu genin inhibisyonu sonucu ribozomun aşırı aktive olması ve bakterinin aminoasit dengesinin kayması gerçekleşmiş olabilir.

En çok göze çarpan genleri anlamlandırdıktan sonra; belirlenen diğer genlerin fonksiyonları ve adaptasyon sonra hücre büyümesindeki etkileri kümeler halinde tartışılacaktır. Bu amaçla 2 farklı Küme tanımlanmıştır. Toplamda 19 genin yer aldığı Küme 1 ise 3 alt kümeye bölünerek açıklanmıştır.

Her iki hücre hattında da ortak olarak ampiciline adaptasyondan sonra önem kazanan genler *hemD*, *higA*, *holD*, *rnhB*, *yrff* ve *skp* olarak Küme 1-Ortak

grubundadır. Tetraپیrol biyosentezinde görevli olan hemD geni hücre büyümesi için esansiyeldir [87]. Aktivitesi çok iyi çalışılmayan bu gen hem operonunda yer almaktadır. *S. aureus*'ta aminoglikozit direnciyle ilintili olarak hem operonundaki genlerde mutasyon varlığı tespit edilmiştir [88]. Bu durum *E. coli*'nin ampisiline adaptasyonu da ilişkili olabilir. Çevresel stresle indüklenen higA geni ise HigB proteinin sebep olduğu hücre ölümünü azaltıcı etkiye sahiptir [89]. Toksin-antitoksin sistemi ile biofilm oluşumunu indükleyerek antibiyotik direncinin yayılmasında ve evriminde çok önemli bir rol oynar [90]. higA'nın adaptasyondan sonra önemli hale gelmesi toksin-antitoksin sisteminin yeniden düzenlenmiş olmasıyla bağlantılı olabilir. Önemli olarak doğrudan DNA replikasyonunda görevli holD geni DNA polimeraz III kompleksinin bir parçasıdır [82]. Bu genin ampisiline adaptasyondan sonra önem kazanması hücrenin bölünme döngüsünü yeniden düzenliyor olabileceğine işaret eder. Benzer şekilde, RNAaz aktivitesiyle DNA'ya yanlış bağlanan RNA primerlerini ayıran rnhB geni, ribonükleotit ekzizyon tamiri fonksiyonuyla replikasyon sürecinde etkindir [91]. skp geni ise periplazmik şaperondur ve özellikle OmpA proteinlerinin doğru şekilde katlanmasında aktiftir ve membran biyogeneziyle ilişkilidir [92]. Bu genler ve fonksiyonları göz önünde bulundurulduğunda; peptidoglikan biyosentezini inhibe eden ampisiline dirençten sonra hücrenin membran biyogenezinin yeniden şekillendirmesi ve hücre bölünmesine devam etmek için tamir yollarını aktive etmesi muhtemeldir.

Sadece AMP.A grubunda düşük kat değişim değerleri veren 6 gen arasından cydD, hda, holC ve pssA geni ve fonksiyonları da dikkat çekicidir. cydD geni oksijenli solunumda önemli bir role sahiptir. İnhibisyonu halinde *E. coli*'yi oksidatif stres ve aminoglikozitlere duyarlı hale getirdiği tespit edilmiştir [93]. Ayrıca bu gen glutatyon transportunda görevlidir [94]. Bu genin inhibisyonu sonucu periplazmik glutatyon içeriğinin azaldığı ve CpxR ve SoxS'nin katılımıyla acrAB-tolC ekspresyonunun arttığı rapor edilmiştir [95]. Nihayetinde, cydD geni oksijenli solunumdaki kritik rolü ve antibiyotik direncinin önemli bir sürücüsü olan eflüks pompalarıyla ilişkisi sebebiyle araştırılması gereken bir diğer gendir. Önemi artan hda geni ise DNA replikasyonu başlangıcını kontrol eder [96]. Aşırı ekspresyonu halinde membran geçirgenliği ve SOS yanıtı indüklenmesini inhibe ettiği de belirlenmiştir [97]. hda, rnhB, holC ve holD genleri ile birlikte düşünüldüğünde

ampisiline adaptasyondan sonra hücrenin büyüme döngüsünü regüle ederek direnç kazandığı düşünülmektedir. Son olarak pssA geni fosfolipidlerin sentezinden sorumludur ve [98] aşırı ekspresyonun, sisomisin direncinin artmasına neden olduğu da rapor edilmiştir [99]. Glikofosfolipid biyosentezinde yer alan ve antibiyotik direnciyle doğrudan ilişkisi olan pssA geninin, hücre membranı içeriğini düzenleyerek ampisiline adaptasyondan sonra önem kazandığı düşünülmektedir.

AMP.B grubunda önemi artan genlerden clpX ve dapE'nin fonksiyonları bakteriyel hücre zarının modülasyonunda kritik birkaç role sahip olarak öne çıkmaktadır. Katlanmayan proteinlerin hidrolizi ve translokasyonunda görev alan clpX geninin *E. coli* 'nin durağan faza adaptasyonunda etkin roller üstendiği belirlenmiştir [100]. Ayrıca ekstrasitoplazmik stres yanıtını indüklemek için sigma-E'yi serbest bırakarak RseA-sigma-E yıkımının son adımlarına katılır [101]. Bu stres yanıtının ekspresyonunu düzenlediği sistemlerle antibiyotik direnciyle ilişkisi rapor edilmiştir [102]. Elde edilen veriler ve literatürdeki bilgiler değerlendirildiğinde; önemi artan clpX geni ekstrasitoplazmik stres yanıtını indükleme rolüyle bakterinin adaptasyonunu sağlamış olabilir. Esansiyel dapE geni ise glikofosfolipid metabolizmasındaki ara basamak rolüyle hücre membranı sentezinde işlev görür [103]. Z halkası oluşumunda etki göstererek de hücre bölünmesinde aktiftir [104]. Önemli olarak; dapE'nin bakteriyel membranı oluşturan temel bileşenin sentezinde ara basamakta yer alışı ve doğrudan bölünmeyle ilişkili aktivitesi, hücre zarına etki eden ampisiline karşı stres yanıtıyla bağlantılı olabilir.

Kloramfenikol, doksisisiklin, oksasilin ve spiramisin antibiyotiklerine dirençli hücre hatlarında önem kazandığı belirlenen 5 gen lapB, mrdA, mreD, rlmH ve rsfS; Küme 2 içinde ayrıca tartışılmıştır. Bu genlerden lapB, mrdA ve rsfS farklı gruplarda en düşük kat değişim değerlerini vermeleri sebebiyle yukarıda tartışılmıştır. Ayrıca, mrdA, rlmH ve rsfS genlerinin ayrı operonda yer aldığı tespit edilmiştir. Bu operonda yer alan rlmH geni, metilasyon reaksiyonu ile rRNA prosesinde yer alır [105]. Oksasiline adaptasyondan sonra önemi artmayan rlmH geni, diğer ribozomu hedefleyen tüm hücre hatlarında düşük kat değişim değerleri göstermiştir. Ribozomla 23S rRNA'nın etkileşimini sağlayan bu genin protein senteziyle ilişkili ara yolları yeniden düzenleyerek bakteriye avantaj sunuyor

olabileceği yargısına varılmıştır. Aynı operonda yer almaları sebebiyle bu genlerin gösterdiği düşük kat değişimi değerlerinin polar ve ters polar etkiyle ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Fakat; aynı operondan eksprese olan rlpA geni düşük kat değişim değerlerine sahip değildir. Aynı zamanda rlpA geni de hücre büyümesi ve morfolojisiyle ilgili fonksiyonlara sahiptir [106]. rlpA geninde de düşük kat değişim değerlerinin görülmesi beklenirken sonuçlar bu beklentiye doğrulamamıştır. Bunun nedeninin, genin ilgili operonun aşağı akış bölgesinde lokalize olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Sonuç olarak, bu operonda yer alan genlerden 3'ünün işlevi hücre şekliyle; 2'si ribozomla ilişkilidir. Ribozomal düzenlemelerin ve hücre şeklinin antibiyotik direnci için kritik olduğu bilgisi literatürde halihazırda yer almaktadır [107]. Bu operonda yer alan genlerin en düşük kat değişimi gösterenlerden olması ve hücresel fonksiyonları birlikte düşünüldüğünde; ileri analizlerin yapılarak görülen bu etkinin asıl sebebinin tespit edilmesi önemli bulunmuştur.

Küme 2'de yer alan bir diğer gen mreD'dir. Hücre zarı kompleksinin bir parçası olan mreD geni hücre şekline karar verir. PBP'lerin formasyonunu regüle eder ve inhibisyonuyla hücrenin aldığı küresel form, lizise sebep olur [108]. Yukarıda da belirtildiği üzere bakteriyel zarın formu antibiyotik direnciyle sıkı şekilde bağıntılıdır [84]. Fakat; hücre membranıyla ilişkili bu genlerin ribozomu inhibe eden antibiyotiklere adaptasyondan sonra öneminin artması dikkat çekicidir. Bu durum, bakterinin adaptasyonuna aracılık eden hücresel yolların en önemlilerinden birinin hücre zarıyla ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Farklı antibiyotiklere adaptasyondan sonra bakteri için önemli hale geldiği tespit edilen bu 28 genin interaksiyon ağı (Şekil 4.19) incelendiğinde; Küme 2'de yer alan genlerin birbirleriyle sıkı bir ilişki içinde olduğu görülmüştür. Bu kümede yer alan genlerden 3'ü aynı operonda yer almaktadır. Bu da interaksiyon seviyesini artırır. Ayrıca Küme 2'de yer alan genlerin ribozomla ve hücre şekliyle ilişkili fonksiyonları birlikte ele alındığında bir bütün olarak henüz bilinmeyen bir görev yaptıkları düşünülebilir. Bu operon bakterinin stres sonrası hücresel faaliyetlerini sürdürmesinde önemli bir rol üstleniyor olabilir.

İnteraksiyon ağında cydD, yceQ, dapE, hda, araB, can, higA, secG ve yrfF genlerinin diğer genlerle ilişkisi bulunmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.19). Önemli olarak, bu genler sadece ampisiline adaptasyondan sonra önem kazanan genlerdir. Bu sonuç, ampisiline adaptasyondan sonra bu genlerin farklı hücresel faaliyetleri yerine getirmek için bireysel genler aracılığıyla düzenlendiği veya genlerin birbiriyle uzakta olsa etkileşim kurmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Adaptasyondan sonra hücre için daha önemli hale gelen 28 genin zenginleşme analizi; en çok zenginleşen hücresel faaliyetlerin DNA replikasyonu, lizin biyosentezi, yanlış eşleşme tamiri, homolog rekombinasyon, folat aracılı tek karbon havuzu ve peptidoglikan biyosentezi olduğu tespit edilmiştir. DNA replikasyonu ve yanlış eşleşme tamirinin en çok zenginleşen yollar olması dikkat çekicidir. Literatürde bakterilerin antibiyotiklere dirençli hale gelmek için büyüme hızını azalttığı ve replikasyon döngüsünü tekrar düzenlediği bilgisi yer almaktadır [109]. Bu durum bu tez çalışmasında kullanılan Beta laktam ve protein sentezi inhibitörü antibiyotikler için de deneysel olarak ispatlanmıştır [110], [111]. Ayrıca; bakteriler, hücre hasar aldığında bölünmeyi yavaşlatarak ya da durdurarak DNA'yı tamir etmek üzere farklı stres yanıtlarını indükler [112]. Kromozomun replikasyonu ve SOS yanıtı bu düzenleyici yollar arasında en iyi bilinenlerdendir [113]. Belirlenen listede zenginleşen DNA replikasyonu ve yanlış eşleşme tamiri bu bilgileri destekler niteliktedir. Sonuç olarak; hücre antibiyotiğe dirençli hale gelirken ikilenme süresini kısaltmak ve meydana gelen hasarları tamir etmek amacıyla büyüme döngüsünü düzenliyor ve DNA'yı tamir ediyor olabilir.

Antibiyotik direnciyle mücadele için sadece dirençli bakterilerin ölmesini sağlayacak hedefler oldukça önemlidir. Dirençli bakterilerin hedeflenmesi antibiyotik direnç determinantlarının yayılmasını azaltabilir ve halihazırda duyarlı bakterileri öldürebilen antibiyotiklerin etkisini artırabilir. Literatürde direncin yayılmasını önlemek için yalnızca dirençli bakterileri hedefleyen antibiyotiklerin keşfi üzerine araştırmaların yapılması gerektiği önerilmiştir [114]. Bu tez çalışmasında farklı antibiyotiklere adaptasyondan sonra önemli hale geldiği tespit edilen genler bu hususta büyük bir potansiyel taşımaktadır. Bu genlerin CRISPRi aracılı hedeflenmesi yabancı tipte hücre büyümesini görece azaltmazken mutant

bakterilerde anlamlı derecede büyüme kusuru oluşturmıştır. Böylece bu genleri hedefleyecek çeşitli inhibitör moleküller, sadece mutant tip bakteriyi öldürerek bakteriyel direnci zayıflatabilir. Belirlenen genlerden 7'si (higA, yrfF, hemD, hold, lapA, mreD ve mukB) yakın zamanlı *in silico* bir çalışmada antimikrobiyal ilaç hedefi adayı olarak gösterilmiştir [77]. Bu genlerin patojenler arasında korunmuş dizileri, hücre içindeki konumları ve mikrobiyaya ile uyumu diğer genlerden öne çıkmalarını sağlamıştır. Bu tez çalışmasının elde ettiği veriler ışığında; adaptasyondan sonra önemi arttığı tespit edilen genler ve hedeflenebilir özelliklerini ortaya koyan yakın zamanlı çalışma birbirini tamamlayıcı niteliktedir.

Küme 1 ve 2'de incelenen bu genleri hedefleyen 5 sgRNA'nın kat değişim grafikleri incelendiğinde bazı sgRNA'ların diğerlerinden daha farklı değerler verdiği tespit edilmiştir. Bu durum sgRNA'ların genin hangi pozisyonuna tamamlayıcı oluşuyla ya da hedef dışı etkilerle ilişkili olabilir. Ayrıca yapılan analizleri de etkileyebilir. Fakat her bir gen için 5 sgRNA kullanımı ve değerlerin medyanının alınması bu etkiyi minimize etmektedir. Örneğin; 1 sgRNA diğerlerine nazaran çok düşük değerler vermesine rağmen, o geni hedefleyen 5 sgRNA arasında minimum değer olacağı için medyan değeri etkilemez. Böylelikle bu azaltıcı etkilerin varlığı yapılan analizlere olan güveni artırır. Ek olarak; bu çalışmada laboratuvar ortamında dirençli hale getirilen suşlar kullanmıştır. Elde edilen veriler klinik izolatlardaki antibiyotik direnci sürecini doğrudan modellemese de çalışmanın birden çok antibiyotikle yapılmış olması ve deney sonucunda bazı genlerin farklı gruplarda ortaklaşmış olmasından dolayı gerçeği yüksek oranda yansıttığı düşünülmektedir.

Bu tezin devam eden çalışmalarında; antibiyotiklere adaptasyondan sonra önemi arttığı tespit edilen 28 genin hücre büyümesine gösterdiği etkiyi direkt yöntemlerle ispat etmek üzere; bu genleri hedefleyen tekli sgRNA'ların transforme edileceği YT ve MT LCE-75 hücrelerinde ikiye katlanma süresi ve koloni sayımı deneyleri gerçekleştirilecektir. Ayrıca gen ifadesi seviyesinin azaldığını teyit edecek kantitatif PZR tekniğinin uygulanmasıyla da verilerin doğruluğu desteklenecektir. Ek olarak gen ifade seviyesini artıracak CRISPRa sistemi tasarımıyla ters tamamlayıcı yaklaşım uygulanarak hücre büyümesi ve genin ekspresyonu arasındaki ilişki incelenecektir. Ayrıca; gen ifadesinin azaltılması

hedeflenirken birkaç sgRNA'da pozitif kat değişim değerleri tespit edilmiştir. Bu sonucun, ileri analizler yapılarak değerlendirilmesinin de gereklidir.



-
- [1] K. Fang and H. Yang, "Advances and applications of CRISPR/Cas toolbox," *Kexue Tongbao/Chinese Science Bulletin*, vol. 65, no. 11, 2020. doi: 10.1360/TB-2019-0806.
- [2] M. Yan and J. Li, "The evolving CRISPR technology," *Protein and Cell*, vol. 10, no. 11, 2019. doi: 10.1007/s13238-019-0645-9.
- [3] M. H. Larson, L. A. Gilbert, X. Wang, W. A. Lim, J. S. Weissman, and L. S. Qi, "CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression," *Nat Protoc*, vol. 8, no. 11, pp. 2180–2196, 2013, doi: 10.1038/nprot.2013.132.
- [4] L. S. Qi *et al.*, "Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression," *Cell*, vol. 152, no. 5, pp. 1173–1183, Feb. 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.02.022.
- [5] D. Li, L. Lv, J. C. Chen, and G. Q. Chen, "Controlling microbial PHB synthesis via CRISPRi," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 101, no. 14, 2017, doi: 10.1007/s00253-017-8374-6.
- [6] C. Wang, Y. Cao, Y. Wang, L. Sun, and H. Song, "Enhancing surfactin production by using systematic CRISPRi repression to screen amino acid biosynthesis genes in *Bacillus subtilis*," *Microb Cell Fact*, vol. 18, no. 1, 2019, doi: 10.1186/s12934-019-1139-4.
- [7] J. Qu *et al.*, "Modulating pathogenesis with MOBILE-CRISPRi," *J Bacteriol*, vol. 201, no. 22, 2019, doi: 10.1128/JB.00304-19.
- [8] X. Liu *et al.*, "High-throughput CRISPRi phenotyping identifies new essential genes in *Streptococcus pneumoniae*," *Mol Syst Biol*, vol. 13, no. 5, 2017, doi: 10.15252/msb.20167449.
- [9] T. Wang *et al.*, "Pooled CRISPR interference screening enables genome-scale functional genomics study in bacteria with superior performance-net," *Nat Commun*, vol. 9, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-04899-x.
- [10] A. Calvo-Villamañán *et al.*, "On-target activity predictions enable improved CRISPR-dCas9 screens in bacteria," *Nucleic Acids Res*, vol. 48, no. 11, 2020, doi: 10.1093/NAR/GKAA294.
- [11] F. Rousset, L. Cui, E. Siouve, C. Becavin, F. Depardieu, and D. Bikard, "Genome-wide CRISPR-dCas9 screens in *E. coli* identify essential genes and phage host factors," *PLoS Genet*, vol. 14, no. 11, Nov. 2018, doi: 10.1371/journal.pgen.1007749.
- [12] V. de Bakker, X. Liu, A. M. Bravo, and J.-W. Veening, "CRISPRi-seq for genome-wide fitness quantification in bacteria," *Nat Protoc*, vol. 17, no. 2, pp. 252–281, 2022, doi: 10.1038/s41596-021-00639-6.
- [13] J. M. Peters *et al.*, "A comprehensive, CRISPR-based functional analysis of essential genes in bacteria," *Cell*, vol. 165, no. 6, pp. 1493–1506, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.05.003.

- [14] J. M. A. Blair, M. A. Webber, A. J. Baylay, D. O. Ogbolu, and L. J. V. Piddock, "Molecular mechanisms of antibiotic resistance," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 13, no. 1. Nature Publishing Group, pp. 42–51, Jan. 11, 2015. doi: 10.1038/nrmicro3380.
- [15] M. Mavrommati, A. Daskalaki, S. Papanikolaou, and G. Aggelis, "Adaptive laboratory evolution principles and applications in industrial biotechnology," *Biotechnology Advances*, vol. 54. 2022. doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107795.
- [16] R. A. LaCroix *et al.*, "Use of adaptive laboratory evolution to discover key mutations enabling rapid growth of Escherichia coli K-12 MG1655 on glucose minimal medium," *Appl Environ Microbiol*, vol. 81, no. 1, 2015, doi: 10.1128/AEM.02246-14.
- [17] T. E. Sandberg, M. J. Salazar, L. L. Weng, B. O. Palsson, and A. M. Feist, "The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology," *Metabolic Engineering*, vol. 56. Academic Press Inc., pp. 1–16, Dec. 01, 2019. doi: 10.1016/j.ymben.2019.08.004.
- [18] A. Khare, "Achilles' heel of antibiotic resistance," *Nature Microbiology*, vol. 6, no. 11. 2021. doi: 10.1038/s41564-021-00985-x.
- [19] A. Rasouly *et al.*, "Analysing the fitness cost of antibiotic resistance to identify targets for combination antimicrobials," *Nat Microbiol*, vol. 6, no. 11, 2021, doi: 10.1038/s41564-021-00973-1.
- [20] R. Barrangou and L. A. Marraffini, "CRISPR-cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity," *Molecular Cell*, vol. 54, no. 2. 2014. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.011.
- [21] K. S. Makarova *et al.*, "Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 18, no. 2. 2020. doi: 10.1038/s41579-019-0299-x.
- [22] P. M. Nussenzweig and L. A. Marraffini, "Molecular Mechanisms of CRISPR-Cas Immunity in Bacteria," *Annual Review of Genetics*, vol. 54. 2020. doi: 10.1146/annurev-genet-022120-112523.
- [23] S. B. ERDEMLİ KÖSE, Ü. SUR, A. YİRÜN, A. BALCI, B. KOÇER GÜMÜŞEL, and P. ERKEKOĞLU, "CRISPR-Cas9 Technology, Safety and Evaluation from an Ethical Perspective," *Journal of Literature Pharmacy Sciences*, vol. 9, no. 1, 2020, doi: 10.5336/pharmsci.2019-70581.
- [24] J. Cao, Q. Xiao, and Q. Yan, "The multiplexed CRISPR targeting platforms," *Drug Discovery Today: Technologies*, vol. 28. 2018. doi: 10.1016/j.ddtec.2018.01.001.
- [25] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, and E. Charpentier, "A Programmable Dual-RNA – Guided DNA Endonuclease S figs," *Science (1979)*, vol. 337, no. August, 2012.
- [26] X. Liao, X. H. Xing, and C. Zhang, "New Method for Genome-Scale Functional Genomic Study in Bacteria with Superior Performance: CRISPR

- Interference Screen,” in *Methods in Molecular Biology*, vol. 2377, 2022. doi: 10.1007/978-1-0716-1720-5_7.
- [27] H. Nishimasu *et al.*, “Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA,” *Cell*, vol. 156, no. 5, 2014, doi: 10.1016/j.cell.2014.02.001.
- [28] A. Lunge, E. Choudhary, R. Sharma, R. Gupta, and N. Agarwal, “Functional understanding of CRISPR interference: its advantages and limitations for gene silencing in bacteria,” in *Genome Engineering via CRISPR-Cas9 System*, Elsevier, 2020, pp. 199–218. doi: 10.1016/b978-0-12-818140-9.00017-9.
- [29] A. A. Dominguez, W. A. Lim, and L. S. Qi, “Beyond editing: Repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 17, no. 1, 2016. doi: 10.1038/nrm.2015.2.
- [30] F. Depardieu and D. Bikard, “Gene silencing with CRISPRi in bacteria and optimization of dCas9 expression levels,” *Methods*, vol. 172, 2020, doi: 10.1016/j.ymeth.2019.07.024.
- [31] Gilbert Luke A *et al.*, “CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes,” *Cell*, vol. 154, no. 2, 2013.
- [32] S. Ghavami and A. Pandi, “CRISPR interference and its applications,” in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, vol. 180, Elsevier B.V., 2021, pp. 123–140. doi: 10.1016/bs.pmbts.2021.01.007.
- [33] S. K. Kim, W. Seong, G. H. Han, D. H. Lee, and S. G. Lee, “CRISPR interference-guided multiplex repression of endogenous competing pathway genes for redirecting metabolic flux in *Escherichia coli*,” *Microb Cell Fact*, vol. 16, no. 1, 2017, doi: 10.1186/s12934-017-0802-x.
- [34] L. Lv, Y. L. Ren, J. C. Chen, Q. Wu, and G. Q. Chen, “Application of CRISPRi for prokaryotic metabolic engineering involving multiple genes, a case study: Controllable P(3HB-co-4HB) biosynthesis,” *Metab Eng*, vol. 29, 2015, doi: 10.1016/j.ymben.2015.03.013.
- [35] D. Bikard, W. Jiang, P. Samai, A. Hochschild, F. Zhang, and L. A. Marraffini, “Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system,” *Nucleic Acids Res*, vol. 41, no. 15, 2013, doi: 10.1093/nar/gkt520.
- [36] X. T. Li *et al.*, “TCRISPRi: Tunable and reversible, one-step control of gene expression,” *Sci Rep*, vol. 6, Dec. 2016, doi: 10.1038/srep39076.
- [37] C. D. J. Y. H. J. G. Z. J. M. C. Jason Fontana, “Regulated Expression of sgRNAs Tunes CRISPRi in *E. coli*,” *Biotechnology Journal*, vol. 13, no. 9. Wiley-VCH Verlag, Sep. 01, 2018. doi: 10.1002/biot.201800152.
- [38] T. Wang *et al.*, “Reversible gene expression control in *Yersinia pestis* by using an optimized CRISPR interference system,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 85, no. 12, 2019, doi: 10.1128/AEM.00097-19.

- [39] L. Cui, A. Vigouroux, F. Rousset, H. Varet, V. Khanna, and D. Bikard, "A CRISPRi screen in *E. coli* reveals sequence-specific toxicity of dCas9," *Nat Commun*, vol. 9, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-04209-5.
- [40] H. H. Lee, N. Ostrov, B. G. Wong, M. A. Gold, A. S. Khalil, and G. M. Church, "Functional genomics of the rapidly replicating bacterium *Vibrio natriegens* by CRISPRi," *Nature Microbiology*, vol. 4, no. 7. 2019. doi: 10.1038/s41564-019-0423-8.
- [41] S. Cho, D. Choe, E. Lee, S. C. Kim, B. Palsson, and B. K. Cho, "High-Level dCas9 Expression Induces Abnormal Cell Morphology in *Escherichia coli*," *ACS Synth Biol*, vol. 7, no. 4, 2018, doi: 10.1021/acssynbio.7b00462.
- [42] J. M. Rock *et al.*, "Programmable transcriptional repression in mycobacteria using an orthogonal CRISPR interference platform," *Nat Microbiol*, vol. 2, 2017, doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.274.
- [43] S. Zhang and C. A. Voigt, "Engineered dCas9 with reduced toxicity in bacteria: Implications for genetic circuit design," *Nucleic Acids Res*, vol. 46, no. 20, 2018, doi: 10.1093/nar/gky884.
- [44] F. Caro, N. M. Place, and J. J. Mekalanos, "Analysis of lipoprotein transport depletion in *Vibrio cholerae* using CRISPRi," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 116, no. 34, 2019, doi: 10.1073/pnas.1906158116.
- [45] B. Zhang, Z. Q. Liu, C. Liu, and Y. G. Zheng, "Application of CRISPRi in *Corynebacterium glutamicum* for shikimic acid production," *Biotechnol Lett*, vol. 38, no. 12, 2016, doi: 10.1007/s10529-016-2207-z.
- [46] B. F. Cress *et al.*, "CRISPRi-mediated metabolic engineering of *E. coli* for O-methylated anthocyanin production," *Microb Cell Fact*, vol. 16, no. 1, 2017, doi: 10.1186/s12934-016-0623-3.
- [47] T. J. de Wet, I. Gobe, M. M. Mhlana, and D. F. Warner, "CRISPRi-Seq for the Identification and Characterisation of Essential Mycobacterial Genes and Transcriptional Units," *bioRxiv*, 2018.
- [48] H. Rishi, E. Toro, H. Liu, X. Wang, L. Qi, and A. Arkin, "Systematic genome-wide querying of coding and non-coding functional elements in *E. coli* using CRISPRi," *bioRxiv*, 2020.
- [49] L. Yao *et al.*, "Pooled CRISPRi screening of the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803 for enhanced industrial phenotypes," *Nat Commun*, vol. 11, no. 1, 2020, doi: 10.1038/s41467-020-15491-7.
- [50] T. Baba *et al.*, "Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection," *Mol Syst Biol*, vol. 2, May 2006, doi: 10.1038/msb4100050.
- [51] B. M. Koo *et al.*, "Construction and Analysis of Two Genome-Scale Deletion Libraries for *Bacillus subtilis*," *Cell Syst*, vol. 4, no. 3, 2017, doi: 10.1016/j.cels.2016.12.013.
- [52] E. C. A. Goodall *et al.*, "The Essential Genome of *Escherichia coli* K-12," 2018, doi: 10.1128/mBio.02096.

- [53] C. J. Murray *et al.*, “Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis,” *The Lancet*, vol. 399, no. 10325, pp. 629–655, Feb. 2022, doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
- [54] “TÜRKİYE’DE ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ: EKONOMİK DEĞERLENDİRME VE ÖNERİLER.” [Online]. Available: www.tepav.org.tr
- [55] CDDEP, “Antimicrobial Resistance,” 2022.
- [56] F. C. Tenover, “Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria,” *American Journal of Medicine*, vol. 119, no. 6 SUPPL. 1, Jun. 2006, doi: 10.1016/j.amjmed.2006.03.011.
- [57] M. Hutchings, A. Truman, and B. Wilkinson, “Antibiotics: past, present and future,” *Curr Opin Microbiol*, vol. 51, pp. 72–80, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.mib.2019.10.008.
- [58] N. Sabtu, D. A. Enoch, and N. M. Brown, “Antibiotic resistance: What, why, where, when and how?,” *British Medical Bulletin*, vol. 116, no. 1. Oxford University Press, pp. 105–113, Dec. 01, 2015. doi: 10.1093/bmb/ldv041.
- [59] A. J. Baylay, L. J. V. Piddock, and M. A. Webber, “Molecular mechanisms of antibiotic resistance - part i,” in *Bacterial Resistance to Antibiotics: From Molecules to Man*, 2019. doi: 10.1002/9781119593522.ch1.
- [60] J. M. , Munita and C. A. Arias, “Mechanisms of Antibiotic Resistance,” *Microbiology spectrum*, 4(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015., vol. 23, no. 5, p. 472, May 2016, doi: 10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015.
- [61] A. C. Palmer *et al.*, “Delayed commitment to evolutionary fate in antibiotic resistance fitness landscapes,” *Nat Commun*, vol. 6, 2015, doi: 10.1038/ncomms8385.
- [62] B. Du *et al.*, “Adaptive laboratory evolution of escherichia coli under acid stress,” *Microbiology (United Kingdom)*, vol. 166, no. 2, 2020, doi: 10.1099/mic.0.000867.
- [63] L. J. Jahn, C. Munck, M. M. H. Ellabaan, and M. O. A. Sommer, “Adaptive laboratory evolution of antibiotic resistance using different selection regimes lead to similar phenotypes and genotypes,” *Front Microbiol*, vol. 8, no. MAY, 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.00816.
- [64] W. Jiang, P. Oikonomou, and S. Tavazoie, “Comprehensive Genome-wide Perturbations via CRISPR Adaptation Reveal Complex Genetics of Antibiotic Sensitivity,” *Cell*, vol. 180, no. 5, 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.007.
- [65] D. P. Araya, K. L. Palmer, and B. A. Duerkop, “CRISPR-based antimicrobials to obstruct antibiotic-resistant and pathogenic bacteria,” *PLoS Pathog*, vol. 17, no. 7, 2021, doi: 10.1371/journal.ppat.1009672.
- [66] E. Bier and V. Nizet, “Driving to Safety: CRISPR-Based Genetic Approaches to Reducing Antibiotic Resistance,” *Trends in Genetics*, vol. 37, no. 8. 2021. doi: 10.1016/j.tig.2021.02.007.

- [67] F. Wan, M. S. Draz, M. Gu, W. Yu, Z. Ruan, and Q. Luo, "Novel strategy to combat antibiotic resistance: a sight into the combination of crispr/cas9 and nanoparticles," *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 3. 2021. doi: 10.3390/pharmaceutics13030352.
- [68] A. N. Gray, B. M. Koo, A. L. Shiver, J. M. Peters, H. Osadnik, and C. A. Gross, "High-throughput bacterial functional genomics in the sequencing era," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 27. 2015. doi: 10.1016/j.mib.2015.07.012.
- [69] C. M. Kobras, A. K. Fenton, and S. K. Sheppard, "Next-generation microbiology: from comparative genomics to gene function," *Genome Biology*, vol. 22, no. 1. 2021. doi: 10.1186/s13059-021-02344-9.
- [70] J. Fan, S. Upadhye, and A. Worster, "Understanding receiver operating characteristic (ROC) curves," *Canadian Journal of Emergency Medicine*, vol. 8, no. 1, 2006, doi: 10.1017/S1481803500013336.
- [71] I. M. Keseler *et al.*, "The EcoCyc Database in 2021," *Front Microbiol*, vol. 12, 2021, doi: 10.3389/fmicb.2021.711077.
- [72] D. Szklarczyk *et al.*, "The STRING database in 2021: Customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets," *Nucleic Acids Res*, vol. 49, no. D1, 2021, doi: 10.1093/nar/gkaa1074.
- [73] D. Bu *et al.*, "KOBAS-i: Intelligent prioritization and exploratory visualization of biological functions for gene enrichment analysis," *Nucleic Acids Res*, vol. 49, no. W1, 2021, doi: 10.1093/nar/gkab447.
- [74] F. Abbas-Aghababazadeh, Q. Li, and B. L. Fridley, "Comparison of normalization approaches for gene expression studies completed with highthroughput sequencing," *PLoS One*, vol. 13, no. 10, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0206312.
- [75] M. I. Love, W. Huber, and S. Anders, "Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2," *Genome Biol*, vol. 15, no. 12, 2014, doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
- [76] F. Rousset and D. Bikard, "CRISPR screens in the era of microbiomes," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 57. 2020. doi: 10.1016/j.mib.2020.07.009.
- [77] F. Svanberg Frisinger, B. Jana, S. Donadio, and L. Guardabassi, "In silico prediction and prioritization of novel selective antimicrobial drug targets in escherichia coli," *Antibiotics*, vol. 10, no. 6, 2021, doi: 10.3390/antibiotics10060632.
- [78] S. Mahalakshmi, M. R. Sunayana, L. Saisree, and M. Reddy, "YciM is an essential gene required for regulation of lipopolysaccharide synthesis in Escherichia coli," *Mol Microbiol*, vol. 91, no. 1, 2014, doi: 10.1111/mmi.12452.
- [79] G. Klein, N. Kobylak, B. Lindner, A. Stupak, and S. Raina, "Assembly of lipopolysaccharide in escherichia coli requires the essential LapB heat shock

- protein,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 21, 2014, doi: 10.1074/jbc.M113.539494.
- [80] D. C. Marciano *et al.*, “Evolutionary action of mutations reveals antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli*,” *Nat Commun*, vol. 13, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-30889-1.
 - [81] N. A. Hussein, S. H. Cho, G. Laloux, R. Siam, and J. F. Collet, “Distinct domains of *Escherichia coli* IgaA connect envelope stress sensing and down-regulation of the Rcs phosphorelay across subcellular compartments,” *PLoS Genet*, vol. 14, no. 5, 2018, doi: 10.1371/journal.pgen.1007398.
 - [82] E. Wall, N. Majdalani, and S. Gottesman, “The Complex Rcs Regulatory Cascade,” *Annual Review of Microbiology*, vol. 72. 2018. doi: 10.1146/annurev-micro-090817-062640.
 - [83] P. D. A. Rohs *et al.*, “A central role for PBP2 in the activation of peptidoglycan polymerization by the bacterial cell elongation machinery,” *PLoS Genet*, vol. 14, no. 10, 2018, doi: 10.1371/journal.pgen.1007726.
 - [84] N. Ojkic, D. Serbanescu, and S. Banerjee, “Antibiotic Resistance via Bacterial Cell Shape-Shifting,” *mBio*, vol. 13, no. 3, 2022, doi: 10.1128/mbio.00659-22.
 - [85] R. Häuser *et al.*, “RsFA (YbeB) proteins are conserved ribosomal silencing factors,” *PLoS Genet*, vol. 8, no. 7, 2012, doi: 10.1371/journal.pgen.1002815.
 - [86] J. L. Martínez and F. Rojo, “Metabolic regulation of antibiotic resistance,” *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 35, no. 5. 2011. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00282.x.
 - [87] A. F. Alwan, B. I. A. Mgbeje, and P. M. Jordan, “Purification and properties of uroporphyrinogen III synthase (co-synthase) from an overproducing recombinant strain of *Escherichia coli* K-12,” *Biochemical Journal*, vol. 264, no. 2, 1989, doi: 10.1042/bj2640397.
 - [88] F. Schaaff, G. Bierbaum, N. Baumert, P. Bartmann, and H. G. Sahl, “Mutations are involved in emergence of aminoglycoside-induced small colony variants of *Staphylococcus aureus*,” *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 293, no. 6, 2003, doi: 10.1078/1438-4221-00282.
 - [89] M. Christensen-Dalsgaard, M. G. Jørgensen, and K. Gerdes, “Three new RelE-homologous mRNA interferases of *Escherichia coli* differentially induced by environmental stresses,” *Mol Microbiol*, vol. 75, no. 2, 2010, doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06969.x.
 - [90] Q. E. Yang and T. R. Walsh, “Toxin-antitoxin systems and their role in disseminating and maintaining antimicrobial resistance,” *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 41, no. 3. 2017. doi: 10.1093/femsre/fux006.
 - [91] J. P. McDonald, A. Vaisman, W. Kuban, M. F. Goodman, and R. Woodgate, “Mechanisms Employed by *Escherichia coli* to Prevent Ribonucleotide Incorporation into Genomic DNA by Pol V,” *PLoS Genet*, vol. 8, no. 11, 2012, doi: 10.1371/journal.pgen.1003030.

- [92] H. de Cock, U. Schäfer, M. Potgeter, R. Demel, M. Müller, and J. Tommassen, "Affinity of the periplasmic chaperone Skp of *Escherichia coli* for phospholipids, lipopolysaccharides and non-native outer membrane proteins. Role of Skp in the biogenesis of outer membrane protein," *Eur J Biochem*, vol. 259, no. 1–2, 1999, doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00010.x.
- [93] A. Mironov, T. Seregina, K. Shatalin, M. Nagornykh, R. Shakulov, and E. Nudler, "CydDC functions as a cytoplasmic cystine reductase to sensitize *Escherichia coli* to oxidative stress and aminoglycosides," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 117, no. 38, 2020, doi: 10.1073/pnas.2007817117.
- [94] R. K. Poole, L. Hatch, M. W. J. Cleeter, F. Gibson, G. B. Cox, and G. Wu, "Cytochrome bd biosynthesis in *Escherichia coli*: the sequences of the *cydC* and *cydD* genes suggest that they encode the components of an ABC membrane transporter," *Mol Microbiol*, vol. 10, no. 2, 1993, doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb02673.x.
- [95] Y. Song, Z. Zhou, J. Gu, J. Yang, and J. Deng, "Reducing the Periplasmic Glutathione Content Makes *Escherichia coli* Resistant to Trimethoprim and Other Antimicrobial Drugs," *Microbiol Spectr*, vol. 9, no. 3, 2021, doi: 10.1128/spectrum.00743-21.
- [96] J. I. Kato and T. Katayama, "Hda, a novel DnaA-related protein, regulates the replication cycle in *Escherichia coli*," *EMBO Journal*, vol. 20, no. 15, 2001, doi: 10.1093/emboj/20.15.4253.
- [97] T. Banack, N. Clauson, N. Ogbaa, J. Villar, D. Oliver, and W. Firshein, "Overexpression of the Hda DnaA-related protein in *Escherichia coli* inhibits multiplication, affects membrane permeability, and induces the SOS response," *J Bacteriol*, vol. 187, no. 24, 2005, doi: 10.1128/JB.187.24.8507-8510.2005.
- [98] Z. Salamon, G. Lindblom, L. Rilfors, K. Linde, and G. Tollin, "Interaction of phosphatidylserine synthase from *E. coli* with lipid bilayers: Coupled plasmon-waveguide resonance spectroscopy studies," *Biophys J*, vol. 78, no. 3, 2000, doi: 10.1016/S0006-3495(00)76693-8.
- [99] V. K. Mutalik *et al.*, "Dual-barcoded shotgun expression library sequencing for high-throughput characterization of functional traits in bacteria," *Nat Commun*, vol. 10, no. 1, 2019, doi: 10.1038/s41467-018-08177-8.
- [100] D. Weichart, N. Querfurth, M. Dreger, and R. Hengge-Aronis, "Global role for ClpP-containing proteases in stationary-phase adaptation of *Escherichia coli*," *J Bacteriol*, vol. 185, no. 1, 2003, doi: 10.1128/JB.185.1.115-125.2003.
- [101] S. K. Singh *et al.*, "Functional Domains of the ClpA and ClpX Molecular Chaperones Identified by Limited Proteolysis and Deletion Analysis," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 31, 2001, doi: 10.1074/jbc.M103489200.
- [102] E. C. Woods and S. M. McBride, "Regulation of antimicrobial resistance by extracytoplasmic function (ECF) sigma factors," *Microbes and Infection*, vol. 19, no. 4–5, 2017, doi: 10.1016/j.micinf.2017.01.007.

- [103] Y. Lin, R. Myhrman, M. L. Schrag, and M. H. Gelb, "Bacterial N-succinyl-L-diaminopimelic acid desuccinylase. Purification, partial characterization, and substrate specificity," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 263, no. 4, 1988, doi: 10.1016/s0021-9258(19)77924-1.
- [104] S. Du and J. Lutkenhaus, "The N-succinyl-L,L-diaminopimelic acid desuccinylase DapE acts through ZapB to promote septum formation in *Escherichia coli*," *Mol Microbiol*, vol. 105, no. 2, 2017, doi: 10.1111/mmi.13703.
- [105] R. Ero, L. Peil, A. Liiv, and J. Remme, "Identification of pseudouridine methyltransferase in *Escherichia coli*," *RNA*, vol. 14, no. 10, 2008, doi: 10.1261/rna.1186608.
- [106] S. Rao, G. T. Bates, C. R. Matthews, T. D. Newport, O. N. Vickery, and P. J. Stansfeld, "Characterizing Membrane Association and Periplasmic Transfer of Bacterial Lipoproteins through Molecular Dynamics Simulations," *Structure*, vol. 28, no. 4, 2020, doi: 10.1016/j.str.2020.01.012.
- [107] J. L. Martinez *et al.*, "A global view of antibiotic resistance," *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 33, no. 1. 2009. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00142.x.
- [108] M. Wachi, M. Doi, Y. Okada, and M. Matsushashi, "New mre genes mreC and mreD, responsible for formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells," *J Bacteriol*, vol. 171, no. 12, 1989, doi: 10.1128/jb.171.12.6511-6516.1989.
- [109] N. Q. Balaban, J. Merrin, R. Chait, L. Kowalik, and S. Leibler, "Bacterial persistence as a phenotypic switch," *Science (1979)*, vol. 305, no. 5690, 2004, doi: 10.1126/science.1099390.
- [110] E. Tuomanen, R. Cozens, W. Tosch, O. Zak, and A. Tomasz, "The rate of killing of *Escherichia coli* by β -lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth," *J Gen Microbiol*, vol. 132, no. 5, 1986, doi: 10.1099/00221287-132-5-1297.
- [111] P. Greulich, M. Scott, M. R. Evans, and R. J. Allen, "Growth-dependent bacterial susceptibility to ribosome-targeting antibiotics," *Mol Syst Biol*, vol. 11, no. 3, 2015, doi: 10.15252/msb.20145949.
- [112] M. H. Pontes and E. A. Groisman, "A physiological basis for nonheritable antibiotic resistance," *mBio*, vol. 11, no. 3. 2020. doi: 10.1128/mBio.00817-20.
- [113] P. E. Burby and L. A. Simmons, "Regulation of cell division in bacteria by monitoring genome integrity and DNA replication status," *Journal of Bacteriology*, vol. 202, no. 2. 2020. doi: 10.1128/JB.00408-19.
- [114] D. I. Andersson and D. Hughes, "Antibiotic resistance and its cost: Is it possible to reverse resistance?," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 8, no. 4. 2010. doi: 10.1038/nrmicro2319.

Bu tez çalışmasında kullanılan MATLAB komutları işlem sırasına göre aşağıdaki gibi verilmiştir:

```
%1.sgRNA okuma sayısı
load
mask=1:20;
maske=[];
for i=1:(20-sizeofhash+1)
    maske(i,:)=mask(i:(i+sizeofhash-1));

end

carpan=4.^[(sizeofhash-1):-1:0];
carpan= repmat(carpan,size(maske,1),1);

fclose all
file=fopen('WTA-T0_S1_L001_R1_001.fastq')
z=1;
reads=1000000000*4;
tic
MAPPED=zeros(reads/4,2,'uint16');

counts=zeros(21416,4,'uint16');
%counts(amaxind,4)=0;
indexx=0;
for i=1:reads
    t=fgetl(file);
    if t==-1
        break
    end
    try

        if (rem(i-2,4)==0)

            Lines=t(26:45);
            a=sum(repmat(Lines,21416,1)==sequence,2);
            [amax,amaxind]=max(a);
            if amax==20
                counts(amaxind,1)=counts(amaxind,1)+1;
                z=z+1;
            end

        end

    end

end

end
```

```

toc
genename=genename';
counts=counts(:,1);
counts=mat2cell(counts(:,1),ones(size(counts,1),1));
Excell=[genename,counts];
save('counts','counts')
xlswrite('WTA_T0_S1_L001.xls',Excell)
save('Excell','Excell')

%2.raw data histogramı
load raw_data.mat
rawvalues=table2array(raw_data(:,2:25));
load CDataCopy.mat
load experimentler.mat

figure(1)
for i=1:24
subplot(6,4,i)
histogram(rawvalues(:,i),50,
'BinMethod','scott','EdgeColor',CDataCopy(i,:), 'FaceColor',CDataCopy(i,
,:))
title(experimentler{i},'FontWeight','bold')
xlabel ('Ham Okuma Sayısı','FontWeight','bold','FontSize',8)
ylabel ('Frekans(50)','FontWeight','bold','FontSize',8)
axis([0 2000 0 2000])
xlim ([-100 3000])
ylim ([0 1600])
end

%3.Datadan anlamsız verilerin çıkarılması
load raw_data.mat

%%1---IF T20==0, T20==1;
toDelete=raw_data.("YT.A T20") ==0;
raw_data(toDelete,3)={1};
toDelete=raw_data.("YT.B T20") ==0;
raw_data(toDelete,5)={1};
toDelete=raw_data.("AMP.A T20") ==0;
raw_data(toDelete,7)={1};
toDelete=raw_data.("AMP.B T20") ==0;
raw_data(toDelete,9)={1};
toDelete=raw_data.("CHL.A T20") ==0;
raw_data(toDelete,11)={1};
toDelete=raw_data.("CHL.B T20") ==0;
raw_data(toDelete,13)={1};
toDelete=raw_data.("DOX.A T20") ==0;
raw_data(toDelete,15)={1};
toDelete=raw_data.("DOX.B T20") ==0;
raw_data(toDelete,17)={1};
toDelete=raw_data.("OXA.A T20") ==0;
raw_data(toDelete,19)={1};
toDelete=raw_data.("OXA.B T20") ==0;
raw_data(toDelete,21)={1};
toDelete=raw_data.("SPR.A T20") ==0;
raw_data(toDelete,23)={1};
toDelete=raw_data.("SPR.B T20") ==0;
raw_data(toDelete,25)={1};

%%2---IF T0<20, REMOVE
rawdata=table2array(raw_data(:,2:end));

```

```

silinecek=(sum(rawdata(:,1:2:end)<20,2));
dropout=raw_data(logical(silinecek),:);
raw_data(logical(silinecek),:)=[]; %21145
read_counts(3,:)=sum(table2array(raw_data(:,2:end))); %21148

%%DROP OUTLARI ALALIM
dropout_gen=unique(dropout(:,1));
dropout_gen= string (table2cell(dropout_gen(4:end,:)));

yuzde=(257/21416)*100 %1.2

%4. 5/5+ sgRNA'ların çıkarılması
ALL_GENE(:,1)=table2cell (raw_data(:,1));
genlistesi(:,1)=unique(ALL_GENE(:,1));
raw_data.TwentySixthColumn = zeros(21148,1);
for j=1:size(genlistesi,1)
    elimdekigen=genlistesi(j,1);
    x=ismember(ALL_GENE(:,1),elimdekigen);
    sum_x=sum(x);
    raw_data.TwentySixthColumn (x)=sum(x);
end
silinecek=find(raw_data.TwentySixthColumn<5);
dropout=raw_data(silinecek,:);
raw_data(silinecek,:)=[]; %19589

%okuma sayısı bar grafiği
load total_count.mat
samples=string(raw_data.Properties.VariableNames(2:25));
samples=categorical(samples);
figure(2)
W=bar(samples,totalcount,'FaceColor','flat')
title('sgRNA Okuma Sayısı/Deney
Grubu','FontWeight','bold','FontSize',14)
xlabel ('Deney Grupları','FontWeight','bold')
ylabel('sgRNA Okuma Sayısı','FontWeight','bold')

%% 5. normalizasyon
cd('/Users/dilan/Desktop/THESIS_ANALYZE/COUNT_EXCELL')
load raw_data.mat
rawdata=table2array(raw_data(:,2:end));
norm_data=rawdata./mean(rawdata);
cd('/Users/dilan/Desktop/THESIS_ANALYZE')
load CData.mat
load samples.mat

figure(3);
subplot(2,1,1)
boxplot(log(rawdata),samples,'BoxStyle','filled','OutlierSize',4,'Colors', CData,'Symbol','')
xlabel ('Deney Grupları','FontWeight','bold')
ylabel('log(ham okuma sayısı)','FontWeight','bold')
title('Ham veri','FontWeight','bold','FontSize',14)
ylim([3 10])
subplot(2,1,2)
boxplot(log(norm_data),samples,'BoxStyle','filled','OutlierSize',4,'Colors', CData,'Symbol','')
xlabel ('Deney Grupları','FontWeight','bold')
ylabel('log(normalize okuma sayısı)','FontWeight','bold')
title('Normalize edilmiş veri','FontWeight','bold','FontSize',14)
ylim([-4 3])

```

```

%6. Roc grafiği
%%1.mean(WT)
cd('/Users/dilan/Desktop/THESIS_ANALYZE/COUNT_EXCELL')
load normalize_data.mat
WT=normalize_data(:,1:5);
%MEDIAN LOG2FC
WT_gene=table2cell(unique(WT(:,1)));
all_gene=table2cell(WT(:,1));
for j= 1:size(WT_gene,1)
    elimdekigen=WT_gene(j);
    ind=1;
    FC_list=[];
    for i=1:size(all_gene,1)
        if isequal(all_gene(i),elimdekigen)
            FC_list(ind)=FC(i,1);
            ind=ind+1;
        end
    end
    WT_gene{j,2}=median(FC_list);
j
end
%%2.TRADIS
cd('/Users/dilan/Desktop/THESIS_ANALYZE')
load tradis_table.mat
TRADIS=table2cell(TRADIS_table);
%SEPERATE TRADIS DATA
esansiyel= {};
esansiyel{1}='true',esansiyel{2}='false';
ES_TRADIS={};
ind=1;
for j=1:size(TRADIS,1)
    if isequal (TRADIS(j,2:3),esansiyel)
        ES_TRADIS {ind,1}=TRADIS{j,1};
        ind=ind+1;
    end
j
end %358
nonesansiyel= {};
nonesansiyel{1}='false',nonesansiyel{2}='true';
NONES_TRADIS={};
ind=1;
for j=1:size(TRADIS,1)
    if isequal (TRADIS(j,2:3),nonesansiyel)
        NONES_TRADIS {ind,1}=TRADIS{j,1};
        ind=ind+1;
    end
j
end %3793

%%3.WT VS TRADIS
X = [-8:0.1:4];
TRADISvsWT=[];

for k = 1:size (X,2)
tic
    potential_essential= find (Median_Data(:,1) < X(k) );
    ES_WT = WT_gene (potential_essential,1);

    potential_nonessential= find (Median_Data(:,1) > X(k) );

```

```

NONES_WT = WT_gene (potential_nonessential,1);

%TP
TP=0;
for j=1:size(ES_TRADIS,1)
    elimdekigen=ES_TRADIS{j};
    Buldu=0;
    for i=1:size(ES_WT,1)
        if ~isempty(strfind(ES_WT{i},elimdekigen))
            Buldu=1;
        end
    end
    TP=TP+Buldu;
end

%TN
TN=0;
for j= 1: size (NONES_TRADIS,1)
    elimdekigen=NONES_TRADIS {j};
    Buldu=0;
    for i=1:size (NONES_WT,1)
        if ~isempty (strfind (NONES_WT{i},elimdekigen))
            Buldu=1;
        end
    end
    TN= TN+Buldu;
end

%FN
FN=0;
for j= 1: size (ES_TRADIS,1)
    elimdekigen=ES_TRADIS {j};
    Buldu=0;
    for i= 1: size (NONES_WT,1)
        if ~isempty (strfind (NONES_WT{i},elimdekigen))
            Buldu=1;
        end
    end
    FN= FN+Buldu;
end

%FP
FP=0;
for j= 1: size (NONES_TRADIS,1)
    elimdekigen=NONES_TRADIS {j};
    Buldu=0;
    for i= 1: size (ES_WT,1)
        if ~isempty (strfind (ES_WT{i}, elimdekigen))
            Buldu=1;
        end
    end
    FP= FP+Buldu;
end

TPR= TP/(TP+FN);
FPR= FP/(FP+TN);
PPV= TP/(TP+FP);
FDR= FP/(FP+TP);

```

```

TRADISvsWT(1,k)=TP;
TRADISvsWT(2,k)=TN;
TRADISvsWT(3,k)=FN;
TRADISvsWT(4,k)=FP;
TRADISvsWT(5,k)=TPR;
TRADISvsWT(6,k)=FPR;
TRADISvsWT(7,k)=PPV;
TRADISvsWT(8,k)=FDR;

toc
end

figure(1);
plot(TRADISvsWT(6,:),TRADISvsWT(5,:), 'LineWidth',3, 'Color',[0 0.4470
0.7410]);
legend('AUC= 0.9096','Location','southeast')
hold on
loglog([-0.1,1.1],[-0.1,1.1], '--', 'LineWidth',0.1, 'Color', [0 0 0])
hold off
xlabel('Yanlış Pozitif Oranı','FontWeight','bold','FontSize',14);
ylabel('Doğru Pozitif Oranı','FontWeight','bold','FontSize',14);
axis square
title ('Tradis ile YT Veri Setinin
Karşılaştırması','FontWeight','bold','FontSize',16);
xlim ([-.05 1.05])
ylim ([-.05 1.05])
%AUC
AUC_WT=trapz (TRADISvsWT(6,:),TRADISvsWT(5,:));

%%ECOGENE
load ecogene_essential
load ecogene_nonessential

X = [-8:0.1:4];
ECOGENEvsWT=[];

for k = 1:size (X,2)
tic
potential_essential= find (Median_Data(:,1) < X(k) );
ES_WT = WT_gene (potential_essential,1);

potential_nonessential= find (Median_Data(:,1) > X(k) );
NONES_WT = WT_gene (potential_nonessential,1);

%TP
TP=0;
for j=1:size(ES_ECO,1)
elimdekigen=ES_ECO{j};
Buldu=0;
for i=1:size(ES_WT,1)
if ~isempty(strfind(ES_WT{i},elimdekigen))
Buldu=1;
end
end
TP=TP+Buldu;
end

%TN
TN=0;
for j= 1: size (NONES_ECO,1)

```

```

elimdekigen=NONES_ECO {j};
Buldu=0;
for i=1:size (NONES_WT,1)
if ~isempty (strfind (NONES_WT{i},elimdekigen))
    Buldu=1;
end

end
TN= TN+Buldu;
end

%FN
FN=0;
for j= 1: size (ES_ECO,1)
elimdekigen=ES_ECO {j};
Buldu=0;
for i= 1: size (NONES_WT,1)
    if ~isempty (strfind (NONES_WT{i},elimdekigen))
        Buldu=1;
    end
end
FN= FN+Buldu;
end

%FP
FP=0;
for j= 1: size (NONES_ECO,1)
    elimdekigen=NONES_ECO {j};
    Buldu=0;
    for i= 1: size (ES_WT,1)
        if ~isempty (strfind (ES_WT{i}, elimdekigen))
            Buldu=1;
        end
    end
    FP= FP+Buldu;
end

TPR= TP/(TP+FN);
FPR= FP/(FP+TN);
PPV= TP/(TP+FP);
FDR= FP/(FP+TP);

ECOGENEvsWT(1,k)=TP;
ECOGENEvsWT(2,k)=TN;
ECOGENEvsWT(3,k)=FN;
ECOGENEvsWT(4,k)=FP;
ECOGENEvsWT(5,k)=TPR;
ECOGENEvsWT(6,k)=FPR;
ECOGENEvsWT(7,k)=PPV;
ECOGENEvsWT(8,k)=FDR;

toc
end

figure(2);
plot(ECOGENEvsWT(6,:),ECOGENEvsWT(5,:), 'LineWidth',3, 'Color',[0 0.4470
0.7410]);
legend('AUC= 0.8877', 'Location', 'southeast')
hold on
loglog([-0.1,1.1],[-0.1,1.1], '--', 'LineWidth',0.1, 'Color', [0 0 0])

```

```

hold off
xlabel('Yanlış Pozitif Oranı','FontWeight','bold','FontSize',14);
ylabel('Doğru Pozitif Oranı','FontWeight','bold','FontSize',14);
axis square
title('EcoGene ile YT Veri Setinin
Karşılaştırması','FontWeight','bold','FontSize',16);
xlim ([-.05 1.05])
ylim ([-.05 1.05])

%AUC
AUC_WT2=trapz(ECOGENEvSWT(6,:),ECOGENEvSWT(5,:));

%7. Verilerin işlenmesi
load normalize_data.mat
normvalues=table2array(normalize_data(:,2:25));
load CData2.mat
load experiments.mat

%t0 t20
figure(1)
for i=1:12
subplot(3,4,i)
loglog( normvalues(:,(i*2-
1)),normvalues(:,(i*2)),'.','Color',CData2(i,:))
hold on
loglog([10^-3,10^3],[10^-3,10^3],'-','Color','k')
title(experiments{i},'FontWeight','bold')
xlabel ('T0','FontWeight','bold')
ylabel ('T20','FontWeight','bold')
axis square
ylim ([0 10])
xlim ([0 10])
end

%LOG2(T20./T0)
FC_data=normalize_data(:,1);
ind=1
for i= 2:2:24
    FC(:,ind)=log2(normvalues(:,i)./normvalues(:,i-1));
    FC_data(:,ind+1)=table(FC(:,ind))
    ind=ind+1
    i
end

writetable(FC_data,'FC_data.xlsx');

%Dağılım
figure(2)
for i=1:12
subplot(3,4,i)
histogram(FC(:,i),100,'BinMethod','scott','EdgeColor',CData2(i,:), 'FaceColor',CData2(i,:))
title(experiments{i},'FontWeight','bold')
xlabel ('Kat Değişimi','FontWeight','bold')
ylabel ('Frekans(100)','FontWeight','bold')
axis 'square'
xlim ([-5 5])
end

%MEDIAN LOG2(katdeğişimi)

```

```

GENELIST=table2cell(unique(FC_data(:,1)));
SGRNA=table2cell(FC_data(:,1));

for k=1:12
for j=1:size(GENELIST,1)
gen=GENELIST(j);
ind=1;
FC_list=[];
for i=1:size (SGRNA,1)
if isequal(SGRNA(i),gen)
FC_list(ind)=FC(i,k);
ind=ind+1
end
end
GENELIST{j,k+1}=median(FC_list);
j
end
k
end

writecell(GENELIST, 'GENELIST.xlsx');

MedianData=double(cell2mat(GENELIST(:,2:13)));
GENSAYISI=[1:size(GENELIST,1)];
figure(3)
for i=1:12
subplot(3,4,i)
plot( GENSAYISI,MedianData(:,i),'.','Color',CData2(i,:))
title(experiments{i},'FontWeight','bold')
xlabel ('Genler','FontWeight','bold')
ylabel ('Median log2FC Değeri','FontWeight','bold')
axis square
ylim ([-5 5])
end

%önemi artan genlerin belirlenmesi
load GENELIST.mat

%wt da -1den az
DENEME(:,1)=cell2table(GENELIST(:,1));
for i=2:13
DENEME(:,i)=table(double(cell2mat(GENELIST(:,i)))));
end

toDelete=DENEME("Var2")<-1;%wta
DENEME(toDelete,:)=[];

toDelete=DENEME("Var3")<-1;%wtb
DENEME(toDelete,:)=[];

listeler={}
k=1;
for i=4:13
ind=find(table2array(DENEME(:,i))< -2);
listeler{1,k}=table2cell(DENEME(ind,:));
k=k+1;
i
end

```

```

%%heatmap;
load genler.mat
load experiments.mat
FC=double(cell2mat(genler(:,2:13)));
genes=(genler(:,1))'

figure(1);
h = heatmap(experiments,genes,FC);
h.Title = 'Heatmap';
h.XLabel = 'Deney Grupları';
h.YLabel = 'Önemi Artan Genler';

AMP=union(listeler{1,1}(:,1),listeler{1,2}(:,1));
CHL=union(listeler{1,3}(:,1),listeler{1,4}(:,1));
DOX=union(listeler{1,5}(:,1),listeler{1,6}(:,1));
OXA=union(listeler{1,7}(:,1),listeler{1,8}(:,1));
SPR=union(listeler{1,9}(:,1),listeler{1,10}(:,1));

load amp
load chl
load dox
load oxa
load spr

%%heatmap;

a=table2array(amp(1:5,2:13));
bar ((a)')
figure(4); bar ((a)')
name =
{'WTA'; 'WTB'; 'AMPA'; 'AMPB'; 'CHLA'; 'CHLB'; 'DOXA'; 'DOXB'; 'OXAA'; 'OXAB'; '
SPRA'; 'SPRB'};
set(gca,'xticklabel',name)

title('genes {i}')

```

Konferans Bildirileri

1. Can D., Özbek, T. ve Kotil, S. (2022, 19-22 Eylül). Identifying evolutionary rescuer essential genes by CRISPRi- Seq [Poster sunum]. 1. INTERNATIONAL ADVANCES IN MOLECULAR BIOLOGY CONGRESS. [Online].

Avaliable: <https://etkinlik.marmara.edu.tr/ambcongress22>

