

SEVİNÇ BABA

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2022

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN ÇOĞUL DİRENÇLİ
KLEBSIELLA PNEUMONIAE İZOLATLARINDA CRISPR-CAS
SİSTEMİ İLE GEN DÜZENLEMESİNİN YAPILMASI**

SEVİNÇ BABA

**DANIŞMAN
PROF. DR. ZERRİN AKTAŞ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2022

İTHAF



Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini paylaştan, beni yönlendiren, cesaretlendiren ve her zaman desteğini hissettiğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Zerrin AKTAŞ'a,

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı'mız Sayın Prof. Dr. Ali AĞAÇFİDAN'a,

Doktora eğitimi ders döneminde emeği geçen tüm hocalarıma,

Yetişmemde büyük katkısı olan değerli yüksek lisans danışman hocam Prof. Dr. M. Derya AYDIN'a,

Tez çalışmalarım sırasında değerli vaktini ayıran, katkı sağlayan Sayın Prof. Dr. M. Oral ÖNCÜL'e,

Tez izleme komitesinde yer alan desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Fatma SAVRAN OĞUZ'a,

Tez konumun belirlenmesiyle başlayan süreçten itibaren bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, emek veren değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Cihan AYDIN'a,

Laboratuvar çalışmalarına yardım eden MSc. Gülşen GÜNEL, MSc. Melis ÇELİK, eğitimim süresince birlikte çalıştığım MSc. Esra YILDIRIM SERVİ ve tüm çalışma arkadaşlarıma,

Her şey için annem, babam ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2020-36552

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	ii
İTHAF.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
2.2. <i>K. pneumoniae</i> 'de Antimikrobiyallere Direnç.....	3
2.3. Beta laktamlar	4
2.3.1. Karbapenemler	4
2.3.1.1. İmipenem.....	6
2.3.1.2. Meropenem	7
2.3.1.3. Ertapenem	7
2.4. <i>K. pneumoniae</i> 'de Karbapenem Direnci.....	8
2.4.1. Karbapenemazların Sınıflandırılması	10
2.4.1.1. A Sınıfı Karbapenemazlar.....	10
2.4.1.2. B Sınıfı Karbapenemazlar (Metallo beta laktamazlar (MBL))	11
2.4.1.3. D Sınıfı Karbapenemazlar.....	12
2.5. CRISPR-Cas Tarihçesi.....	14
2.6. CRISPR-Cas Sistemi	15
2.7. CRISPR-Cas Sisteminin Gelişmiş Sınıflandırması	16
2.7.1. Sınıf 1 CRISPR-Cas Sistemleri.....	16
2.7.2. Sınıf 2 CRISPR-Cas Sistemleri.....	17
2.8. CRISPR-Cas Enzimleri.....	18
2.8.1. Cas9 Enzimi	20

2.9. CRISPR-Cas Sisteminin İşlevi	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. Bakterilerin Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılık Deneyleri	24
3.2. Karbapenemlere Duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	25
3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	25
3.3.1. Bakteri DNA'sının ekstraksiyonu.....	25
3.3.2. Amplifikasyon.....	25
3.3.3. Agaroz jelin hazırlanması	26
3.4. Transformasyonda Plazmidlerin Seçiliminde Kullanılacak Antibiyotiklerin Duyarlılıklarının Belirlenmesi	27
3.5. Plazmidlerin Belirlenmesi.....	27
3.6. <i>bla</i> _{OXA-48} benzeri, <i>bla</i> _{NDM-1} ve <i>bla</i> _{CTX-M-15} Genlerinin Dizi Analizleri ve Hedef Bölgelerin Tayini	32
3.7. Hedef Bölgelerin PCR ile Çoğaltılması.....	34
3.8. Ara Vektöre (pJET1.2) Klonlama.....	40
3.8.1. Kompetan Hücrenin Hazırlanması.....	42
3.8.2. T4 DNA Ligaz ile Ligasyon.....	42
3.8.3. Transformasyon	43
3.8.4. Verifikasyon.....	44
3.9. Ana Vektöre Klonlama	46
3.9.1. TEDA (T5 exonuclease DNA assembly) Yöntemiyle Ana Vektöre AmpR(Pro) ve AprR Bölgesini Klonlanma	48
3.9.2. Ana Vektöre Cas9 ve APOBEC1 Bölgelerinin Klonlanması	49
3.9.3. gRNA'ların Bağlanması ve Ana Vektöre Klonlanması	51
4. BULGULAR.....	52
4.1. İzolatlarda Karbapenemler İçin Saptanan MİK Değerleri	52
4.2. PCR Yöntemi ile Saptanan Direnç Genleri	53
4.3. Transformasyonda Kullanılacak Antibiyotiklerin Belirlenmesi	55
4.4. CRISPR-Cas Sisteminde gRNA Tasarımları	55
4.5. Hedef Bölgelerin Çoğaltılması, Ara Vektöre Klonlanması ve Verifikasyonu	57
5. TARTIŞMA	66
KAYNAKLAR	76
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	88

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1 : OXA-48, NDM-1, CTXM-15 genlerinin saptanmasında kullanılan primerler.....	26
Tablo 3-2: Plazmidlerden hedeflenen bölgeler.....	34
Tablo 3-3 : Ana vektörde (pSGKP-spe-AmpR(Pro)-AprR-Cas9) kullanılacak hedef bölgelerin primerleri.	35
Tablo 3-4 : Ligasyon reaksiyon içeriği.	43
Tablo 3-5 : Verifikasyon için hazırlanan reaksiyonlar.	45
Tablo 4-1: Karbapenemlerin EUCAST'a göre MİK sınır değerleri (mg/L).	52
Tablo 4-2: İzolatların MİK ($\mu\text{g/mL}$) değerleri ve sonuçları.	52
Tablo 4-3 : İzolatlarda (n=5) saptanan direnç genleri ve örnek türü.	53
Tablo 4-4: bla _{OXA-48 benzeri} Genlerinin gRNA dizileri.	56
Tablo 4-5: bla _{NDM-1} Geni gRNA dizileri.	56
Tablo 4-6: bla _{CTX-M-15} Genlerinin gRNA Dizileri.	57
Tablo 4-7: Çalışmada kullanılan plazmidler.....	63
Tablo 5-1: Gram Negatif Bakterilerde CRISPR-Cas Sisteminde Kullanılan Plazmidler.	72

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1 : Karbapenemlerin kimyasal yapıları.	6
Şekil 2-2: CRISPR-Cas Sisteminde Cas9 ve sgRNA Fonksiyonları (137).	19
Şekil 2-3 : RNA hedefli Cas9 nükleazının şeması (142).	21
Şekil 2-4 :CRISPR-Cas Sisteminde Adaptasyon (6).	22
Şekil 2-5: CRISPR-Cas Sisteminde crRNA'nın Biyogenezi (6).....	23
Şekil 2-6: CRISPR-Cas Sisteminde İstilacının Engellenmesi (6).	23
Şekil 3-1 : pCasKP-apr (Addgene ID: 117231) plazmidinin haritası.	28
Şekil 3-2: pCasKP-hph (Addgene ID: 117232) plazmidinin haritası.	28
Şekil 3-3 : pSGKP-km (Addgene ID: 117233) plazmidinin haritası.	29
Şekil 3-4 : pSGKP-spe (Addgene ID:117234) plazmidinin haritası.....	30
Şekil 3-5 : pBECKP-km (Addgene ID: 117235) plazmidinin haritası.	31
Şekil 3-6 : pBECKP-spe (Addgene ID: 117236) plazmidinin haritası.	32
Şekil 3-7: Hedef genler ve PAM dizileri.	33
Şekil 3-8 : pUC19 vektöründe AmpR promotör bölgesi.	36
Şekil 3-9 : pCasKP-apr (Addgene ID: 117231) plazmitte AraBAD bölgesi.	37
Şekil 3-10 : pCasKP-apr (Addgene ID: 117231) plazmitten apramisin direnç bölgesi..	38
Şekil 3-11 : pBECKP-km (Addgene ID: 117235) plazmitten APOBEC1-Cas9(D10A) bölgesi.	39
Şekil 3-12 : pCasKP-apr (Addgene ID: 117231) plazmitte Cas9 bölgesi.	40
Şekil 3-13 :pJET 1.2 plazmidinin haritası.	41
Şekil 3-14 : pSGKP-spe plazmidinden ana vektörü oluşturacak bölge.	48
Şekil 4-1: NDM-1 pozitif suşun amplifikasyon ürününün bant görüntüsü.	54
Şekil 4-2: OXA-48 benzeri pozitif suşların amplifikasyon ürünlerinin bant görüntüleri.	54
Şekil 4-3: CTX-M-15 pozitif suşların amplifikasyon ürünlerinin bant görüntüleri.	55
Şekil 4-4 : Suşların bla _{OXA-48 benzeri} Genlerinin Dizi Hizalaması.	56
Şekil 4-5: bla _{NDM-1} Geni Pozitif Suşun Dizi Hizalaması.....	56
Şekil 4-6: Suşların bla _{CTX-M-15} Genlerinin Dizi Hizalaması.	57
Şekil 4-7 : pJET1.2'ye klonlanan ApmR ve AraBAD bölgelerinin verifikasyonunda elde edilen bant görüntüleri.	58
Şekil 4-8 : pJET1.2-Cas9'un (7077 bp) verifikasyonundaki jel görüntüsü.	59

Şekil 4-9: AmpR(Pro) (759 bp) ve pUC19 (2686 bp) plazmidinin agaroz jeldeki görüntüsü.	60
Şekil 4-10: pUC19-AmpR(Pro)'nun transformasyondan oluşan kolonileri.....	60
Şekil 4-11: pUC19-AmpR(Pro) plazmidinin (3445 bp) verifikasyonunda elde edilen bantların görüntüsü.	61
Şekil 4-12: pSGKP-AmpR(Pro)-AprR vektörünün haritası.	62
Şekil 4-13:pSGKP-AmpR(Pro)-AprR plazmidinin verifikasyonunda elde edilen bantların görüntüsü.	63
Şekil 4-14: CRISPR-Cas ikili sisteminin elektroporasyon ile <i>K. pneumoniae</i> izolatına aktarılması.....	65



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

GSBL: Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz

OXA-48: Oksasilinaz-48

NDM: New Delhi metallobetalaktamaz

KPC: Klebsiella pneumoniae karbapenemazı

MBL: Metallo beta-laktamazlar

PBP: Penisilin bağlayan proteinler

CRISPR: Düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar

Cas: CRISPR-ilişkili

crRNA: CRISPR RNA'ları

gRNA: Rehber RNA

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

CZA: Seftazidim-avibaktam

ÖZET

Baba, S. (2022). Klinik örneklerden izole edilen çoğul dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında CRISPR-Cas sistemi ile gen düzenlemesinin yapılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda klinik örneklerden izole edilen çoğul dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında gen düzenlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmaya Haziran-Eylül 2020 tarihleri arasında izole edilen beş tane çoğul dirençli *K. pneumoniae* izolatı dahil edilmiştir. Bu izolatlarda imipenem, meropenem ve ertapenem için minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerleri, EUCAST önerilerine göre sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle saptanmıştır. Klasik polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle izolatların *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM-1} ve *bla*_{CTX-M-15} genlerinin varlığı araştırılmıştır. CRISPR-Cas sisteminde kullanılmak üzere ikili plazmid (CRISPR-Cas9 ve CRISPR destekli sitidin deaminaz) tasarlanmıştır. Transformasyonda plazmidlerin seçiliminde kullanılacak antibiyotiklerin izolatlara duyarlılıkları araştırılmıştır. Ana vektörü oluşturmak için *K. pneumoniae* plazmitlerinden (pCasKP-apr, pCasKP-hph, pSGKP-km, pSGKP-spe, pBECKP-km, pBECKP-spe) hedeflenen gen bölgeleri (AmpR (Pro), AraBAD, ApmR, Cas9 ve Cas9 (D10A)-APOBEC1) PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Klonlama, ligasyon ve TEDA (T5 ekzonükleaz DNA ekleme) yöntemi ile yapılmıştır.

İzolatların MİK değerleri imipenem için 4-128 µg/mL, meropenem için 8-64 µg/mL ve ertapenem için 8-256 µg/mL aralığında saptanmıştır. İzolatların tümü ertapeneme, meropeneme ve imipeneme dirençli bulunmuştur. İzolatlarının tamamında (n=5) *bla*_{OXA-48} benzeri ve *bla*_{CTX-M-15} genleri, bir izolatta (%20) *bla*_{NDM-1} geni saptanmıştır. Her bir direnç geninin dizi analizi sonuçlarına göre ayrı ayrı gRNA dizileri oluşturulmuştur. İzolatlar, transformasyon aşamasında kullanılacak antibiyotiklerden yalnızca apramisine (50 µg/mL) duyarlı bulunmuştur. CRISPR-Cas sisteminde kullanılmak üzere tasarlanan ana vektöre Cas9 ve APOBEC bölgeleri klonlanamamış ancak pSGKP-AmpR (Pro)-AprR plazmiti başarılı bir şekilde oluşturulmuştur.

Sonuç olarak, antibiyotiklere çoğul dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında CRISPR-Cas sisteminin kullanılarak gen düzenlemesinin yapılabileceği, bu çalışmanın ülkemizden yapılan ilk çalışma olduğu, daha fazla ve ileri çalışmalar ile desteklenerek, dirençli bakterilerde antibiyotik tedavilerine alternatif bir çözüm olabileceği öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Klebsiella pneumoniae*, CRISPR-Cas, OXA-48, NDM-1, CTX-M-15 genleri.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2020-36552

ABSTRACT

Baba, S. (2022). Gene editing with CRISPR-Cas system in multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates isolated from clinical specimens. Department of Clinical Microbiology, Istanbul Faculty of Medicine, Institute of Health Science, Istanbul University, PhD Thesis. Istanbul.

In this study, it was aimed to edit the gene in multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates isolated from clinical samples at Department of Clinical Microbiology, Istanbul Faculty of Medicine, Istanbul University.

Five multidrug resistant *K. pneumoniae* strains isolated between June and September 2020 were included in the study. The minimum inhibitory concentration (MIC) values for imipenem, meropenem and ertapenem in these isolates were determined by broth microdilution method according to EUCAST recommendations. The presence of *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM-1} and *bla*_{CTX-M-15} genes of isolates was investigated by classical polymerase chain reaction (PCR) method. A dual plasmid (CRISPR-Cas9 and CRISPR-assisted cytidine deaminase) was designed in the CRISPR-Cas system. The susceptibility of the antibiotics to be used in the selection of plasmids for transformation to the isolates was investigated. Targeted gene regions (AmpR (Pro), AraBAD, AprR, Cas9 and Cas9 (D10A)-APOBEC1) was amplified by PCR method. Cloning was done by ligation and TEDA (T5 exonuclease DNA assembly) method.

The MIC values of the isolates between 4-128 µg/mL for imipenem, 8-64 µg/mL for meropenem, and 8-256 µg/mL for ertapenem. All isolates were resistant to ertapenem, meropenem and imipenem. The *bla*_{OXA-48-like} and *bla*_{CTX-M-15} genes were detected in all isolates (n=5), and *bla*_{NDM-1} gene was detected in one isolate (20%). According to the results of the sequence analysis of the gene regions, gRNA sequences were created. It was found sensitive only to apramycin (50 µg/mL) among the antibiotics to be used in selection in transformation. Cas9 and APOBEC regions could not be cloned into the backbone vector designed for use in the CRISPR-Cas system, but the pSGKP-AmpR(Pro)-AprR plasmid was successfully created. It is the first study in our country in which gene editing was performed with the CRISPR-Cas system in bacteria resistant to antibiotics.

In conclusion, it is predicted that gene editing can be done by using the CRISPR-Cas system in *K. pneumoniae* isolates that are multidrug resistant to antibiotics, this is the first study in our country, and it can be an alternative solution to antibiotic treatments in resistant bacteria, supported by more and further studies.

Key Words: *Klebsiella pneumoniae*, CRISPR-Cas, OXA-48, NDM-1, CTX-M-15 genes.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: TDK-2020-36552



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Enterobacteriaceae ailesindeki bakteriler, normal barsak mikrobiyotasında bulunan aynı zamanda en yaygın insan patojenleri arasında yer alan ve sistit, septisemi, piyelonefrit, pnömoni, peritonit, menenjit, sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlara neden olan Gram negatif basillerdir (1).

Antimikrobiyal direnç, tüm dünyada önemli bir halk sağlığı tehdidi oluşturmaktadır. Karbapeneme dirençli *Enterobacteriaceae* türleri, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün tanımladığı kritik öncelikli çoğul dirençli bakteriler arasında ilk sırada yer almaktadır (2, 3).

Ampisiline dirençli *Enterobacteriaceae* türlerini tedavi etmek için üçüncü kuşak sefalosporinlerin 1980'li yılların başında kullanılmaya başlanması, günümüzde dünya çapında yaygın olan ve yüksek ölüm oranlarına sahip geniş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üreten *Klebsiella pneumoniae*'nin ortaya çıkmasıyla sonuçlanmıştır. 1990'lı yıllarda GSBL üreten *K. pneumoniae*'nin tedavisinde karbapenemler kullanılmaya başlanmış ancak o zamandan itibaren karbapeneme dirençli *K. pneumoniae*'nin insidansının artışı dikkat çekmiştir (4).

Klinikte karbapeneme dirençli *K. pneumoniae*'nin hızlı artışı büyük endişe kaynağı olmaktadır (5). Karbapeneme dirençli *K. pneumoniae*'de, karbapenemaz üretiminin direnci oluşturan en etkili faktör olduğu gösterilmiştir. Hem klonal hem de plazmid aracılı yayılma karbapeneme dirençli *K. pneumoniae*'nin insidansında artışa katkıda bulunmaktadır. Karbapenem direncinin tüm dünyada son derece hızlı bir şekilde yayılması içinde bulunduğumuz durumun giderek daha tehlikeli hale gelmesi tedavide araştırmacıları yeni çözüm yolları bulmaya yönlendirmektedir.

Son yıllarda moleküler biyolojide önemli bir ilerleme olarak kayda geçen CRISPR-Cas (düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar-CRISPR ilişkili) sistemi ile hedefe özgü gen düzenlemelerinin yapılmasına olanak sağlanmıştır. CRISPR-Cas teknolojisi ile birçok alanda çalışmalar yapılmaktadır. Bu teknoloji ile genomları değiştirmek, düzenlemek, erişilebilir ve uyarlanabilir bir araç sağlayarak çok çeşitli alanlarda biyolojik araştırma ve biyoteknolojik uygulamalar sağlamaktadır. CRISPR-Cas sistemi, daha önce çalışılmamış organizmaların genetik yapısını

anlamaktan doğrudan hastalığa neden olan genleri keşfetmeye kadar geniş bir alanda araştırmaya olanak tanımaktadır (6).

Bu çalışmada, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen karbapenemlere dirençli bulunan *K. pneumoniae* izolatlarında *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{CTX-M-15} genlerinin varlığını araştırmak ve CRISPR-Cas sistemi ile gen düzenlemesinin yapılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Klebsiella pneumoniae*

19. yüzyılda Alman mikrobiyolog Edwin Klebs'ten adını alan *Klebsiella* cinsi, Carl Friendlander tarafından pnömoniden ölen hastaların akciğerlerinden izole edilen bir bakteri olarak tanımlanmıştır (7). *Klebsiella* türleri, bitkiler, hayvanlar ve insanlar dahil olmak üzere doğada her yerde bulunmaktadır. Solunum yolu enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları ve kan dolaşımı enfeksiyonları dahil olmak üzere insanlarda çeşitli enfeksiyon türlerinin etken mikroorganizmalarıdır (8).

Klebsiella pneumoniae, biyokimyasal reaksiyonlarına göre lizin dekarboksilaz üreten ancak ornitin dekarboksilaz üretmeyen ve indol testi negatif, Voges-Proskauer testinde pozitif; hareketsiz, sporsuz, kapsüllü, Gram negatif basil morfolojisinde *Enterobacteriaceae* familyasında bakterilerdir (9).

K. pneumoniae, dünyanın en yaygın hastane kaynaklı patojenleri arasında yer almaktadır. Aynı zamanda, çoğunlukla ilk üç etken arasında yer alan yenidoğan sepsisinin önemli bir nedenidir (10).

Karbapenemler ve diğer β -laktam antibiyotikler, *K. pneumoniae* enfeksiyonlarını tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan ve çoğul dirençli bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için son çare ajanlardır. Karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* ilk olarak 1990'larda bildirilmiştir ve on yıl boyunca sporadik olarak izole edilmiştir. Bununla birlikte, son yıllarda karbapenemlerin artan klinik kullanımıyla birlikte, Karbapeneme dirençli *K. pneumoniae*'nin prevalansı endişe verici bir oranda artmıştır (11-13) Dünya Sağlık Örgütü, genişlemiş spektrumlu β laktamaz (GSBL) üreten ve karbapeneme dirençli *K. pneumoniae*'yi ciddi bir halk sağlığı tehdidi olarak kabul etmektedir (14).

2.2. *K. pneumoniae*'de Antimikrobiyallere Direnç

K. pneumoniae'nin neden olduğu enfeksiyonlar ve dirençli suş sayısı artmaktadır. Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi'ne bildirilen *K. pneumoniae*

izolatlarının üçte birinden fazlasını en az bir antimikrobiyal gruba dirençli, florokinolonlara, üçüncü kuşak sefalosporinlere, aminoglikozitlere ve karbapenemlere karşı kombine direnç gösteren en yaygın direnç fenotipi haline gelmiştir (15). Ayrıca, *Klebsiella* türlerinin, diğer Gram negatif bakterilere yayılabilen antibiyotiklere direnç oluşturan genler için bir rezervuar olduğu bilinmektedir (16, 17).

EARS-Net 2020 verilerine göre Avrupa ülkelerinde 40.075 *K. pneumoniae* izolatu bildirilmiştir. Bunların 39.579'u (%99) üçüncü kuşak sefalosporinlere, 39.794'ü (%99) florokinolonlara, 38.733'ü (%97) aminoglikozitlere ve 39.006'sı (%97) karbapenemlere dirençli bulunmuştur (15).

2.3. Beta laktamlar

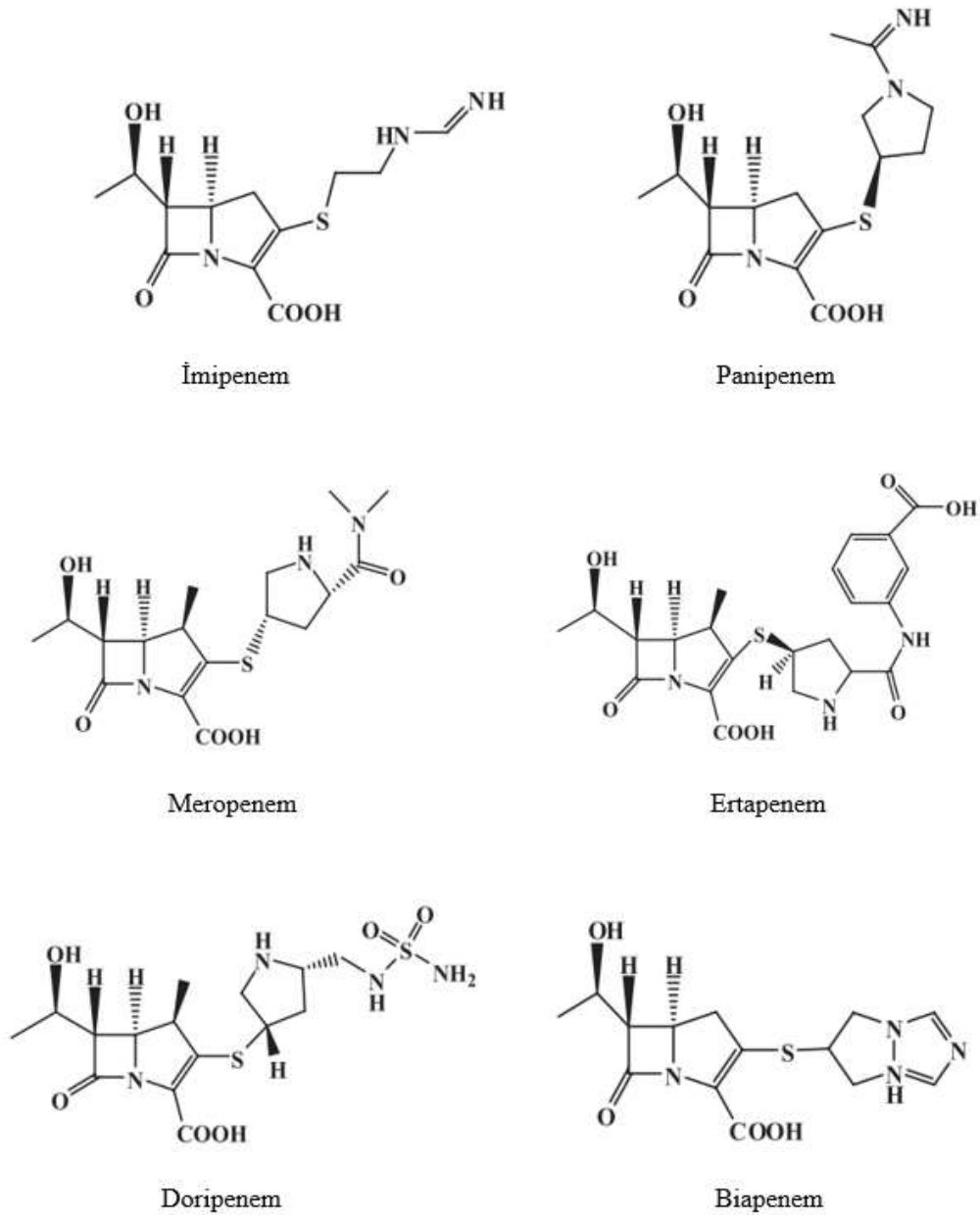
Beta laktam antibiyotikler hem Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin hücre duvarının transpeptidasyon basamağında yer alan transpeptidazlara (Penisilin Bağlayan Proteinlere (PBP)) kovalent bağlanmanın bir sonucu olarak hücre duvarı oluşumunu engelleyen bakterisidal etkili ajandır. Her bakterinin üç ile sekiz enzim arasında değişebilen kendine özgü bir PBP'leri bulunmaktadır (18, 19). Bu PBP'lerin bir veya daha fazlasının inhibe edilmesinin bir sonucu olarak hücre ölümü görülebilmektedir. Beta laktam antibiyotiklerin antimikrobiyal etki spektrumu, yapılarına bağlı olarak fizikokimyasal faktörlerden etkilenmektedir. Kimyasal yapılarında beta laktam halkası taşıyan bu antibiyotikler; penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler ve monobaktamlar olmak üzere dört gruba ayrılır (20).

2.3.1. Karbapenemler

1960'lı yılların sonlarında, bakteriyel beta laktamazların ortaya çıkması ve penisilin kullanımını tehdit etmesiyle beta laktamaz inhibitörleri için araştırmalar başlamıştır (21). 1976 yılında Gram pozitif bir bakteri *Streptomyces clavuligerus* tarafından üretilen olivanik asitler, keşfedilen ilk beta laktamaz inhibitörleri olmuştur. Olivanik asitler karbapenem omurgasına sahip olup geniş spektrumlu beta laktamlar olarak işlev görmektedir. Kimyasal kararsızlığı ve bakteri hücrelerine zayıf penetrasyonu nedeniyle daha üstün beta laktamaz inhibitörlerine ihtiyaç duyulmuştur. *Streptomyces*

clavuligerus tarafından üretilen klavulanik asit ve *Streptomyces cattleya*'dan tienamisin klinik kullanımları uygun beta laktamaz inhibitörleri olarak bulunmuştur. Tienamisin ilk karbapenem olup tüm karbapenemler için model bileşik kabul edilmiştir (22, 23). Tienamisinin hidroksietil yan zinciri, tümü beta laktam halkasında bir aminoaçil yapısına sahip olan geleneksel penisilin ve sefalosporinlerin yapısından ayrılmaktadır. Bu hidroksietil yan zincirinin stereokimyası, karbapenemlerin anahtar özelliği olmakta ve etkinliği için oldukça önemlidir (24). Tüm karbapenemlerin 1. pozisyonunda sülfür yerine karbon bulunmakta ve beş üyeli thiazolidin halkasının 2. ve 3. karbon atomları arasında doymamış bağ varlığı dahil olmak üzere penisilinlerden ayrılmaktadır (Şekil 2-1) (25).

Güçlü, geniş spektrumlu antibakteriyel etkiye sahip ve beta laktamaz inhibe edici aktivite göstermektedir. Ancak doğal bir ürün olmasına rağmen saflaştırma işleminden elde edilen verimin düşük olması sebebiyle zamanla yerini tienamisinin sentetik preparasyonu ve önemli bir türevi olan imipeneme bırakmıştır (23, 26).



Şekil 2-1 : Karbapenemlerin kimyasal yapıları.

2.3.1.1. İmipenem

Tienamisin gibi PBP'ler için yüksek afinite ve beta laktamazlara karşı stabilite gösteren imipenem, 1985 yılında bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan ilk karbapenemdir (27). Ancak memelilerin proksimal renal tübüllerinde bulunan dehidropeptidaz (DHP-1) hızlı parçalaması sebebiyle klinikte kullanılabilmesi için

silastatin ile birlikte uygulanmalıdır. Aynı zamanda bir DHP-1 inhibitörünün eklenmesi ile imipenemin tek başına uygulandığında gözlenen nefrotoksisiteyi de önlemektedir (28, 29).

İmipenemin antibakteriyel etki mekanizması temelde diğer tüm beta laktam antibiyotiklerle aynıdır. PBP'leri bağlar, bu sayede hücre duvarının yapısında bozulmaya, hücre büyümesinin durmasına ve sıklıkla hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu Gram pozitif bakterilerde hücre yüzeyinde, Gram negatif bakterilerde ise periplazmik boşlukta meydana gelmektedir (30).

2.3.1.2. Meropenem

Meropenem, 1996 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanılmaya başlanan karbapenemdir. İmipenem gibi, meropenem de tienamisinin bir türevidir. Ancak yapısal olarak DHP-1'e dayanıklı olması ve tek başına uygulanabilir olmasıyla imipenemden farklılık göstermektedir (29).

Meropenem imipeneme kıyasla Gram negatif bakterilere karşı daha güçlü fakat Gram pozitif bakterilere karşı daha az etkili olduğu gösterilmiştir (31). Bu ajanların her ikisi de çeşitli komplike ve sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonların tedavisinde kullanılmıştır (32).

2.3.1.3. Ertapenem

Ertapenem, DHP-1'e karşı stabilitesi de dahil olmak üzere, meropenem ile yapısal özellikleri benzeyen bir DHP-1 inhibitörü olmadan uygulanan bir karbapenemdir. Gram pozitif ve Gram negatif aerop ve anaerop bakterilere karşı bakterisit etkilidir (33). Ancak diğer karbapenemlerin aksine, *Pseudomonas aeruginosa*, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Actinobacter spp.* ve enterokoklar dahil olmak üzere sağlık hizmeti ilişki enfeksiyonlara neden olan patojenlere karşı etkisi sınırlıdır. Bu nedenle ertapenem için Gram pozitif aerop bakteriler (MRSA ve enterokoklar hariç) ve anaerop bakteriler, *Enterobacteriaceae* ve *Haemophilus* türleri dahil Gram negatif aerop ve anaerop bakteriler hedef patojenlerdir ancak nonfermantatifler bakterilere de etkilidir (34).

Doripenem, intravenöz kullanım için geliştirilen, Gram pozitif bakterilere karşı imipeneme benzer ve Gram negatif bakterilere karşı meropeneme benzer geniş antimikrobiyal spektruma sahip bir karbapenem antibiyotiktir (35, 36).

Tebipenem pivoksil Japonya'da geliştirilen ilk oral karbapenemdir. *Enterobacteriaceae* üyesi mikroorganizmaların yanı sıra çoğul dirençli *Streptococcus pneumoniae* ve diğer Gram pozitif bakterilere etkilidir (37). Genellikle çocuklarda pnömoni tedavisinde kullanılmaktadır (38).

İmipenem ile benzer özellikte tanımlanan tienamisinin daha kararlı türevi olan karbapenem, **panipenemdir**. İmipenem gibi DHP-1 enzimine duyarlı olup silastatin veya betamipron gibi inhibitörlerle birlikte uygulama gerektirmektedir (23, 39).

Biapenem, Japonya'da kullanım için onaylanmış yeni parenteral karbapenemdir. Beta laktamaz üreten türler de dahil olmak üzere birçok Gram negatif ve Gram pozitif aerop ve anaerop bakteriyi kapsayan geniş bir antibakteriyel aktiviteye sahiptir. Biapenem DHP-1 tarafından hidrolize edilmeye karşı stabil olduğu için DHP-1 inhibitörüyle birlikte uygulanmayı gerektirmez. Komplike karın içi enfeksiyonları, alt solunum yolu enfeksiyonları ve komplike idrar yolu enfeksiyonları olan yetişkinlerin tedavisinde etkinlik göstermiştir ve genellikle iyi tolere edilmiştir (40).

Genellikle imipenem, panipenem ve doripenem, Gram pozitif bakterilere karşı güçlü antibiyotiklerdir. Meropenem, biapenem, ertapenem ve doripenem Gram negatif bakterilere karşı daha fazla etkilidir (41).

Beta laktamların penem sınıfının bir üyesi olan **faropenem**, karbapenemlerle karşılaştırıldığında farklı kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklere sahiptir (28). Faropenem, CTX-M ailesinin üyeleri dahil olmak üzere bazı GSBL'leri inhibe etmekte ancak MBL'ler tarafından hidrolize edilmeye duyarlıdır (42).

2.4. *K. pneumoniae*'de Karbapenem Direnci

En son Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) antimikrobiyal direnç surveyans raporunda, karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının tüm DSÖ bölgelerinde ortaya çıktığını ve bazılarında prevalansın %50'nin üzerinde olduğunu açıklamıştır. *K.*

pneumoniae ayrıca dünya çapında karbapeneme dirençli bakterilerle gelişen enfeksiyonların ana nedenidir (43).

1990'lı yılların sonlarında KPC (*Klebsiella pneumoniae* karbapenemazı) tipi karbapenemaz üreten *K. pneumoniae*'nin ortaya çıkmasının ardından 2000'li yıllarda dünya çapında yayılması, bunu takiben NDM (New Delhi metalloβ-laktamaz) tipi karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* ve OXA-48 (oksalilaz-48) tipi karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* görülmüştür. (44).

Karbapenem direnci (karbapenemazlar aracılığıyla) sağlayabilen en önemli genlerin tümü *K. pneumoniae*'de mevcuttur ve bu nedenle neredeyse tüm mevcut tedavi seçeneklerini etkisiz hale getirmektedir. Bu bakterilerle enfekte olan hastalar için klinik olarak etkili tedavi bulunamamaktadır (43).

Seftazidim-avibaktam (CZA), üçüncü kuşak bir sefalosporin ile yeni bir β-laktamaz inhibitörünün nispeten yeni bir kombinasyonudur. Avibaktam (AVI), Ambler sınıf A, sınıf C ve bazı sınıf D β-laktamaz üreten patojenlere karşı etkili bir antibiyotiktir. Seftazidim ve avibaktam kombinasyonu piyelonefrit dahil komplike karın içi enfeksiyonların ve idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisi için FDA onaylıdır. CTX-M tipi GSBL'ler Türkiye'de ve dünya çapında giderek yaygınlaşmaktadır. Avibaktam en önemli avantajı, GSBL, AmpC, KPC ve OXA-48 üreten *P. aeruginosa* ve *Enterobacteriaceae* türlerine etkili olduğunu göstermiştir (45).

İmipenem, KPC ve diğer karbapenemazları üreten *Enterobacteriaceae* türleri ve *P. aeruginosa* izolatlarına karşı yeniden etki gösterebilmesi için relebaktamla birlikte kullanılmaya başlanmıştır. Relebaktam AmpC'yi inhibe ederek imipenem aktivitesini geliştirmiştir (46). İmipenem/relebaktam kombinasyonunun A ve C Sınıfı beta laktamazları üreten bakterilere karşı etkili ancak MBL üreten izolatlara karşı etkili olmadığı gösterilmiştir (47).

Vaborbaktam, özellikle KPC'leri inaktive etmek için beta laktamların beta laktamaz üreten Gram negatif bakterilere karşı aktivitesini yeniden kazandırma amacıyla geliştirilmiştir. Meropenem/vaborbaktam kombinasyonu, CTX-M, SHV, TEM, SME, NMC-A ve KPC üreten izolatlar dahil olmak üzere çeşitli A ve C Sınıfı beta laktamlara karşı aktiviteye sahiptir (47, 48).

2.4.1. Karbapenemazların Sınıflandırılması

Karbapenemlere dirençli *Enterobacteriaceae* üyeleri, büyük ölçüde karbapenemaz genlerinin edinilmesinin bir sonucu olarak dünya çapında giderek artan oranda bildirilmektedir (49).

Amino asit dizilerinin homolojisine, katalitik bölge ve substrat tercihlerine dayalı yapılan Ambler sınıflamasına göre beta laktamazlar dört gruba (A, B, C, D) ayrılmış ve bunlardan A, B ve D Ambler Sınıfına ait çeşitli karbapenemazlar tanımlanmıştır. Buna ek olarak Ambler C sınıfı (sefalosporinazlar) karbapenemlere karşı hafif etkiye sahip olabilir, ancak klinik rolleri henüz bilinmemektedir (49, 50). A, C ve D sınıflarındaki enzimlerin aktif katalitik bölgesinde serin bulunurken, B sınıfı enzimler aktif bölgesinde çinko bulunduran metallo-betalaktamazlardır (MBL'ler) (51).

2.4.1.1. A Sınıfı Karbapenemazlar

NmcA/IMI, SME ve KPC enzimleri, A sınıfı karbapenemazlar olarak tanımlanmıştır. Her üç enzim tipi de aktif serin bölgesini içeren hidrolitik bir mekanizma ile penisilinler, sefalosporinler ve karbapenemler olmak üzere çeşitli beta laktamları hidrolize etmektedir (1, 52). Bu sınıfta yer alan GES-1 (Guiana extended-spectrum beta lactamase) enzimi karbapenemaz aktivitesine sahip değildir ancak daha sonra zayıf karbapenemaz aktivitesine sahip varyantlar arasında tanımlanmıştır (1).

NmcA (non-metallo-carbapenemase of class A) tanımlanan ilk karbapenemaz, daha sonra *Serratia marcescens*'te SME enzimleri (*Serratia marcescens* enzimleri) saptanmıştır. SME enzimleri tümü kromozomal olarak kodlanan ABD ve Kanada'da sporodik olarak görülen beş varyantı (SME-1'den SME-5'e) içermektedir (53, 54)

Bu grupta KPC'ler klinik olarak en yaygın görülen enzimlerdir. İlk KPC-2 üreten *K. pneumoniae* 1996 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nin doğusunda tanımlanmıştır (55). KPC-2 tipi karbapenemaz hala sık görülen tip olmakla birlikte bir dizi yeni varyant saptanmış ve tümü ortak bir amino asit dizisinin nokta mutant türevleri olan 19 KPC varyantı bulunmaktadır. KPC enzimleri çoğunlukla *K. pneumoniae* de tanımlanmasına rağmen hızla küresel olarak yayılmıştır (56).

KPC üretenler, çoğunlukla hastane kaynaklı *K. pneumoniae* izolatlarından ve çok daha az sayıda *E. coli*'den ve diğer enterobakteriyel türlerden bildirilmiştir (57). Tek bir *K. pneumoniae* klonu (dizi tipi [ST]-258) dünya çapında geniş çapta tanımlanmış olup, bunun bla_{KPC} genlerinin yayılmasına katkıda bulunmuş olabileceği gösterilmiştir (58).

KPC üreten *K. pneumoniae*'nin neden olduğu hastane salgınlarının sıklıkla meydana geldiği Yunanistan, İtalya ve Polonya Avrupa'daki endemik alanları oluşturmuştur (59, 60).

CTX-M, klinik olarak en yaygın görülen genişlemiş spektrumlu beta laktamazlardır (GSBL'ler) ve üçüncü kuşak sefalosporinleri, penisilinler gibi beta laktamları hidrolize edebilmektedir (61). 2000'li yılların başına kadar klinik örneklerden izole edilen *Enterobacteriaceae* türlerinde tanımlanan en yaygın GSBL'ler TEM ve SHV varyantlarıydı; ancak şu anda CTX-M tipi GSBL'ler baskındır (62). CTX-M tipi karbapenemazın bilinen 150'den fazla varyantı arasında CTX-M-15 dünya çapında klinik izolatlarda en yaygın görülen olmuştur (63). CTX-M'leri üreten bakteriler sıklıkla diğer antimikrobiyal ajan sınıflarına dirençlidir ve bu patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların klinik yönetimini çok zorlaştırmaktadır (64). Ülkemizde 2001 yılında İstanbul Tıp Fakültesi'nde yatan hastanın idrar örneğinden izole edilen *K.pneumoniae* izolatında CTX-M -15 karbapenemazı saptanmış ve bu izolat imipenem hariç diğer tüm beta laktamlara dirençli bulunmuştur (65).

2.4.1.2. B Sınıfı Karbapenemazlar (Metallo beta laktamazlar (MBL))

Enterobacteriaceae'de tanımlanan MBL'lerin en yaygın aileleri, NDM grubuyla birlikte VIM ve IMP karbapenemazlardır (66, 67). MBL'lerin aktif bölgelerinde çinko bulunmakta olup, beta laktamaz inhibitörlerinden (klavulanik asit, tazobaktam veya sulbaktam) etkilenmezler (1).

1990'lı yılların başından itibaren *Pseudomonas spp.* ve *Enterobacteriaceae* türlerinde edinilmiş ya da aktarılabılır MBL genlerinde hızlı bir artış gösterilmiştir (68). Dünya çapında bildirilmiş olmasına rağmen VIM üretenler (Verona integron kodlu metallo beta laktamaz) Avrupa'nın güneyi ve Akdeniz çevresinde oldukça yaygın iken IMP üretenler ise çoğunlukla Asya'da bulunmuştur (67).

Klinik olarak en önemli karbapenemazlardan biri 2009 yılında tanımlanan NDM-1 (Yeni Delhi Metallo beta laktamaz)'dir. NDM-1, penisilinler, sefalosporinler ve karbapenemler dahil olmak üzere çeşitli beta laktamları hidrolize etmektedir (69).

NDM üreten *Enterobacteriaceae* türlerin ana rezervuarı Hint alt kıtası (Pakistan, Hindistan ve Sri Lanka) olarak bilinen bölgedir ancak yalnızca bu bölgeyle sınırlı kalmayıp hemen hemen dünyanın her yerinden bildirilmiştir. Günümüzde NDM üretenler İngiltere ve Fransa gibi Avrupa ülkelerindeki karbapenemazların başında yer almaktadır (70).

Çoğunlukla NDM üreten *K. pneumoniae*'nin neden olduğu salgınlardan dünya çapında giderek fazla bildirilmesi ve buna paralel olarak NDM üreten *E. coli*'nin prevalansında yavaş ama ilerleyen bir artışın gözlenmesi ve 2000'li yıllardan beri CTX-M üreten suşların yayılmasını yansıtmaktadır. 2013 yılında sırasıyla Bulgaristan ve Türkiye'den NDM-1 üreten *E. coli* ve *Enterobacter cloacae*'nin neden olduğu salgınlardan bildirilmiş olması dikkat çekmiştir (71, 72).

Ülkemizde ilk NDM-1 üreten *K. pneumoniae* izolatı 2011 yılında İstanbul'a Irak'tan nakil edilen hastadan izole edilmiştir. Hastada OXA-48 üreten bir *E. coli* suşu ile koenfeksiyon varlığı, Türkiye'nin OXA-48 üreten *Enterobacteriaceae* için bir endemik bölge olduğu bilindiğinden hastane kaynaklı olabileceğini düşündürmüştür. Ancak aynı hastanede aynı süre içinde OXA-48 üreten başka hiçbir *E. coli* suşu tanımlanmadığından, NDM-1 üreten izolat ile birlikte dış ülkeden geldiği hipotezini desteklemektedir (73). Bu ayrıca Hint alt kıtası ve Balkanlar'a ek olarak Orta Doğu özellikle Irak'ın NDM üreten izolatların bir rezervuarı olabileceğini göstermiştir (74).

2.4.1.3. D Sınıfı Karbapenemazlar

D sınıfı beta laktamazlar, oksasilinazlar (OXA'lar) olarak da adlandırılan bazıları karbapenemaz aktivitesine sahip olan 232 varyantı içermektedir. Çok zayıf bir karbapenemaz aktivitesine sahip bir varyant olan OXA-163 dışında, D sınıfı beta laktamazlar geniş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize etmezler. Genellikle oksasilinazların karbapenemaz aktivitesi zayıftır, klavulanik asit ya da EDTA tarafından inhibe edilmez ancak NaCl tarafından inhibe edilmektedir (1).

Avibaktamın OXA-48 üreten *K. pneumoniae* izolatlarına karşı imipenem, sefepim ve seftazidim aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir (75). İmipenem/relebaktam kombinasyonu OXA-48 üreten karbapeneme dirençli *Enterobacteriaceae* türlerine karşı sınırlı aktivite göstermektedir (47). Meropenem/vaborbaktam D sınıfı karbapenemazları inhibe etmemektedir (76).

Oksasilinaz varyantlarının çoğu *Acinetobacter spp.*'de tanımlanmış olmasına rağmen, OXA-48 sadece *Enterobacteriaceae* türlerinde bulunmuştur. İlk OXA-48 tipi karbapenemaz 2001 yılında ülkemizde bir *K. pneumoniae* izolatından tanımlanmıştır (77). Bu tarihten itibaren OXA-48 üreten suşlar, ülkemizde hastane salgınlarının kaynağı olarak fazla sayıda bildirilmiş ve Güney Avrupa, Afrika ülkelerinde de saptanmıştır (78, 79). Fransa, Almanya, İspanya, Hollanda ve Birleşik Krallık'ta OXA-48 üreten *K. pneumoniae*, *E. coli* veya *E. cloacae* izolatları endemik bölgelerden hastaneye yatırılan hastaların nakliyle ortaya çıkan sporadik olgular ya da hastane salgınları bildirilmiştir. Günümüzde OXA-48 üreten suşlar hızla yayılmaktadır (1). *bla_{OXA-48}* geninin çeşitli *Enterobacteriaceae* türleri arasında başarılı bir şekilde yayılmasını sağlayan ana faktörlerden biri, *bla_{OXA-48}*'in bulunduğu plazmitin yüksek transfer etkinliği göstermesidir (80, 81).

Daha sonra Avrupa'daki hastane salgınlarında OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-204 ve OXA-232 gibi OXA-48'in türevleri de bulunmuştur (77, 82-84). OXA-48-benzeri karbapenemazların mobil genetik elemanlar aracılığıyla hızla yayıldığı görülmektedir (85). OXA-48 ile aynı hidrolitik özellikleri taşıyan ve bir nokta mutant türevi olan OXA-181, Hindistan'dan gelen ya da Hint alt kıtası ile bağlantısı olan hastalarda saptanmıştır (86). OXA-204, OXA-48 ile karşılaştırıldığında iki aminoasit diziliminde farklılık olan ve çok benzeyen bir substrat profiline sahiptir. OXA-204, Cezayir ve Tunus ile bağlantısı olan hastalardan izole edilen *K. pneumoniae* izolatlarında bulunmuştur (87). OXA-232, Fransa ve Hindistan'dan nakledilen hastaların *K. pneumoniae* izolatlarında tanımlanmıştır. OXA-232, karbapenemleri hidrolize etmede OXA-48'den daha zayıf bir yeteneğe sahiptir (83). OXA-232 Hindistan'da tanımlanan ABD'ye gelen bir hastadan izole edilen karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* izolatında NDM-1 ile birlikte saptanmıştır (88).

2.5. CRISPR-Cas Tarihçesi

Prokaryotik organizmaların genomlarında tekrarlayan diziler yaygındır. Bu dizilerin genomdaki uzunluğu, dizisi ve konumu oldukça değişkendir ve genellikle tek bir suş için benzersizdir (89-91). Kısa dizi tekrarlarının bitişik tekrarlar ve aralıklı tekrarlar olarak iki ana sınıfı ayırt edilebilmektedir (91). Bitişik tekrar birimlerinin sayısı genellikle türden türe değişir ve bakteri popülasyonlarındaki bu genetik heterojenlik, gen transkripsiyonu ya da translasyonu nedeniyle fenotipik farklılıklara yol açabilmektedir. Bu kısa dizi tekrarları genellikle açık okuma çerçevelerinin (ORF) veya promotör bölgelerinin bir parçasıdır ve tekrar birimlerinin sayısındaki değişiklik bileşenlerin ifadesinin değişmesine yol açabilmektedir (91-93). Bu nedenle kısa dizi tekrarlarıyla, değişen ortamlara uyum sağlamak için gereken çeşitliliğe sahip bir bakteri popülasyonu sağladığı düşünülmektedir (94).

Aralıklı kısa tekrarlı diziler bakterilerde yaygın olarak bulunmakta, uzunlukları genellikle 200 bp'den kısa ve genom boyunca geniş çapta dağılmaktadır. Bu kısa tekrarlı dizilerin çoğu bakterilerde tanımlanmış, mRNA'nın stabilizasyonu, transkripsiyonun sonlandırılması ve genetik düzenlemelerle ilişkilendirilmiştir. Ayrıca bu diziler bakterilerde cinsten cinse farklılık göstermektedir (94, 95).

Bu kısa tekrarlı diziler 1987 yılında Japonya'da ilk kez *E. coli* K12 suşunda tanımlanmıştır (96). Daha sonra *Streptococcus pyogenes* ve *Mycobacterium tuberculosis*'te bu diziler gösterilmiştir (97-99). 2000 yılında Mojica ve arkadaşları bu tekrarlı dizileri birçok prokaryotik türde bir aile olarak kabul etmiştir (100). 2002 yılında Jansen ve arkadaşları, düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlardan oluşan bu ailenin karakteristik özelliklerini yansıtan CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) kısaltmasını kullanmaya başlamış ve CRISPR ile ilişkili Cas genlerini araştırmıştır. CRISPR'ların bir özelliği tekrarlayan DNA'nın benzer boyutta aralıklı tekrarlamayan DNA'ları bulundurmasıdır. Bu tekrarlı diziler *Salmonella Typhimurium*'da 21 bp, *Streptococcus pyogenes*'de 37 bp olup uzunluğu değişir ve kromozom üzerinde bir veya birkaç lokusta kümelenebilir (94). *M. tuberculosis* ve *S. pyogenes* klinik izolatlarında CRISPR lokusları oldukça polimorfiktir ve bu epidemiyolojik ve taksonomik amaçlarla kullanılmıştır (99, 101). Kısa tekrar

dizileri klinik izolatlarda son derece iyi korunmuştur bununla birlikte bu tekrarların ve aralayıcı bölgelerin sayısı türden türe farklılık göstermiştir (102).

2007 yılında *Streptococcus thermophilus* ile yapılan litik faj çalışmalarıyla CRISPR-Cas'la kazanılmış bağışıklığın ilişkili olduğu gösterilmiştir (103). 2008'de CRISPR RNA'larının (crRNA) *E. coli*'de Cas proteinleri ile bir kompleks içinde kılavuz görevi gördüğü belirtilmiştir (104). Yine aynı yıl içinde CRISPR-Cas (CRISPR-ilişkili) sisteminin DNA hedefleme aktivitesi patojen *Staphylococcus epidermidis*'te açıklanmıştır (105).

2.6. CRISPR-Cas Sistemi

Bakteriler ve arkeler, organizmaları virüs ve plazmidlerden koruyan CRISPR/Cas adı verilen RNA aracılı adaptif savunma sistemleri geliştirmiştir. Bu savunma sistemlerinde, yabancı nükleik asitlerin diziye özgü tanınması ve susturulması küçük RNA'lara dayanmaktadır. CRISPR/Cas sistemleri, operon(lar)da düzenlenen Cas genlerinden ve aynı tekrarlarla biraraya gelen benzersiz genom hedefleme dizilerinden (aralayıcılar olarak adlandırılır) oluşan bir CRISPR dizisinden oluşmaktadır (106-108).

CRISPR/Cas aracılı bağışıklık üç adımda gerçekleşmektedir: **Adaptasyon** fazında, bir veya daha fazla CRISPR lokusunu barındıran bakteri, CRISPR dizisinin proksimal ucundaki kısa yabancı dizi fragmanlarını (protospacer) konak kromozomuna entegre ederek viral molekül ve plazmid tehdidine karşı yanıt oluşturmaktadır (106-108). **Ekspresyon ve interferans** fazlarında, aralayıcıların öncü CRISPR (precursor CRISPR RNA (pre-crRNA)) moleküllerine transkripsiyonu, ardından enzimatik bölünme, istilacı viral moleküllerin ya da plazmid hedeflerinin tamamlayıcı protospacer dizileriyle baz çifti oluşturabilen kısa crRNA'ları vermektedir (104, 109-112). Hedef tanıma crRNA'lar tarafından Cas proteinleri aracılığıyla yabancı dizilerin susturulmasını sağlamaktadır (104, 113, 114).

Genişletilmiş haliyle Tip I-VI olmak üzere 6 tip CRISPR-Cas sistemi bulunmaktadır (115). Tip I ve III sistemlerinin bazı özellikleri ortaktır: Cas endonükleazları, pre-crRNA'ları işler ve olgunlaştığında her crRNA, tamamlayıcı nükleik asitleri tanıyabilen ve parçalayabilen büyük bir Cas proteini kompleksi halinde

toplanmaktadır. Buna karşılık Tip II sistemleri, pre-crRNA'daki tekrar dizilerini tamamlayıcı bir trans-aktive-edici crRNA (tracrRNA), Cas9 proteininin varlığında çift sarmallı RNA'ya özgü ribonükleaz RNase III tarafından çalışmasını başlattığı farklı bir mekanizma ile işlemektedir (109, 116). Cas9'un yabancı DNA'nın crRNA bağımlı susturulmasından sorumlu tek protein olduğu düşünülmektedir (103, 117, 118).

2.7. CRISPR-Cas Sisteminin Gelişmiş Sınıflandırması

CRISPR-Cas sistemlerindeki gelişmeyle yeni sınıflandırmaya ihtiyaç duyulmuştur. Bu nedenle CRISPR-Cas sisteminin tipleri ve alt tipleri için spesifik olan Cas genlerini, Cas proteinleri arasındaki dizi benzerliğini, Cas1'in (en iyi korunmuş Cas proteini) filogenisini, CRISPR-Cas lokuslarındaki organizasyonu ve yapısını kapsayacak şekilde yapılmıştır. Bu kriterlerin değerlendirilmesi ile CRISPR-Cas sistemleri iki sınıfa ayrılmıştır (119, 120).

2.7.1. Sınıf 1 CRISPR-Cas Sistemleri

Sınıf 1 sistemleri, bakterilerde daha az görülen tip I ve III'ü, bunun dışında adaptasyon modülünden yoksun ilkel CRISPR-Cas lokuslarını içeren nadir rastlanan tip IV'ü içermektedir.

Tüm tip I lokusları, *Cas3* genini içerir, çift sarmallı DNA ve RNA-DNA çiftini çözme kapasitesine sahip helikazı ve nükleazı kodlamaktadır (119, 121). Bu tipte, interferensi Cascade (antiviral savunma için CRISPR ile ilişkili kompleks) adı verilen bir ribonükleoprotein kompleksi aracılık etmektedir.

Tip III sistemlerinin tamamı, RRM (RNA tanıma motifi)'nin bir alanını içeren nükleaz aktivitesine sahip proteini kodlayan *Cas10* genini taşımaktadır. Tüm tip III lokusları ayrıca küçük alt birim proteinini *Cas5* ve *Cas7* proteinini kodlamaktadır (119).

Tip IV sistemi, genellikle adaptasyon aşamasında Cas proteinlerinden yoksundur ve yabancı genomların bölünmesini hedeflemektedir. *Cas6* proteini pre-crRNA'nın işlenmesine aracılık etmektedir. Tip IV sistemlerin efektör komplekslerinin *Cas5*, *Cas7*

ve büyük alt birim (Csf1) proteinleri içerdiği öne sürülmüştür. Genellikle plazmidler üzerinde lokalizedir ve belirgin adaptasyon modülleri (cas1 ve cas2) ve hedef bölünme enzimleri (cas3 veya cas10) için genleri bulunmamaktadır. Son çalışmalar, tip IV CRISPR-Cas sistemlerinin, tip I veya III sistemlerinden oldukça farklı türevleri olabileceğini düşündürmektedir (122, 123).

2.7.2. Sınıf 2 CRISPR-Cas Sistemleri

Sınıf 2 sistemleri, tek alt birim crRNA efektör modülünün varlığı ile tanımlanan tip II, V ve VI bulunmaktadır. Bu sınıf içindeki tipler ve alt tipler, pre-crRNA işleme mekanizmalarına göre büyük ölçüde farklılık göstermektedir (122). Yeni genom düzenleme araçları arayışında sınıf II sistemlerinde yapılan çalışmalarla 2015 yılında tip V ve VI ile bugünkü genişletilmiş halini almıştır. Bu tiplerin ayırt edici özelliği efektör komplekslerinin tip II'deki Cas9 gibi tek, büyük ve çok alanlı bir proteinden oluşmasıdır (124-126).

Tip II sistemleri, hedef DNA sarmalının ayrılmasından sorumlu nükleaz aktivitesini sağlayan çok alanlı Cas9 proteinine sahiptir (127). Cas9 genine ek olarak, tanımlanan tüm CRISPR-Cas lokusları Cas1 ve Cas2 genlerini içerir ve çoğu tip II lokusları, ilgili CRISPR dizisi içindeki tekrarlara kısmen tamamlayıcı olan bir tracrRNA'yı da kodlamaktadır (127, 128). Bu tipte pre-crRNA'nın işlenmesine RNase III (Cas olmayan protein), tracrRNA ve Cas9 proteini olmak üzere üç faktörün çalışması aracılık etmektedir (122, 129).

Tip V sistemlerinde *cpf1* (Cas12) geni birkaç bakteri ve bir arke genomunda, Cas1, Cas2 ve bir CRISPR dizisine bitişik olarak bulunmaktadır (130). Cpf1, Cas9'un etki alanına homolog olan RuvC benzeri bir nükleaz alanı ve IS605 ailesi transpozonlarının TnpB proteini ile birlikte büyük bir protein ailesidir. Ancak Cpf1, tüm Cas9 proteinlerinde bulunan HNH nükleaz alanını içermemektedir (127, 131).

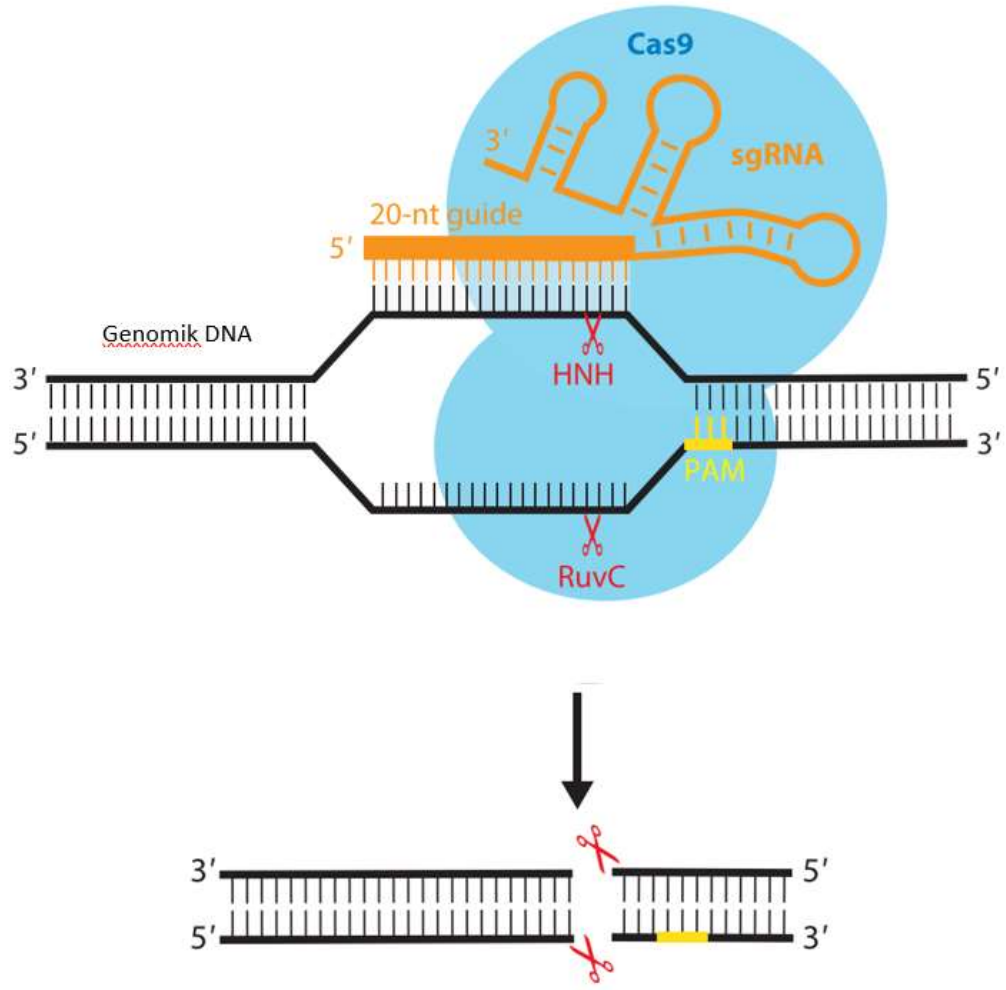
Tüm tip VI efektörlerinde (Cas13), Cas9 ve Cas12'deki RuvC benzeri alanlardan bile daha büyük ölçüde, aşırı dizi farklılığı gösteren HEPN (higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide) alanı bulunmaktadır (132, 133). HEPN süper ailesinin hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda çoğunlukla savunma sistemi ile ilgili

çeşitli işlevlerde yer alan büyük ölçüde farklılaşmış RNazlardan oluştuğu gösterilmiştir (134).

2.8. CRISPR-Cas Enzimleri

CRISPR-Cas sistemlerinin nükleazları spesifik nükleik asit dizilerini bağlamaya ve kesmeye yönlendiren mikroorganizmaları yabancı genetik yapılara karşı RNA hedefli kazanılmış bağışıklık sağlamaktadır (103, 104).

Adaptasyon sürecinde mikroorganizmalar, yabancı genetik yapıları yakalamakta ve bunları genomik CRISPR dizilerine dahil etmektedir. CRISPR dizilerinin transkripsiyonu, Cas nükleazlarına bağlanan ve hedef nükleik asitlerle baz eşleşmesi yaparak özgünlük sağlayan crRNA'ları oluşturmaktadır (104, 105). Doğal olarak gelişen çeşitli CRISPR-Cas sistemleri arasında sınıf 2 sistemleri, hedef girişime veya ayrılmaya aracılık eden büyük bir RNA hedefli Cas nükleazı içermektedir (124). Tip II sistemlerinde hedef DNA endonükleazı Cas9, hassas ve verimli düzenlemeyi sağlayan özelliklere sahiptir. Cas9, crRNA'nın spesifik olarak tanınması ve bunun tracrRNA ile etkileşimi yoluyla yalnızca amaçlanan kılavuz RNA ile birleşmektedir. Buna ek olarak crRNA-tracrRNA'nın biraraya gelmesiyle tek rehber RNA (sgRNA)'ya bağlanabilir ve böylece Cas9 ve sgRNA'dan oluşan iki bileşenli bir sistem oluşturulmaktadır (114). Doğru nükleotid dizilimiyle spesifik motive bitişik (protospacer adjacent motif (PAM)) hedef DNA'ya kararlı bağlanma, Cas9'un çift zincirli DNA'nın (dsDNA) kesilmesini tetikleyen bir etki göstermektedir (135, 136). Cas9'u, değiştirilebilir nükleaz aktivitesi ve sgRNA'nın hedef bölgesini (ya da aralayıcı dizisini) değiştirerek enzimi yeniden yönlendirebilmesi avantajlı hale getirmiştir (Şekil 2-2) (114).



Şekil 2-2: CRISPR-Cas Sisteminde Cas9 ve sgRNA Fonksiyonları (137).

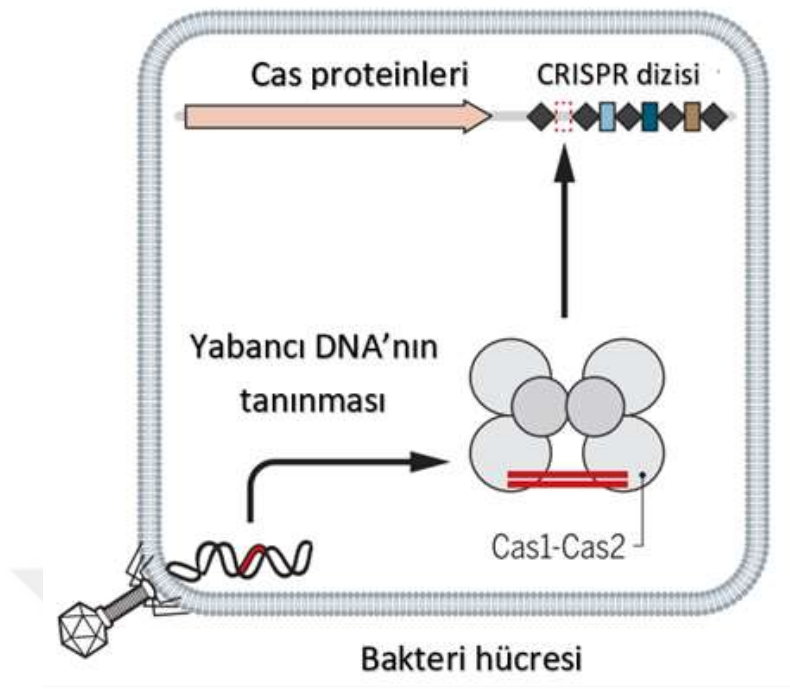
Streptococcus pyogenes Cas9'unun (SpCas9) programlanabilir özelliklerini koruması başarılı bir şekilde kullanılabilmesine ve işlevsel olarak farklı CRISPR-Cas sistemlerinin gelişmesine neden olmuştur. SpCas9'un homologları mühendislik çalışmalarıyla tip II sistemlerinde kullanılmışlardır. 2015 yılında sınıf II sistemlerinin genişletilmesiyle Cas9'un homologları DNA'yı hedefleyen Cas12 ve RNA'yı hedefleyen Cas13, programlanabilir RNA hedefli nükleazlardır. Bu doğal programlanabilirlik özelliği sayesinde CRISPR-Cas sistemleri genom düzenlemede uygulanabilir hale gelmiştir (6, 138).

2.8.1. Cas9 Enzimi

CRISPR-Cas sistemi, CRISPR ile ilişkili gen kümesi (Cas), kodlayıcı özellikte olmayan RNA ve belirleyici tekrarlayan dizileri içermektedir. Bu tekrarlar, protospacer olarak bilinen ekzojen hedef DNA'lardan türetilen kısa değişken diziler tarafından ara boşluklara yerleşir ve birlikte (crRNA) dizisini oluşturmaktadır. Hedef DNA içinde her bir protospacer her zaman spesifik CRISPR sistemine bağlı olarak değişebilen PAM ile ilişkilendirilmektedir (103-105, 115).

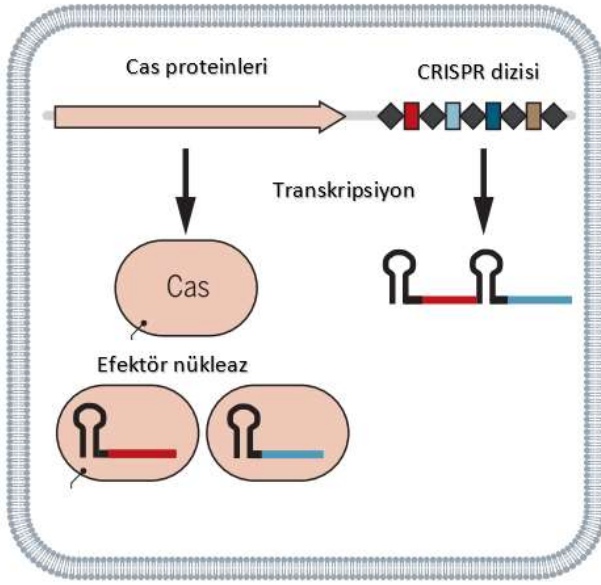
Tip II CRISPR sistemi, rehber RNA'ları kodlayan crRNA dizisi ve crRNA dizisinin ayrı birimler halinde işlenmesini kolaylaştıran tracrRNA'sı olan Cas9 nükleazıyla karakterizedir (117, 139). *S. pyogenes*'ten türetilen bu CRISPR-Cas sisteminde hedef DNA, 5'-NGG PAM dizisinden hemen önce gelmelidir ancak diğer Cas9 ortologlarında *S. thermophilus* ve *Neisseria meningitidis*'teki gibi farklı PAM dizisi gereksinimleri olabilmektedir (114, 117, 140, 141). Tip II sistemleri efektör nükleaz Cas9, crRNA ve tracrRNA kullanarak dsDNA'yı hedeflemektedir. Cas9, PAM'a bitişik sgRNA aralayıcısını tamamlayıcı bir DNA dizisine bağlamaktadır. Aynı zamanda doğru baz eşleşmesini algılar, böylece hedef olmayan ve hedef DNA zincirlerini parçalamak için RuvC ve HNH nükleazları aktive etmektedir (114) (6).

Cas9, hedef DNA ile Watson-Crick baz eşleşmesi yoluyla küçük RNA'lar tarafından yönlendirilen bir nükleazdır ve sgRNA içindeki 20 nükleotidlik kılavuz dizisini değiştirerek, PAM dizisinin yakın çevresindeki hemen hemen her alana doğru yeniden yönlendirilebilmektedir (Şekil 2-3) (114, 117, 142).



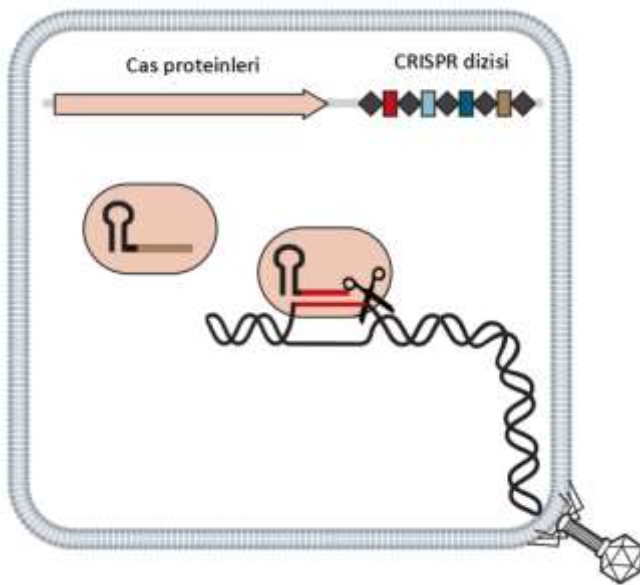
Şekil 2-4 :CRISPR-Cas Sisteminde Adaptasyon (6).

- b) crRNA'nın biyogenezi: CRISPR lokuslarının çok sayıda özgün crRNA'ları ürettiği aşamadır. CRISPR lokusları genellikle lider dizilerde bulunan promotörlerden kopyalanmaktadır. Tekrar dizileri bilinmeyen mekanizmalar tarafından işlenmiştir. Çeşitli arke ve bakterilerden crRNA'larının 5' uçlarında 8 nükleotidlik bir dizi bulunmakta ve muhtemelen bir Cas proteini bağlama bölgesi olarak görev yapan bir crRNA önemli bir rol oynamaktadır (104, 105, 108, 109, 147). Hem palindromik hem de düzenli olmayan tekrarlı crRNA'ların tanınması, precrRNA'nın biyogenez enzimlerinin biyokimyasal ve yapısal çalışmaları kapsamlı bilgiyi sağlamıştır (148-150). Aynı zamanda, Csn alt tip sistemlerine sahip bakterilerde çok farklı bir pre-crRNA biyogenez mekanizması bulunmuştur. CRISPR-Cas bölgesi içinde kodlanan bir RNA, RNaz III ve muhtemelen Csn1 tarafından işlenen pre-crRNA'nın tekrar dizisi ile bir yapı oluşturmaktadır (Şekil 2-5) (109).



Şekil 2-5: CRISPR-Cas Sisteminde crRNA'nın Biyogenezi (6).

- c) İstilacının engellenmesi : Bu aşamada crRNA-Cas proteini efektör kompleksleri, crRNA'nın baz eşleşmesi yoluyla DNA ve RNA'yı tanımaktadır. Cmr ve Csn sistemleri sırasıyla hedef RNA ve DNA'nın ayrılmasını etkiler. PAM'lar bazı DNA hedefleme sistemleri için istilacıların tanınmasında önemli yardımcı sinyaller sağlamaktadır (Şekil 2-6) (103-105, 117, 147, 151).



Şekil 2-6: CRISPR-Cas Sisteminde İstilacının Engellenmesi (6).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Tıp Fakültesi'nin Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 21/02/2020 tarihinde onay (Dosya No:2020/321) alınmıştır. Bu çalışmaya Haziran-Ağustos 2020 tarihleri arasında İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Bilim Dalı Rutin Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen karbapenemlere disk difüzyon yöntemiyle dirençli bulunan *K. pneumoniae* izolatları (n=5) dahil edilmiştir. Triptik soy agar besiyerine pasaj alınan suşlar 37°C'de 18-24 saatlik inkübasyondan sonra çalışmada kullanılmak üzere -80°C'de gliserin içeren triptik soy buyyonda saklamaya alınmıştır.

3.1. Bakterilerin Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılık Deneyleri

Suşlar konvansiyonel yöntemler kullanılarak tanımlanmıştır. İzolatların oksidaz, katalaz ve oksidasyon-fermentasyon özellikleri incelendikten sonra *K. pneumoniae*'nin identifikasyonu için gerekli olan hareket aktivitesi, VP reaksiyonu, sitrat, üre, H₂S oluşumu, indol, lizin ve ornitin dekarboksilaz testleri yapıldı Antibiyotik duyarlılık testleri European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemiyle yapılmıştır (152). 18-24 saatlik kültürde üreyen kolonilerden 0,5 McFarland bulanıklığında olacak şekilde Mueller-Hinton sıvı besiyerine alınmıştır. Bakteri süspansiyonundan steril eküvyonla alınarak Mueller-Hinton agarın tüm yüzeyine yayılmıştır. Besiyeri yüzeyinin kurumasi için 5-15 dk beklenerek ampisilin, sefazolin, sefoksitin, seftriakson, sefotaksim, ampisilin-sulbaktam amoksisilin-klavulanik asit, sefepim, seftazidim, imipenem ve meropenem, ertapenem, amikasin, gentamisin, tobramisin, siprofloksasin, trimetoprim sulfametaksazol, nitrofurantoin, norfloksasin ve fosfomisin diskleri (Oxoid, İngiltere) yerleştirilmiştir. 37°C'de, aerob koşullarda 18-24 saat inkübasyon sonrasında inhibisyon zon çapları ölçülmüştür. İmipenem, ertapenem, meropenem dirençli olanlar kaydedilmiştir. Kontrol suşları olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Escherichia coli* ATCC 35218 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 kullanıldı. Kontrol suşları İstanbul Tıp Fakültesi, Mikroorganizma ve Kültür Koleksiyonları Merkezi'nden (KÜKENS) sağlanmıştır.

3.2. Karbapenemlere Duyarlılıklarının Belirlenmesi

İzolatların EUCAST kriterlerine göre sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle imipenem, meroperem ve ertapenem için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri araştırılmıştır. Her bir izolatın 18-24 saatlik saf kültüründen 0,5 McFarland bulanıklığında olacak şekilde süspansiyon hazırlanmıştır. EUCAST klinik sınır değerlerine göre antibiyotik konsantrasyonları 2-256 µg/mL aralığında belirlenmiş ve buna göre seri seyreltmeleri yapılmıştır. Hazırlanan bakteri süspansiyonundan 10 µl alınıp 96 kuyucuklu antibiyotik içeren pleytlere eklenmiş ve 37 °C'de 16-18 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında pleytler siyah zemin üzerinde incelenmiş bakterilerin üremesini inhibe eden en düşük konsantrasyonları MİK değerleri olarak kaydedilmiştir. MİK'lerin belirlenmesinde *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 standart suşları kontrol olarak kullanılmıştır (152).

3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğul dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında OXA-48-benzeri, NDM-1, CTXM-15 genleri araştırıldı.

3.3.1. Bakteri DNA'sının ekstraksiyonu

37 °C'de 18- 24 saat üreyen izolatlardan 1-2 koloni steril tek kullanımlık öze yardımıyla 50 µl steril distile su bulunan ependorf tüplerinde süspanse edildi. Tüpler ısıtıcı bloğunun içerisinde 95 °C'de 10 dakika bekletildi, 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek üstteki sıvı, kalıp DNA olarak kullanıldı.

3.3.2. Amplifikasyon

Amplifikasyon karışımı son hacim 25 µl olacak şekilde; DreamTaq Green PCR Buffer (2X) 2,5µl, DNA 0,5 µl, primerler (Forward/Reverse) 2,5 µl, 10 mM içeren

dNTP karışımından 0,5 µl, Dream Taq DNA polimeraz (5 U/µL) 0,25 µL, distile su 18,75 µl kullanılarak hazırlandı.

PCR protokolü modifiye edilerek (BioRad T100 Thermal Cyclers) ilk denatürasyon 94 °C’de 5 dakika; denatürasyon 94 °C’de 60 saniye, primer bağlanması 56 °C ’de (bla_{OXA-48} benzeri), 60 °C’de (bla_{NDM-1}, 62°C’de (bla_{CTXM-15}) 45 saniye, uzama 72 °C’de 1 dakika, toplam 35 döngü ve son uzama 72°C’de 7 dakika olacak şekilde uygulanmıştır (77, 153). OXA-48, NDM-1, CTXM-15 genlerinin saptanmasında kullanılan primerler Tablo 3-1’de verilmiştir.

Tablo 3-1 : OXA-48, NDM-1, CTXM-15 genlerinin saptanmasında kullanılan primerler.

Primer	Nükleotid dizisi (5’-3’)	Amplikon büyüklüğü (bp)	Kaynak
OXA-48-F	TTGGTGGCATCGATTATCGG	743	(6)
OXA-48-R	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC		
NDM-1-F	TCTCGACATGCCGGGTTTCGG	475	(7)
NDM-1-R	ACCGAGATTGCCGAGCGACTT		
CTXM-15-F	CGCTTTGCGATGTGCAG	550	(8)
CTXM-15-R	ACCGCGATATCGTTGGT		

3.3.3. Agaroz jelin hazırlanması

Amplifikasyon ürünleri etidyum bromür ile boyanan % 1’lik 1X TAE (40 mM Tris, 20 mM asetik asit, 1 mM EDTA) bufferdan hazırlanan agaroz jelde 120 V da 30 dakika yürütülerek UV ışığı altında görüntülenmiştir.

3.4. Transformasyonda Plazmidlerin Seçiliminde Kullanılacak Antibiyotiklerin Duyarlılıklarının Belirlenmesi

K. pneumoniae suşlarının üretilmesi ve antibiyotik duyarlılık deneylerinde kullanılmak üzere LB (Luria Bertani) katı ve sıvı besiyeri hazırlanmıştır.

LB katı besiyeri

12,5 g agar, 10 g tripton, 10 g NaCl, 5 g maya ekstraktı tartılarak 1 lt distile içerisinde 125 µl NaOH eklenerek pH 7,2-7,5 ayarlanarak otoklavda 121° C’de 1 atm’de 15 dakika steril edilmiştir.

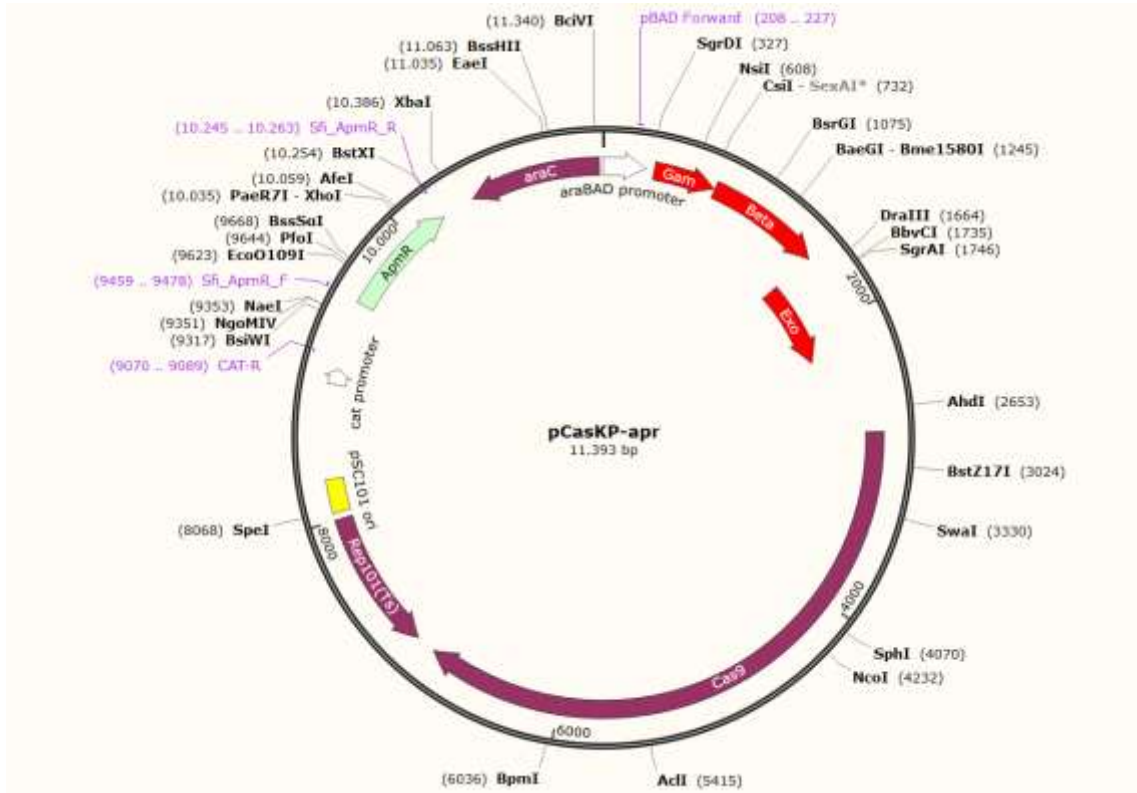
LB sıvı besiyeri

10 g tripton, 10 g NaCl, 24 g maya ekstraktı tartılarak 1 lt distile içerisinde 125 µl NaOH eklenerek pH 7,2-7,5 ayarlanarak otoklavda 121° C’de 1 atm’de 15 dakika steril edilmiştir.

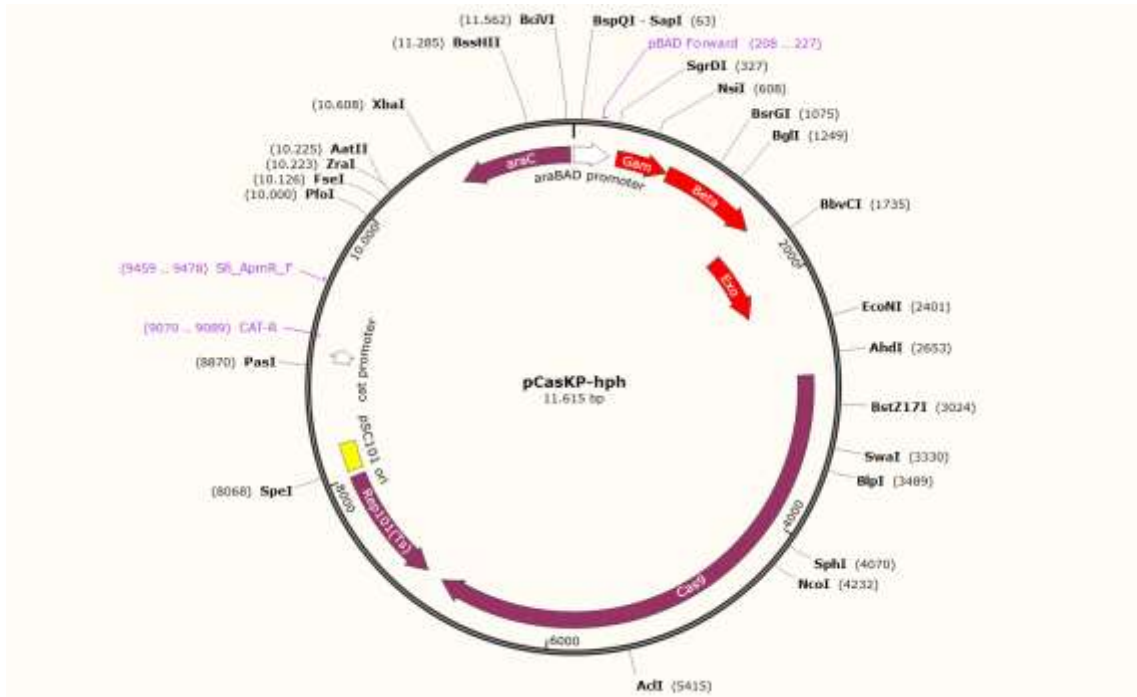
Klonlamada seçim yapabilmek amacıyla 1-0,0625 mg/mL konsantrasyonlarında kanamisin, spektinomisin, streptomisin, higromisin, kloramfenikol ve apramisin duyarlılıkları sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılmıştır.

3.5. Plazmidlerin Belirlenmesi

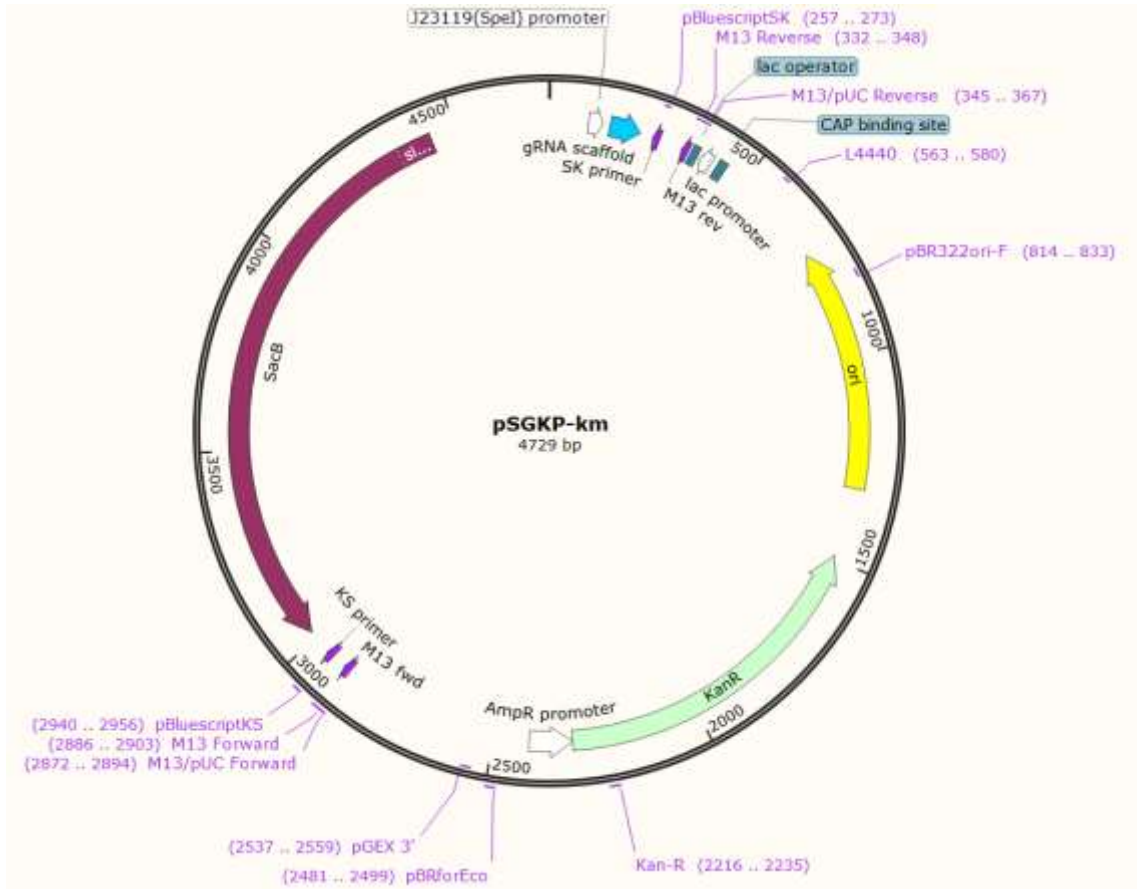
K. pneumoniae bakterileri ile yapılan çalışmada kullanılan plazmidler pCasKP-apr (Addgene ID: 117231) (Şekil 3-1), pCasKP-hph (Addgene ID: 117232) (Şekil 3-2), pSGKP-km (Addgene ID: 117233) (Şekil 3-3), pSGKP-spe (Addgene ID:117234) (Şekil 3-4), pBECKP-km (Addgene ID: 117235) (Şekil 3-5), pBECKP-spe (Addgene ID: 117236) (Şekil 3-6) ticari olarak Addgene firmasından temin edilmiştir (154).



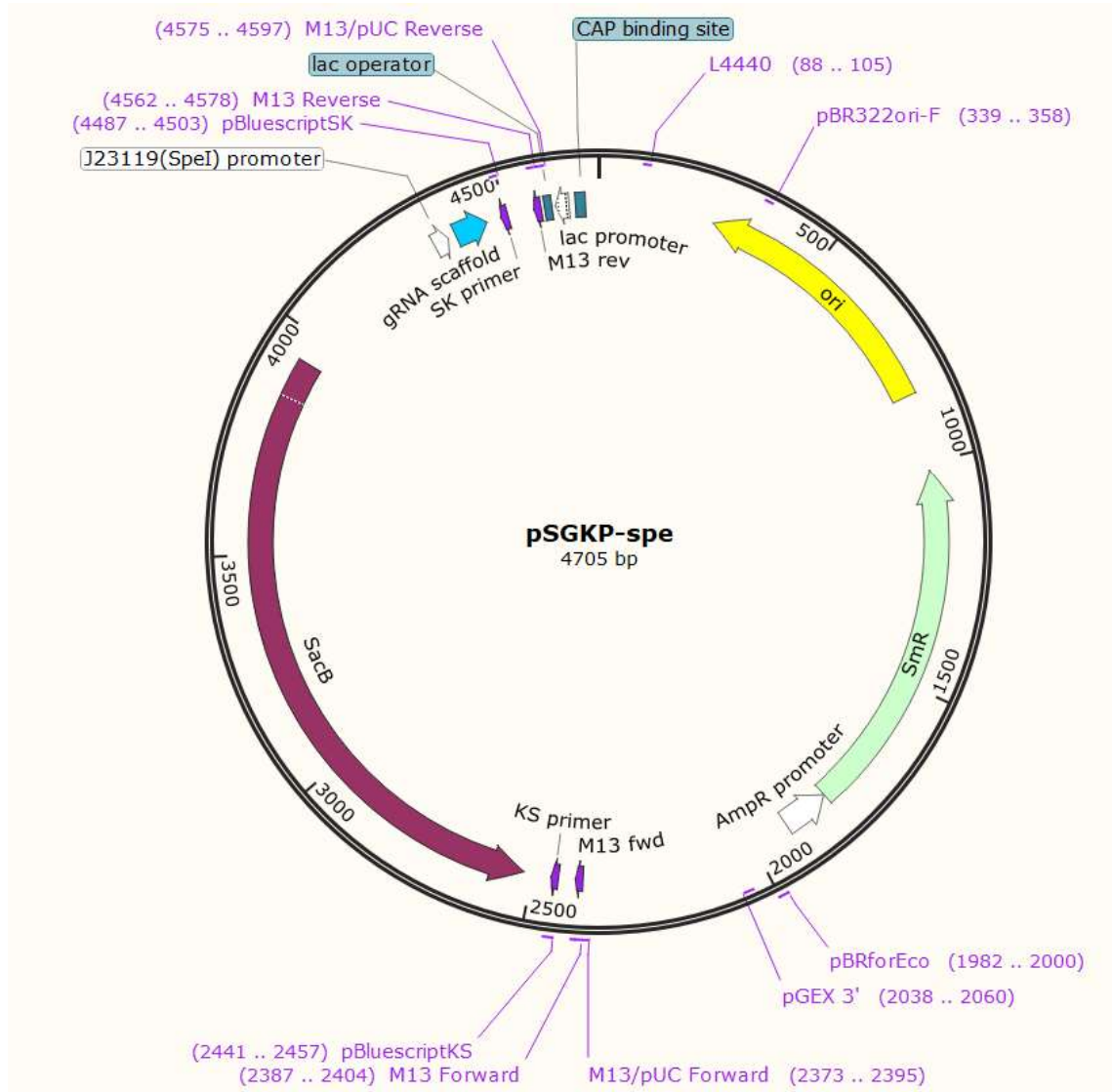
Şekil 3-1 : pCasKP-apr (Addgene ID: 117231) plazmidinin haritası.



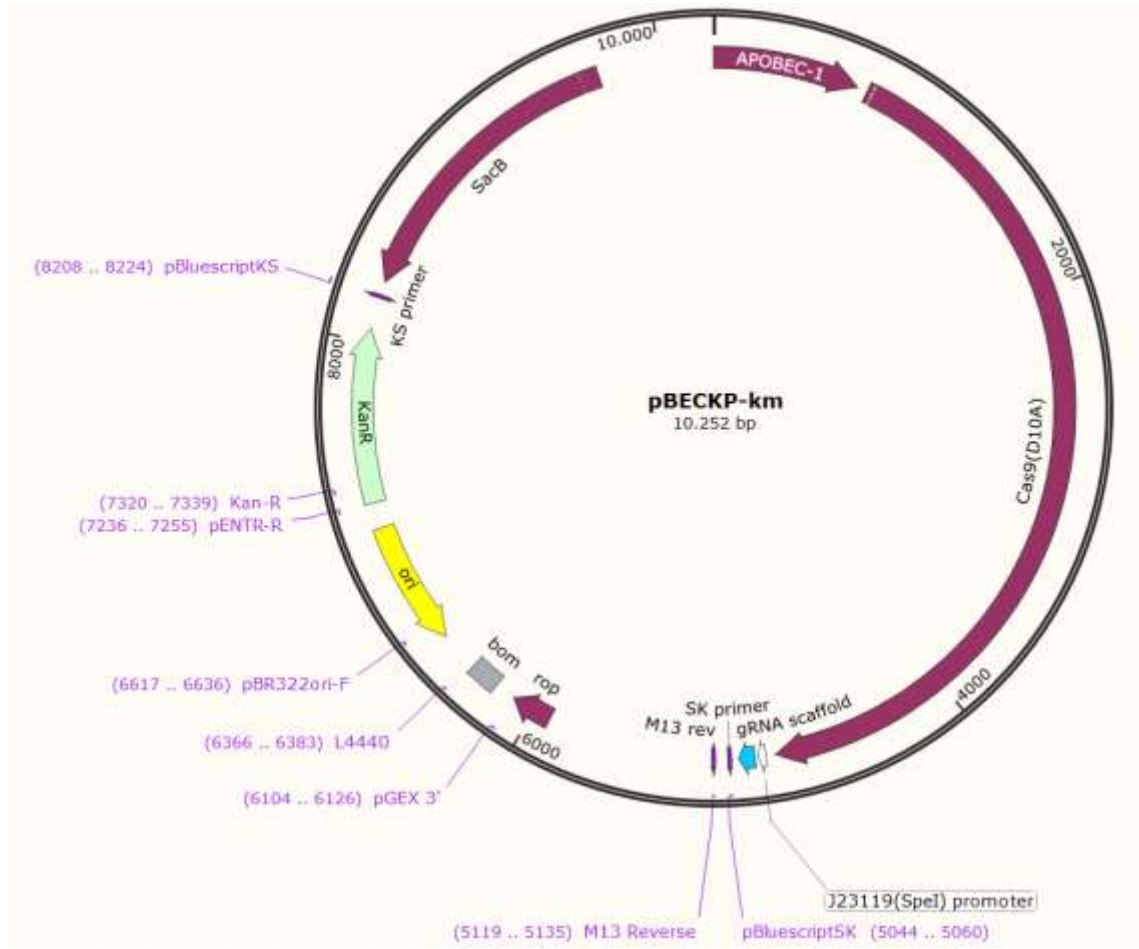
Şekil 3-2: pCasKP-hph (Addgene ID: 117232) plazmidinin haritası.



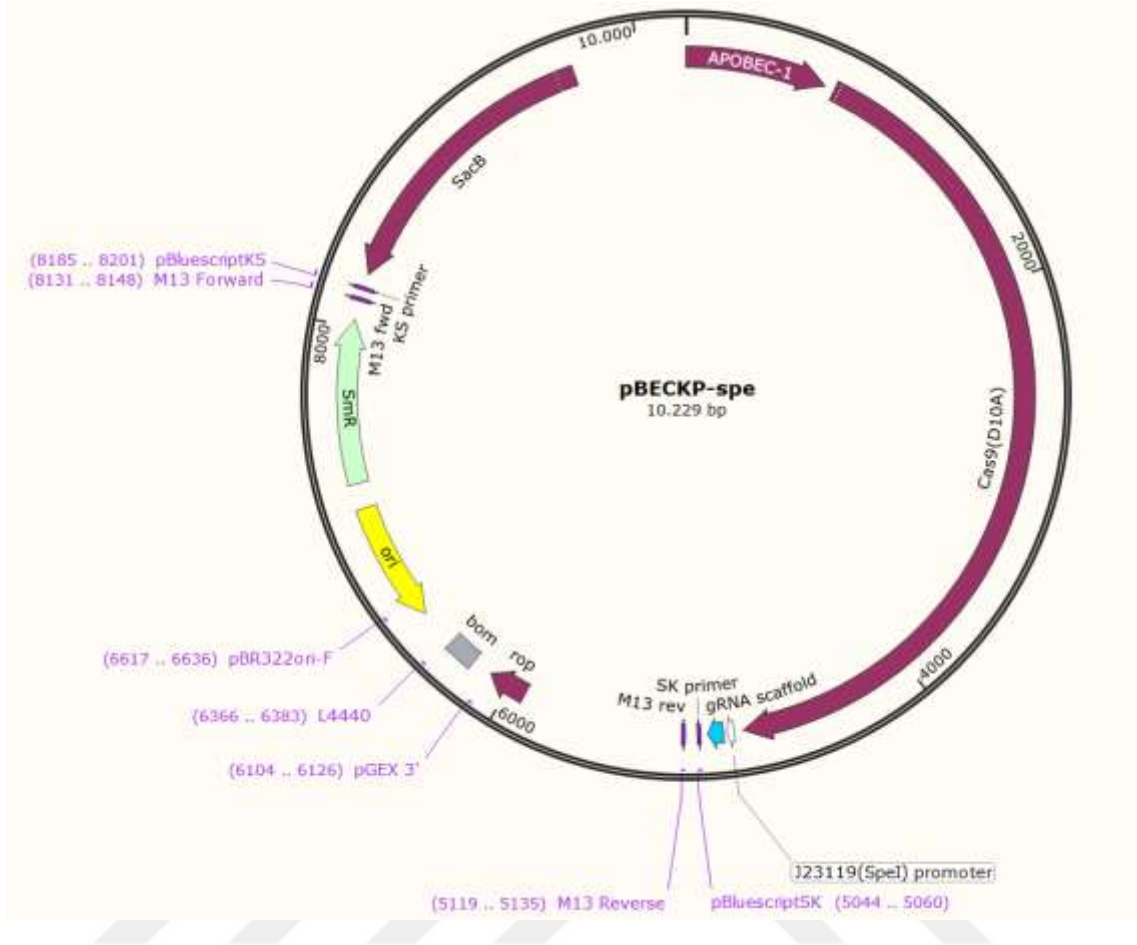
Şekil 3-3 : pSGKP-km (Addgene ID: 117233) plazmidinin haritası.



Şekil 3-4 : pSGKP-spe (Addgene ID:117234) plazmidinin haritası.



Şekil 3-5 : pBECKP-km (Addgene ID: 117235) plazmidinin haritası.



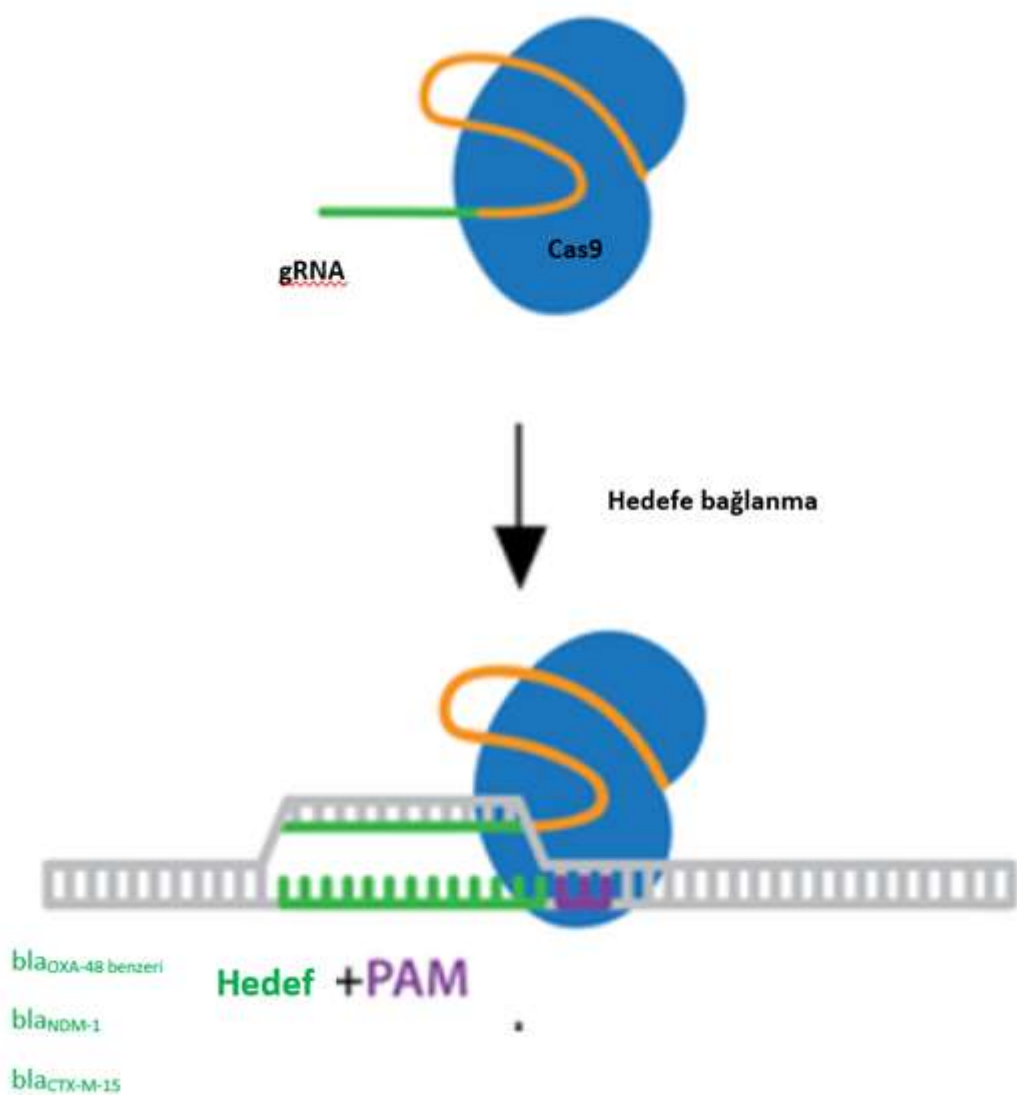
Şekil 3-6 : pBECKP-spe (Addgene ID: 117236) plazmidinin haritası.

3.6. *bla*_{OXA-48} benzeri, *bla*_{NDM-1} ve *bla*_{CTX-M-15} Genlerinin Dizi Analizleri ve Hedef Bölgelerin Tayini

K. pneumoniae suşlarında, karbapenem direncinden sorumlu olan OXA-48 ve NDM-1 genleri ve sefotaksim direncinden sorumlu olan CTX-M-15 gen bölgelerinin Sanger dizileme yöntemi ile dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Gen bölgelerinin dizi analizi sonuçlarının eldesi ve doğrulanmasını takiben, her bir gen için, gen dizilerinin hizalaması yapılmıştır.

İzolatlardan OXA-48, NDM-1, CTX-M-15 direnç genlerinin dizileme sonuçlarına göre CRISPR-Cas9 sisteminde kullanılmak üzere her biri için gRNA (guide RNA) primer dizileri SnapGene ve ClustalX2 programı kullanılarak tasarlanmış ve MacroGen Europe firması tarafından sentezlenmiştir.

Direnç genlerinin korunmuş bölgelerinde öncelikle PAM (protospacer adjacent motif) motiflerinin varlığına bakılmış, ortak korunan ve PAM motiflerini takip eden 20 nükleotidlik korunmuş bölgeler potansiyel hedeflerdir. Cas9 proteini için NGG'dir. Hedef bölgelerin skorlaması Benchling web sunucusu üzerinde sekans sonuçları girilerek (<https://www.benchling.com/>) gerçekleştirilmiştir. Yüksek skorlu hedef bölgeler üzerinden ise primerler (ileri primer – 5'- TAGT-N20 (hedef), geri primer – 5'- AAAC-N20 (hedef ters kompleman)) oluşturulmuştur (Şekil 3-7). Bu primerler Macrogen Europe firması tarafından sentezlenmiştir.



Şekil 3-7: Hedef genler ve PAM dizileri.

3.7. Hedef Bölgelerin PCR ile Çoğaltılması

CRISPR-Cas ikili plazmid sistemi (CRISPR-Cas9 (kromozomal) ve CRISPR destekli sitidin deaminaz (plazmid kaynaklı)) tasarlanmıştır (154). Bu plazmidlerin oluşturulması için Addgene'den ticari olarak temin edilen plazmidlerden hedeflenen bölgeler Tablo 3-2'de gösterilmiştir.

pUC19 (Addgene ID:50005) vektöründen AmpR(Pro) (ampisilin direnç promotörünün) (Şekil 3-8), pCasKP-apr plazmitten araBAD bölgesinin (Şekil 3-9) ve ApmR (Apramisin direncini) kodlayan bölgenin (Şekil 3-10) çoğaltılması amaçlanmıştır (Tablo 3-3). Bu üç PCR reaksiyonunda amplifikasyon karışımı ve programı ortaktır.

Tablo 3-2: Plazmidlerden hedeflenen bölgeler.

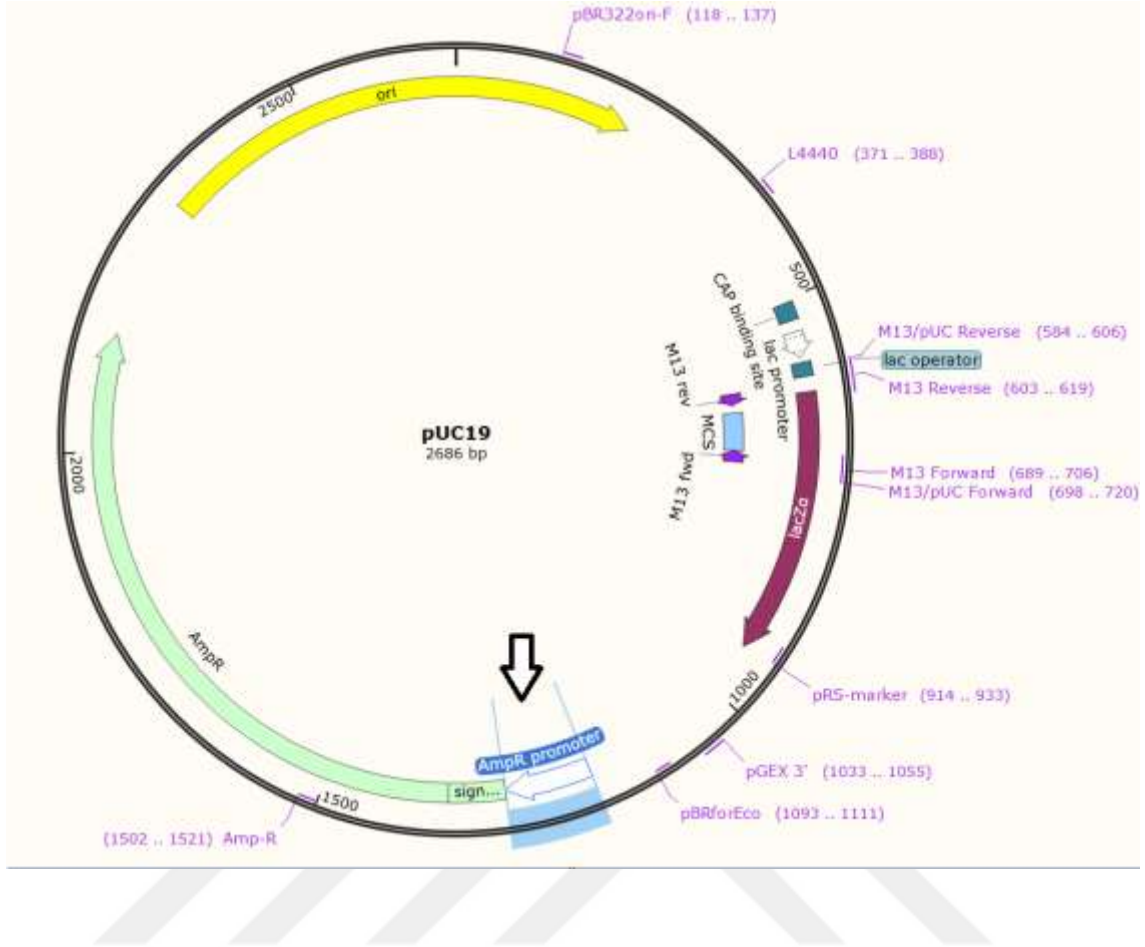
Plazmid	Çoğaltılacak bölge	Fonksiyon	Şekil
pUC19	AmpR(Pro)	Direnç promotörü	Şekil 3-7
pCasKP-apr	AraBAD	<i>araC</i> geni promotörü	Şekil 3-8
pCasKP-apr	ApmR	Apramisin direnci	Şekil 3-9
pCasKP-apr	Cas9	Cas9 nükleazı (Hedef DNA'nın kesilmesi)	Şekil 3-11
pBECKP-km	Cas9(D10A)-APOBEC1	Sitidin deaminaz (baz düzenleyici)	Şekil 3-10

Amplifikasyon karışımı son hacim 25 µl olacak şekilde 5X Phusion Buffer 5 µl, DNA (20 ng) 1 µl, 10 mM içeren dNTP karışımından 0,5 µl, Primerler (F/R) 2,5 µl, Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/µL) 0,5 µl ve distile sudan 15,5 µl kullanılarak hazırlanmıştır. Amplifikasyon programı 98 °C'de 2 dakika; 98 °C'de 15 saniye, 56 °C'de 10 saniye, 72 °C'de 20 saniye toplam 30 döngü; 72 °C'de 2 dakika

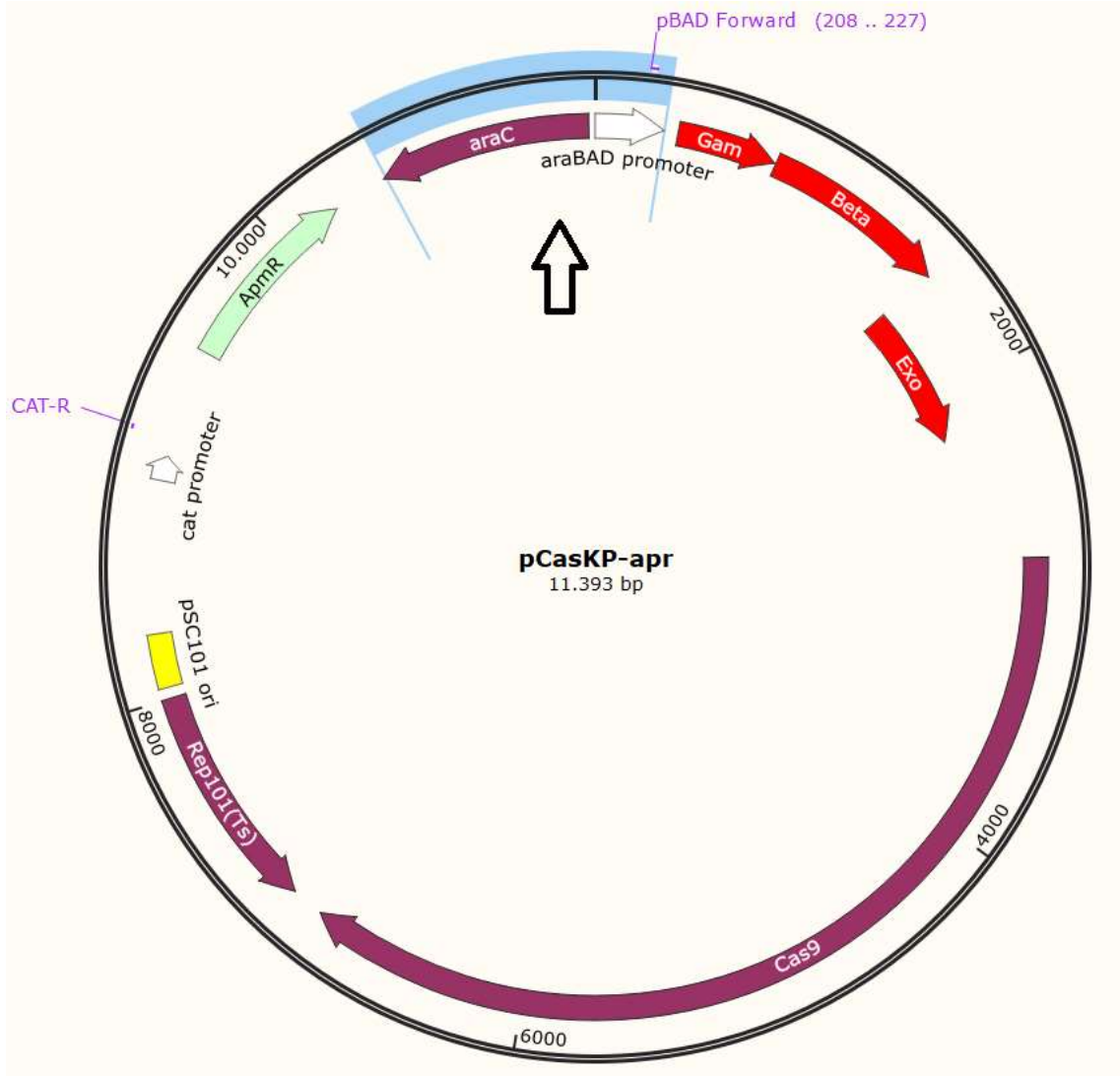
olacak şekilde uygulanmıştır. Amplifikasyon ürünleri, etidyum bromür ile boyanan % 1'lik agaroz jelde 120 V da 30 dakika yürütülerek UV ışığı altında görüntülenmiştir.

Tablo 3-3 : Ana vektörde (pSGKP-spe-AmpR(Pro)-AprR-Cas9) kullanılacak hedef bölgelerin primerleri.

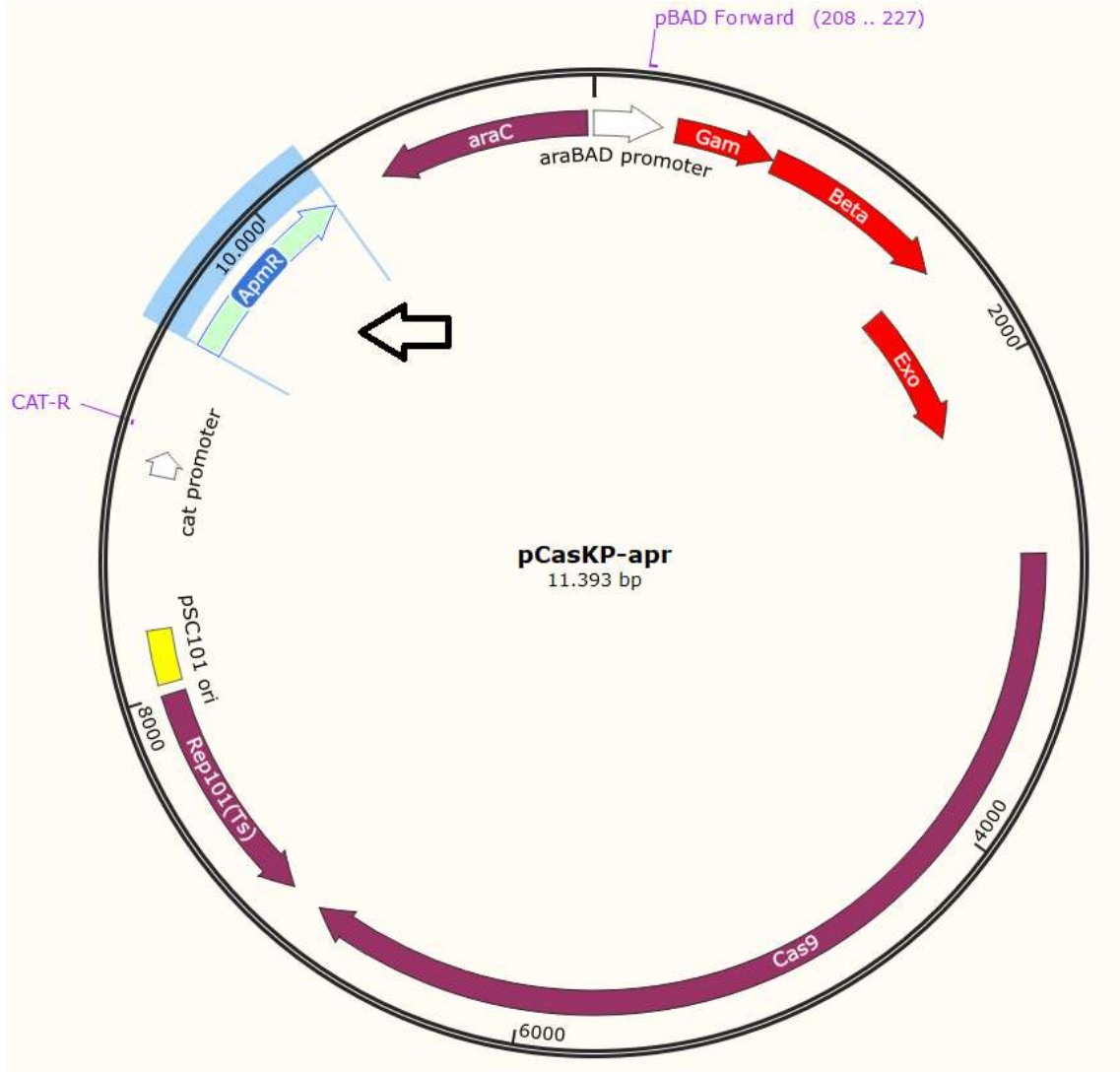
Hedef bölge	Nükleotid dizisi (5'-3')	Amplikon büyüklüğü (bp)
AmpR(Pro)	F-CGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTC	154
	R-TCACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGC	
AraBAD	F-TTATGACAACCTTGACGGCTACATC	1190
	R-ATGGAGAAACAGTAGAGAGTTGC	
ApmR	F-GAGAGTATGTCATCAGCGGTGGAGTG	829
	R-AGTAAACTCAGCCAATCGACTGGCGAG	
Cas9	F-ATGGATAAGAAATACTCAATAGGC	4108
	R-TCAGTCACCTCCTAGCTGAC	
Cas9(D10A)-APOBEC1	F-ATGAGTAGCGAAACCGGTC	4841
	R-TCAGTCACCTCCTAGCTGAC	



Şekil 3-8 : pUC19 vektöründe AmpR promotör bölgesi.



Şekil 3-9 : pCasKP-apr (Addgene ID: 117231) plazmitte AraBAD bölgesi.

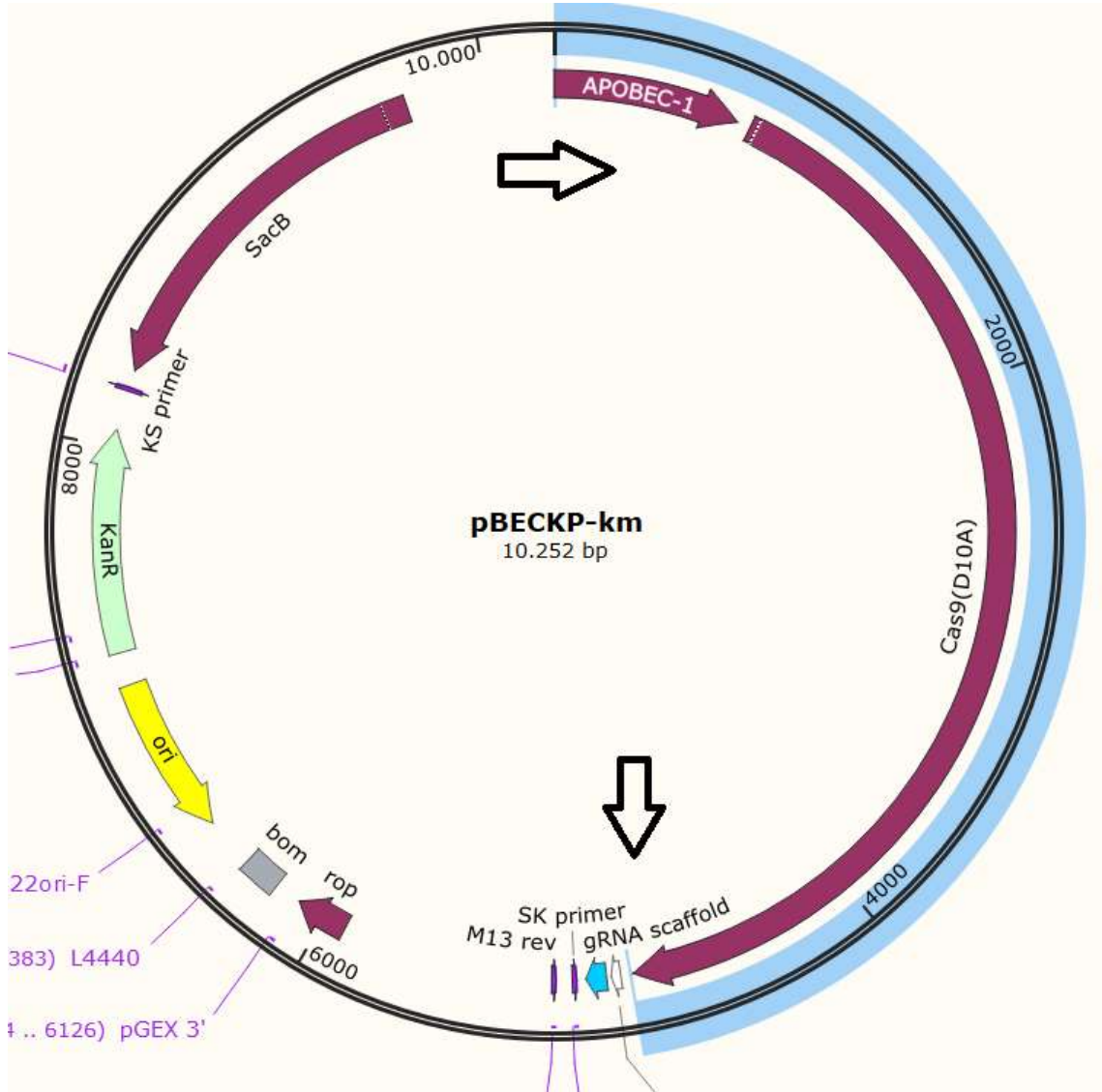


Şekil 3-10 : pCasKP-apr (Addgene ID: 117231) plazmitten apramisin direnç bölgesi.

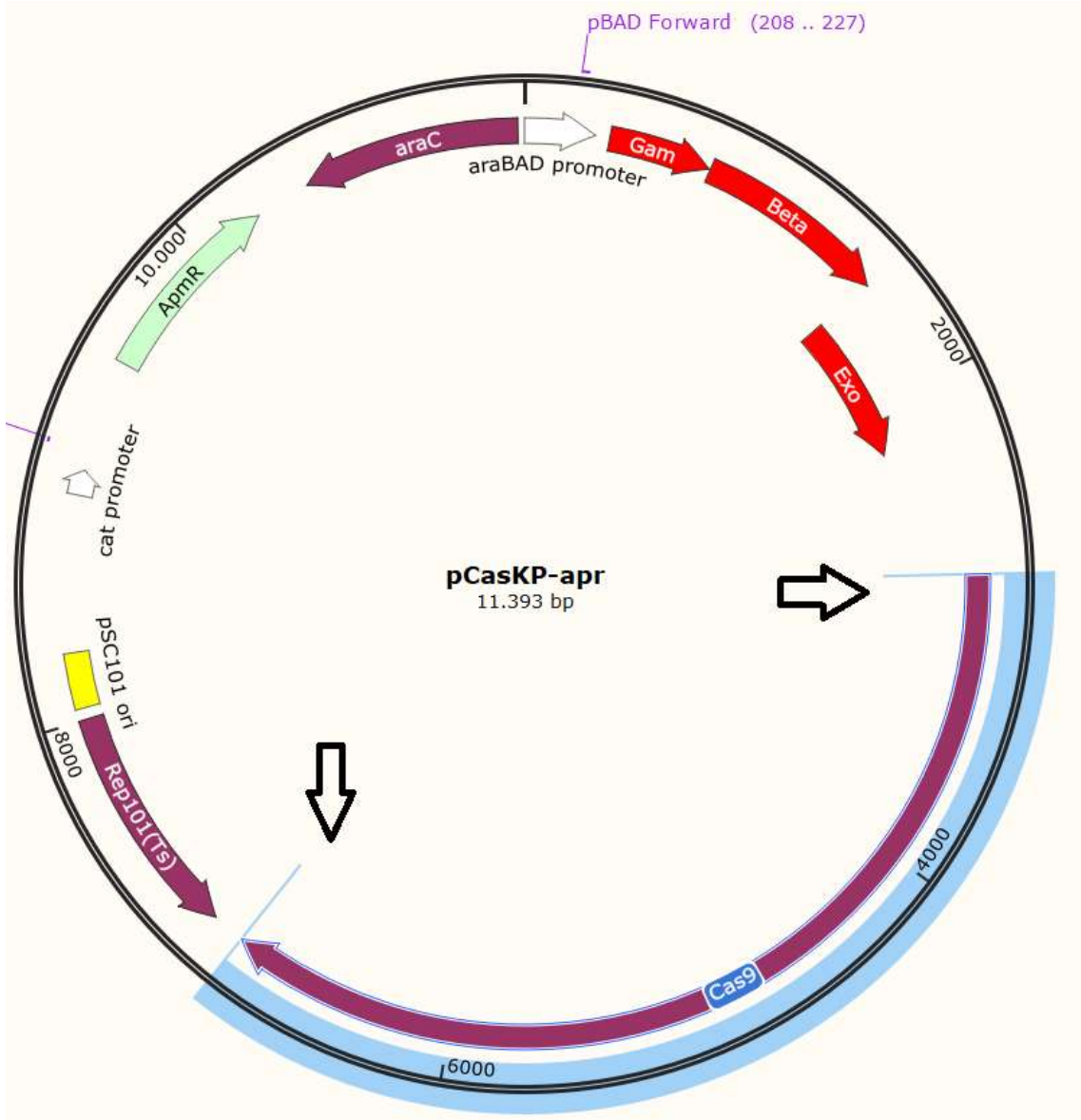
pBECKP-km plazmitten Cas9(D10A) nikaz, sitidin deaminaz (APOBEC1) bölgesi (Şekil 3-11) ve pCasKP-apr plazmitten Cas9 proteinin (Şekil 3-12) çoğaltılması amaçlanmıştır (Tablo 3-2). Her iki PCR reaksiyonunda amplifikasyon karışımı ve programı ortaktır. Amplifikasyon karışımı son hacim 25 µl olacak şekilde 5X Q5 Reaction Buffer 5 µl, 5X Q5 High GC Enhancer 5 µl, primerler (F/R) 2,5 µl, 10 mM içeren dNTP karışımından 0,5 µl, DNA (20ng) 1 µl, Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase 0,25 µl ve distile su 10,5 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Amplifikasyon programı 98 °C’de 2 dakika; 98 °C’de 15 saniye, 66 °C’de 30 saniye, 72 °C’de 5 dakika toplam 10 döngü; 98 °C’de 15 saniye, 56 °C’de 30 saniye, 72 °C’de 5 dakika toplam 15 döngü 72 °C’de 5 dakika olacak şekilde uygulanmıştır. Amplifikasyon ürünleri, etidyum

bromür ile boyanan % 1'lik agaroz jelde 120 V da 30 dakika yürütülerek UV ışığı altında görüntülenmiştir.

İstenilen bantlar jelden kesilip, saflaştırma kiti (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, Macherey Nagel) ile üretici firmanın önerdiği işlem basamakları takip edilerek saflaştırılmıştır.



Şekil 3-11 : pBECKP-km (Addgene ID: 117235) plazmitten APOBEC1-Cas9(D10A) bölgesi.



Şekil 3-12 : pCasKP-apr (Addgene ID: 117231) plazmitte Cas9 bölgesi.

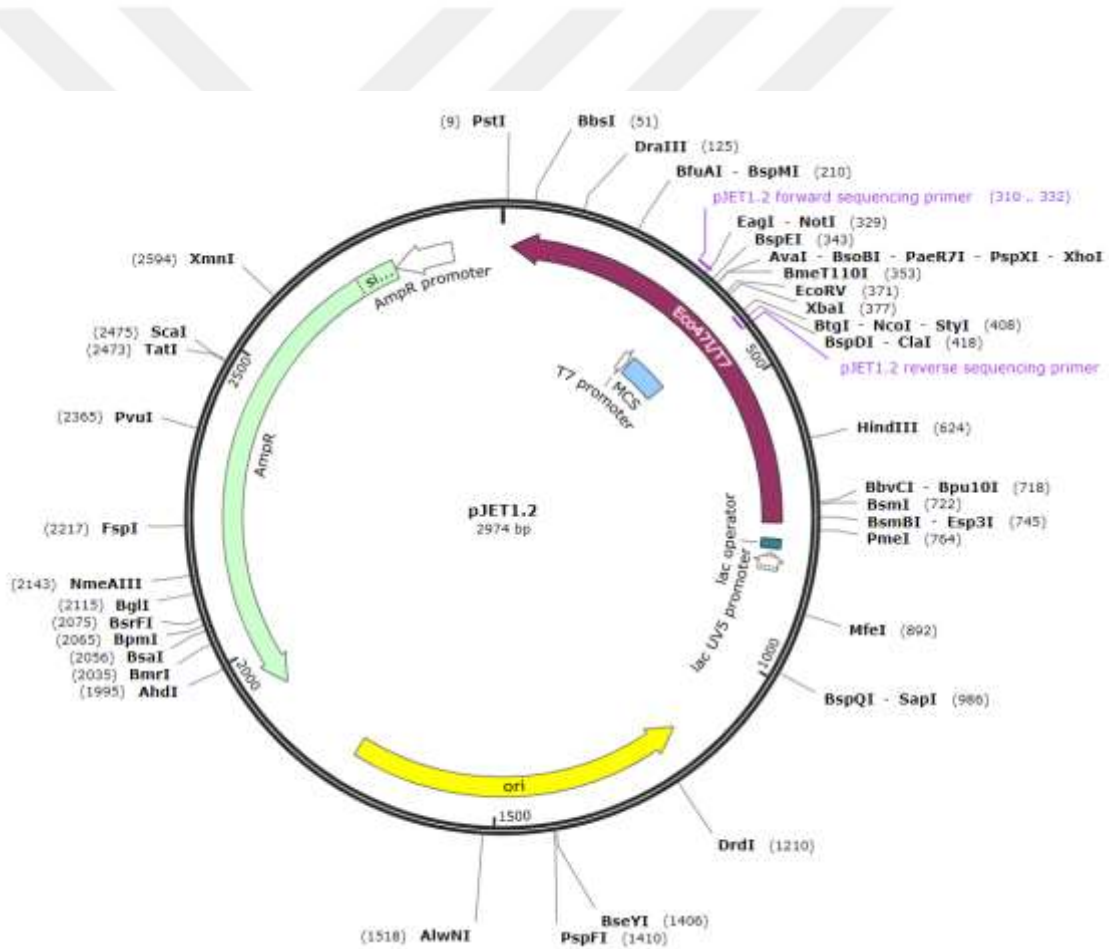
3.8. Ara Vektöre (pJET1.2) Klonlama

PCR ile çoğaltılan hedef bölgelerin ayrı ayrı ara vektöre klonlanması için vektörde öncelikle her biri için vektör DNA'da sadece bir kesim yerine sahip olan restriksiyon endonükleaz seçilerek sirküler DNA'nın sadece açılması sağlanmıştır.

Cas9 nikaz (Cas9D10A), sitidin deaminaz (APOBEC1), araBAD, ApmR, Cas9 ve AmpR(Pro) hedef bölgeleri ara vektör olarak kullanılan pJET1.2 ye (Şekil 3-13) klonlanması amacıyla Eco32I enzimi seçilmiştir. Kesim reaksiyonu, pJET1.2

vektöründen 7µl (50 ng olacak şekilde), FastDigest Green Buffer(10X) (Thermo Scientific, ABD) 2µl, Eco32I 0,5 µl ve toplam hacim 20 µl olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. Reaksiyon tüpü 37 °C’de 1 saat bekletilerek vektör DNA’nın kesilmesi sağlanmıştır.

Ardından % 1’lik agaroz jelde 120 V da 30 dakika yürütülerek UV ışığı altında görüntülenmiştir. İstenilen bant jelden kesilip, saflaştırma kiti ile üretici firmanın önerdiği işlem basamakları takip edilerek saflaştırılmıştır. DNA konsantrasyonları (ng/µl) (~150-300ng/µl) Mikro Hacimli Spektrofotometre (Nanodrop) (DeNovix DS-11 Spectrophotometer) kullanılarak ölçülmüştür. DNA’lar kullanılıncaya kadar -20° C’de saklanmıştır.



Şekil 3-13 :pJET 1.2 plazmidinin haritası.

3.8.1. Kompetan Hücresinin Hazırlanması

Transformasyonda kullanılmak üzere *E. coli* DH10B suşu kalsiyum klorür (CaCl_2)'lü kimyasal yöntem ile kompetan hücre haline getirilmiştir. Öncelikle DH10B suşundan LB katı besiyerine ekim yapılmış ve 37°C 'de 18-24 saatlik inkübasyon uygulanarak taze kültür elde edilmiştir. LB agarda oluşan tek kolonilerden seçilip 4 mL LB sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. 37°C 180 rpm'de 18 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda kültürden 10 mL alınarak 1L LB sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve 37°C 180 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Kültür ortamının absorbans değeri Mikro Hacimli Spektrofotometrede her saat ölçülmüş, OD_{600} değeri 0.2'nin üzerine çıktığında 15-20 dakika aralıklarla ölçülmüştür. Absorbans değeri 0,35-0,4'e ulaştığında inkübasyon durdurulmuş, 1L'lik kültür 250 mL'lik soğukta bekletilmiş santrifüj tüplerine bölünmüş ve kültür 4°C 'de 4000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra her bir tüp üzerine 100 mL soğuk 100 mM MgCl_2 ilave edilip yavaşça süspanse edilmiş, tüm süspansiyonlar tek bir tüpte toplanmış ve 4°C 'de 3000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant dökülmüş ve pelet yaklaşık 200 mL soğuk CaCl_2 içinde yeniden süspanse edilmiştir. Bu süspansiyon en az 20 dakika buz üzerinde bekletilmiş ve 4°C 'de 3000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve % 15 gliserolde pelet 50 mL soğuk 85 mM CaCl_2 içinde yeniden süspanse edilmiş, ependorfa aktarılmıştır. 4°C 'de 2000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant dökülmüş ve % 15 gliserolde pelet 2 mL soğuk 85 mM CaCl_2 içinde yeniden süspanse edilmiştir. Ependorflarda 50 μl olacak şekilde steril şartlarda bölünmüş ve -80°C 'de saklanmıştır (155).

3.8.2. T4 DNA Ligaz ile Ligasyon

pJET 1.2 ara vektöre ligasyonundan önce aşağıdaki formül kullanılarak ihtiyaç duyulacak PCR ürünü miktarı belirlenmiştir.

$$X = (Y) \cdot (50 \text{ ng pJET 1.2 vektör}) / \text{vektörün uzunluğu} (= \sim 3000\text{bp})$$

X: Ligasyon reaksiyonunda kullanılacak PCR ürünü miktarı (ng)

Y: Ligasyon reaksiyonunda kullanılacak PCR ürününün uzunluğu (bp)

Kullanılacak PCR ürünü miktarı belirlendikten sonra Tablo 3-4 'te içeriği belirtilen ligasyon reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Negatif kontrol amaçlı PCR ürünü yerine steril distile su ile hazırlanan ligasyon karışımı kullanılmıştır. Hazırlanan reaksiyonlar yavaşça pipetle karıştırılarak oda ısısında 1 saat bekletilmiştir.

Tablo 3-4 : Ligasyon reaksiyon içeriği.

Bileşen	Miktarı (μl)
Vektör (pJET1.2) (50μg)	1
10X T4 Ligasyon buffer	2
Klonlanacak bölge	X
T4 DNA Ligaz enzimi	0,25
Steril ddH ₂ O	20 μl'ye tamamlanır.
Toplam hacim	20 μl

3.8.3. Transformasyon

Kompetan *E. coli* DH10B hücrelerinden 50 μl alınmış, 1,5 mL'lik ependorfa aktarılmıştır. İşlem buz dolu kap içerisinde yapılmıştır. Üzerine, hazırlanan ligasyon reaksiyonu karışımından 5 μl ilave edilmiştir. Negatif kontrol amaçlı PCR ürünü yerine steril distile su ile hazırlanan ligasyon karışımı hazırlanmış (Tablo 3-3), bu karışımdan da 5 μl aktarılmıştır. Pozitif kontrol amaçlı 50 μl *E. coli* DH10B kompetan hücrelerin bulunduğu bir ependorfa stok saf pJET1.2 plazmitten 0,5 μl alınmıştır. Karışım buz üzerinde 10 dakika bekletilmiş ardından hemen 42°C'ye ayarlanmış ısıtıcı blok üzerine alınarak 45 saniye ısı şok yapılmış ve hemen buza alınarak 2 dakika bekletilmiştir. Daha sonra, tüpe 450 μl LB (Luria Bertani) sıvı besiyerinden ilave edilerek 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. pJET1.2 vektörü ampicilin direnç genine sahip olduğundan seçim için hazırlanan ampicilinli (100 μg/mL) LB agar petrilere transformasyon karışımından 250 μL alınıp yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır.

37°C’de 18 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Steril öze ile tek koloni alınarak 4 mL (100 µg/mL) ampicilinli LB sıvı besiyerine ekilmiştir. Her bir petriden üç koloni seçilmiştir. Bakteriler 37°C 180 rpm’de 18 saatlik inkübasyona bırakılmıştır (155, 156).

İnkübasyon sonrasında tüplerdeki sıvı kültür ependorflara alınmış 16.000 rcf’de 3 dakika santrifüj edilmiş, üstteki sıvı atılmıştır. Peletlerin üzerine 250 µL resüspansiyon tamponu (P1) eklenerek pelet nazıkçe pipetlenerek çözdürülmüştür. Ependorflara 250 µl taze hazırlanan P2 tamponu (2 M NaOH, %10 SDS, % 4,9 Thymophtolein (500X)) SDS/NaOH eklenip, 5 kez ters-yüz edilmek sureti ile karıştırılmış (mavi renk oluşumu görülür) ve 5 dakika bekletilmiştir. Sonrasında 350 µl N3 (nötralizasyon) tamponu eklendikten sonra tüpler yine ters-yüz edilmek sureti ile karıştırılmış (mavi renk açılana kadar) ve yine 5 dakika bekletilmiştir. 16.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. DNA plazmidi içeren üst sıvı bir pipet yardımıyla pürifikasyon kolonunun içine alınıp, 11.000 rcf’te 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası alt sıvı dökülüp, saflaştırma kolonu aynı tüpe geri konulmuştur. Kolonun içine 500 µl yıkama tamponu (Wash1) eklenmiş ve 12.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilip, alttaki sıvı atılmıştır. Kolon aynı tüpe konulmuş 650 µl PE tamponu (%100’lük etanol il hazırlanan) 11.000 rcf’te 1 dakika santrifüj edilmiştir. Alttaki sıvı döküldükten sonra kalan etanolü uzaklaştırmak için tekrar 11.000 rcf’te 2 dakika santrifüj edilmiştir. Kolonlar temiz ependorflara alınmış, TE buffer (10 mM Tris, pH 7.4, 1 mM EDTA) eklenerek daha önceden ayarlanan 70 °C’de 2 dakika çözdürülmüştür. Ardından 11.000 rcf’te 30 saniye santrifüj edilmiştir. DNA konsantrasyonları (ng/µl) Mikro Hacimli Spektrofotometre (Nanodrop) kullanılarak ölçülmüştür. DNA’lar kullanılıncaya kadar -20° C’de saklanmıştır (157).

3.8.4. Verifikasyon

Verifikasyon amaçlı plazmid haritasından enzimler seçilerek, reaksiyon hazırlanmış ve 37°C’de 2 saat bekletilerek DNA’nın seçilen restriksiyon enzimlerinin bulunduğu yerlerden kesilmesi sağlanmıştır (Tablo 3-5). Sonrasında % 1’lik agaroz jelde 120 V da 30 dakika yürütülerek UV ışığı altında görüntülenmiştir. Haritalardaki büyüklüklerle jeldeki bantların büyüklüğü karşılaştırılmıştır.

Tablo 3-5 : Verifikasyon için hazırlanan reaksiyonlar.

	AmpR(Pro)	AraBAD	ApmR	Cas9	Cas9(D10A)- APOBEC1
FastDigest					
Green Buffer (10X)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Plazmid (1,5-2µg)	x	x	x	x	x
Restriksiyon enzimi	MssI *	Eco32I* HindIII *	SacI * HindIII *	BglII* Eco32I* BamHI*	BglII* Eco32I* BamHI*
Distile su	20 µl'ye tamamlanır.				
Toplam hacim	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

*Her bir restriksiyon enziminden 0,25 µl alınmıştır.

pJET1.2 vektörüne klonlanan AmpR(Pro) HindIII ve PstI restriksiyon enzimleri ile kesilerek aynı enzimlerle taze kesilen pUC19 plazmidine klonlanmıştır. Seçilen bu enzimlerle daha uzun bir fragmanı elde etmek hedeflenmiştir. Reaksiyon hazırlandıktan sonra 37 °C'de 1 saat bekletilerek vektör DNA'nın kesilmesi sağlanmıştır. Ardından % 1'lik agaroz jelde 120 V da 30 dakika yürütülerek UV ışığı altında görüntülenmiştir. İstenilen bant jelden kesilip, saflaştırma kiti ile üretici firmanın önerdiği işlem basamakları takip edilerek saflaştırılmıştır. DNA konsantrasyonları (ng/µl) Mikro Hacimli Spektrofotometre (Nanodrop) kullanılarak ölçülmüştür. Ardından ligasyon reaksiyonu hazırlanmış ve oda ısısında bir saat bekletilmiştir. Transformasyon aşaması daha önce yapılan şekilde işlem basamakları takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Transforme edilen plazmidlerin izolasyonu sağlanmıştır. DNA konsantrasyonları (ng/µl) Mikro Hacimli Spektrofotometre (Nanodrop) kullanılarak ölçülmüştür.

Verifikasyon amacıyla Tablo3-4'teki gibi reaksiyon hazırlanmış ve bant boyları vektördeki enzim kesim bölgelerindeki fragmanlarla karşılaştırılmıştır.

Verifikasyonu sağlanan bölgelerin (pJET1.2-AmpR(Pro), pJET1.2-AraBAD, pJET1.2-ApmR, pJET1.2-ApmR, pJET1.2-Cas9, pJET1.2-APOBEC1) dizi analizleri Macrogen Europe firması tarafından yapılmıştır.

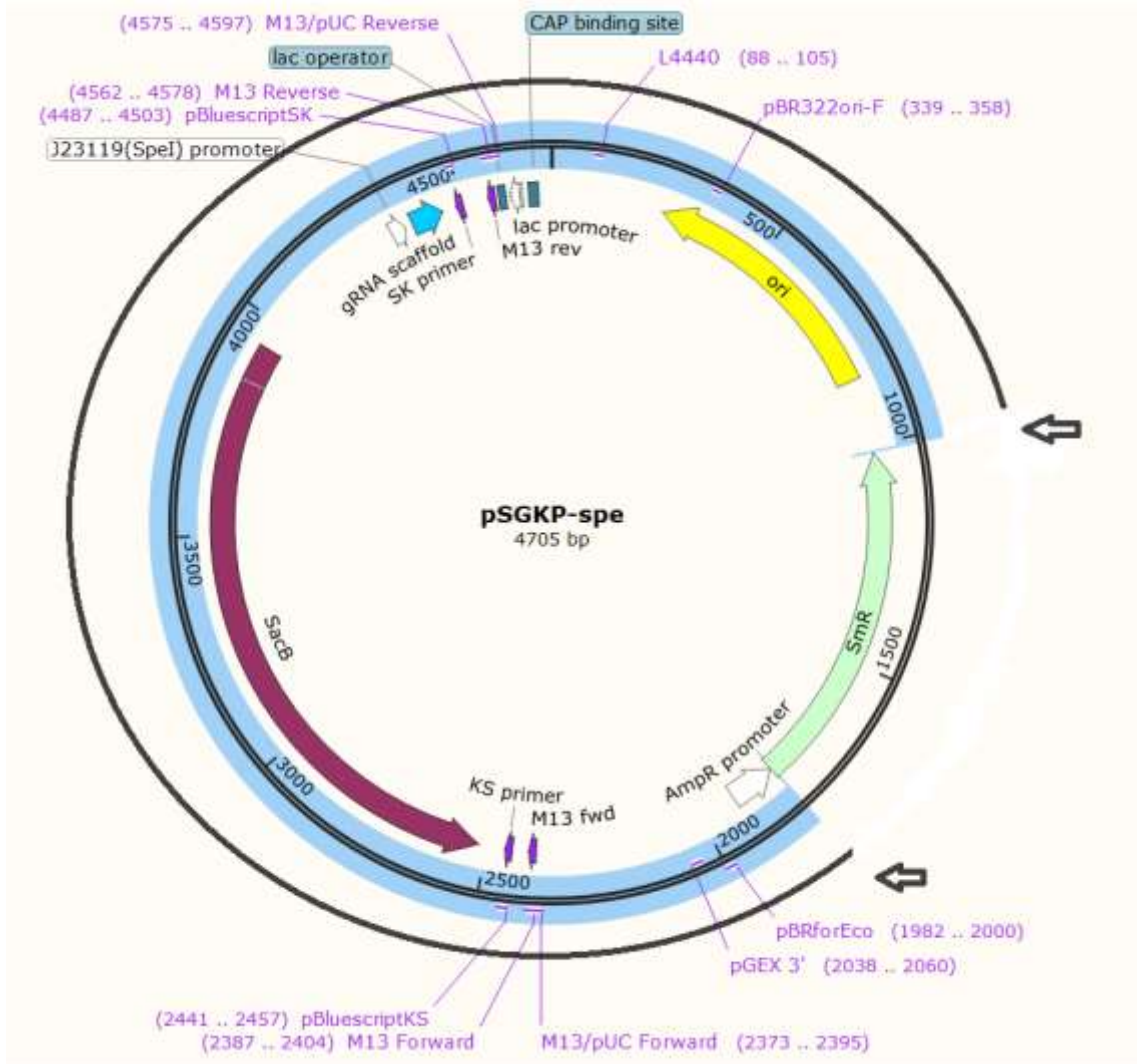
3.9. Ana Vektöre Klonlama

İlk aşamada daha önce pJET1.2 plazmidine gönderilen ApmR'nin (154 bp) kesilerek AmpR(Pro) bulunan pUC19 plazmidine klonlanması hedeflenmiştir. Kesim reaksiyonu, pJET1.2+ApmR vektöründen 10 µl (500 ng olacak şekilde), 10X G buffer (Thermo Scientific, ABD) 2µl, BpiI 0,2 µl ve toplam hacim 20 µl olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. Diğer kesim reaksiyonu ise pUC19+ AmpR(Pro) vektöründen 15 µl (1,5 µg olacak şekilde), 10X G buffer (Thermo Scientific, ABD) 2µl, BpiI 0,2 µl, FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/µL) 1 µl ve toplam hacim 20 µl olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. Reaksiyon tüpleri 37°C'de 2 saat bekletilmiştir. Etidyum bromür ile boyanan % 1'lik agaroz jelde 120 V da 30 dakika yürütülerek UV ışığı altında görüntülenmiştir. İstenilen bant jelden kesilip, saflaştırma kiti ile üretici firmanın önerdiği işlem basamakları takip edilerek saflaştırılmıştır. DNA konsantrasyonları (ng/µl) Mikro Hacimli Spektrofotometre (Nanodrop) kullanılarak ölçülmüştür. DNA'lar kullanılıncaya kadar -20° C'de saklanmıştır. Tablo 3-3'teki gibi ligasyon reaksiyonu hazırlanmış ve oda ısısında bir saat bekletilmiştir. Ardından *E. coli* DH10B kompetan hücrelere transformasyonu yapılmıştır. Plazmid DNA'sı izole edilmiş ve -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

pSGKP-spe vektöründen çalışmada kullanılmak üzere ana vektörü oluşturacak spektinomisin direnç bölgesi dışındaki bölge PCR ile çoğaltılmıştır. Amplifikasyon karışımı son hacim 25 µl olacak şekilde 5X Q5 Reaction Buffer 5 µl, 5X Q5 High GC Enhancer 5 µl, primerler (F/R) 2,5 µl, 10 mM içeren dNTP karışımından 0,5 µl, DNA (20ng) 1 µl, Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase 0,25 µl ve distile su 10,5 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Amplifikasyon programı 98 °C'de 2 dakika; 98 °C'de 10 saniye, 60 °C'de 10 saniye, 72 °C'de 135 saniye toplam 35 döngü; 72 °C'de 5 dakika ve

10 °C’de 10 dakika olacak şekilde uygulanmıştır. Amplifikasyon ürünleri, etidyum bromür ile boyanan % 1’lik agaroz jelde 120 V da 30 dakika yürütülerek UV ışığı altında görüntülenmiştir.

pUC19 vektörüne klonlanan AmpR(Pro) ve AprR bölgesinin BglII ve MssI restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Bu reaksiyon pUC19-AmpR(Pro)-AprR vektöründen 9µl (500 ng olacak şekilde), FastDigest Green Buffer(10X) (Thermo Scientific, ABD) 2µl, BglII 0,2 µl, MssI 0,2 µl ve toplam hacim 20 µl olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. Reaksiyon tüpü 37 °C’de 2 saat bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Etidyum bromür ile boyanan % 1’lik agaroz jelde 120 V da 30 dakika yürütülerek UV ışığı altında görüntülenmiştir. İstenilen bant jelden kesilip, saflaştırma kiti ile üretici firmanın önerdiği işlem basamakları takip edilerek saflaştırılmıştır. DNA konsantrasyonları (ng/µl) Mikro Hacimli Spektrofotometre (Nanodrop) kullanılarak ölçülmüştür. DNA’lar kullanılıncaya kadar -20° C’de saklanmıştır. Amplifikasyon karışımı son hacim 25 µl olacak şekilde 5X Q5 Reaction Buffer 5 µl, 5X Q5 High GC Enhancer 5 µl, primerler (F/R) 2,5 µl, 10 mM içeren dNTP karışımından 0,5 µl, DNA (20ng) 1 µl, Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase 0,25 µl ve distile su 10,5 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Amplifikasyon programı 98 °C’de 2 dakika; 98 °C’de 10 saniye, 56 °C’de 10 saniye, 72 °C’de 45 saniye toplam 12 döngü; 98 °C’de 10 saniye, 68 °C’de 10 saniye toplam 12 döngü; 98 °C’de 10 saniye, 68 °C’de 10 saniye, 72 °C’de 45 saniye toplam 23 döngü; 72 °C’de 5 dakika ve 10 °C’de 10 dakika olacak şekilde uygulanmıştır. Amplifikasyon ürünleri, etidyum bromür ile boyanan % 1’lik agaroz jelde 120 V da 40 dakika yürütülerek UV ışığı altında görüntülenmiştir.



Şekil 3-14 : pSGKP-spe plazmidinden ana vektörü oluşturacak bölge.

3.9.1. TEDA (T5 exonuclease DNA assembly) Yöntemiyle Ana Vektöre AmpR(Pro) ve AprR Bölgesini Klonlanma

Bir mililitre 5X TEDA çözeltisi, 0,5 M Tris-HCl pH 7,5, 50 mM MgCl₂, 50 mM DTT (ditiyotritol), 0,25 g PEG (polietilen glikol) 8000 ve 1 µl 10U/µl T5 eksonükleaz eklenerek hazırlanmış, 200 µl'lik PCR tüplerine küçük hacimlerde (20 µl) bölünerek çalışma anına kadar -80 °C'de saklanmıştır (158).

CRISPR-Cas9 sisteminde kullanılacak ana vektörü oluşturacak esas omurga pSGKP-spe'den (spektinomisin direnç bölgesi hariç) PCR ile çoğaltılmıştır. Bu vektöre, AmpR(Pro) ve AprR bölgesi TEDA (T5 exonuclease DNA assembly) yöntemiyle klonlama amaçlı hem vektörün hem de eklenecek parçanın büyüklüklerine göre

reaksiyonda kullanılacak miktarların hesaplamaları yapılmıştır. Vektör-eklenecek parça oranı 1/3 ve 1kb için 50 ng olacak şekilde planlanmıştır. Buz dolu bir kap üzerine steril PCR tüpleri (3 adet) isimlendirilerek konmuştur. Bu üç reaksiyon tüplerinden birinde pSGKP-spe ana vektör ve AmpR(Pro)-AprR bölgesi, birinde sadece pSGKP-spe ana vektör, bir diğerinde ise sadece AmpR(Pro)-AprR bölgesi olmak üzere alınmıştır. Reaksiyonlara 16 µl'ye tamamlanmak üzere steril distile su eklenmiştir. En son -80°C'de saklanan TEDA stok çözeltisinden 4 µl reaksiyon tüplerine alınarak karıştırılmıştır. Sonra reaksiyon 30 °C'de 40 dk gerçekleştirilmiş ve buz üzerine alınarak sonlandırılmıştır.

Buz üzerine içerisine 50 µl *E. coli* DH10B kompetan hücreleri bulanan ependorflar -80 °C'den çıkarılarak hazırlanmış ve reaksiyondan tüplerin 5 µl alınarak yavaşça eklenmiştir. Transformasyonu daha önce yapılan işlem basamakları takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Elde edilecek vektör apramisin genine sahip olduğundan seçim için hazırlanan apramisinli (50 µg/mL) LB agar petrilere transformasyon karışımından (11000 ref'te santifüj edilerek üst sıvı atılmış) 150 µl ile pelet çözdürülerek alınıp yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. 37°C'de 18 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Steril öze ile tek koloni alınarak 4 mL (50µg/mL) apramisinli LB sıvı besiyerine ekilmiştir. Her bir petriden üç koloni seçilmiştir. Bakteriler 37°C 180 rpm'de 18 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Her birinin plazmid DNA'sı daha önce yapıldığı gibi izole edilmiş ve konsantrasyonları (ng/µl) Mikro Hacimli Spektrofotometre (Nanodrop) kullanılarak ölçülmüştür. DNA'lar kullanılıncaya kadar -20° C'de saklanmıştır (155-157).

Verifikasyon amaçlı plazmid haritasından bir restriksiyon enzimi seçilmiştir. Reaksiyon 5 µl (~300 ng) vektör DNA'sı, 2 µl FastDigest Green Buffer (10X), 0,2 µl MluI ve 20 µl'ye tamamlayacak şekilde distile su eklenerek hazırlanmış ve 37°C'de 2 saat bekletilerek DNA'nın istenen bölgelerden kesilmesi sağlanmıştır. Sonrasında % 1'lik agaroz jelde 120 V da 30 dakika yürütülerek UV ışığı altında görüntülenmiştir. Haritadaki büyüklüklerle jeldeki bantların büyüklüğü karşılaştırılmıştır.

3.9.2. Ana Vektöre Cas9 ve APOBEC1 Bölgelerinin Klonlanması

pJET1.2 ara vektörden Cas9 ve APOBEC1 bölgeleri PCR ile çoğaltılmıştır. Daha önce yapıldığı gibi agaroz jelde yürütüldükten sonra plazmid DNA'sı izole

edilmiş ve konsantrasyonu ölçülmüştür. pSGKP-AmpR(Pro)-AprR ana vektöre ligasyon (T4) ve TEDA yöntemi ile klonlanma yapılmış ve transforme edilmiştir. Bu yöntemlerde vektör:eklenecek bölge oranı 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 olacak şekilde uygulanmıştır. Verifikasyon amacıyla restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sağlanmıştır.

pSGKP-AmpR(Pro)-AprR ana vektöre ayrı ayrı Cas9 ve APOBEC1 bölgeleri AQUA (advanced quick assembly) yöntemi ile klonlanmıştır. Bu yöntemde vektör:eklenecek bölge 1:3 oranı ile toplam reaksiyon 10 µL olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. Her 1 kb vektör için 12 ng alınacak şekilde hesaplanmıştır. Hazırlanan DNA karışımı oda ısısında 1 saat inkübe edilmiştir. Ardından buz dolu bir kap içinde AQUA DNA karışımından 5 µL alınıp kompetan hücreye eklenmiş ve transformasyon yapılmıştır (159).

Cas9 ve APOBEC1 bölgelerini ayrı ayrı pSGKP-AmpR(Pro)-AprR ana vektöre klonlamak için Gibson Yöntemi kullanılmıştır (160, 161). Gibson metodu için; 1 M pH 7,5 Tris HCl'den 500 µL, 1 M MgCl₂'den 50 µL, 100 mM dNTP her birinden 10 µL, 1 M DTT (Ditiyotritol)'den 50 µL, PEG 8000'den 0,25g, 100 mM NAD (Nikotinamid adenin dinükleotit) 50 µL alınıp 5X tampon olacak şekilde ana karışım hazırlanmıştır. Bu karışımdan PCR tüplerine 20 µL dağıtılmış, kullanım anına kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Bu yöntemle çalışırken buz dolu bir kap üzerinde bulunan PCR tüpüne Gibson ana karışımından 18,6 µL, Taq DNA ligazdan 10 µL, Phusion DNA polimerazdan 1 µL ve T5 eksonükleazdan 0,4 µL alınmış ve iyice karıştırılmıştır. Vektör:eklenecek bölge 1:3 oranı ile toplam DNA hacmi 5 µL olacak şekilde hesaplanmış ve hazırlanan Gibson karışımından 5 µL alınarak toplam 10 µL hacme sahip reaksiyon içeriği tamamlanmıştır. Negatif kontrol, vektör DNA'sı, distile su ve Gibson karışımından oluşturulmuş ve tüm reaksiyon tüpleri buzdan alınarak 50 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında tüpler tekrar buz dolu kap üzerinde alınarak reaksiyonun sonlanması sağlanmıştır. Ardından 50 µL kompetan hücreye Gibson reaksiyonundan 5 µL alınarak eklenmiştir. Transformasyon işlem basamakları takip edilmiş ve Apramisinli LB agara ekim yapılmıştır. 37 °C'de 18 saat inkübe edilmiştir. Plazmid haritasından seçilen restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonları verifikasyon için hazırlanmıştır.

3.9.3. gRNA'ların Bağlanması ve Ana Vektöre Klonlanması

CRISPR'da kullanılacak pBECKPnin kesimi ve defosforilasyonu için; 2 μ L FastDigest Green Buffer, 2 μ g plazmid, 0,5 μ L Eco31i, 0,5 μ L FastAP ve 20 μ L'ye tamamlayacak şekilde distile su eklenmiş ve 37 °C'de 5 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında % 1'lik agaroz jelde 100 V da 30 dakika yürütülerek UV ışığı altında görüntülenmiştir. Plazmid DNA'sı jelden izole edilmiş ve konsantrasyonu ölçülmüştür.

Her bir 100 μ M gRNA'dan 1 μ L, 10X T4 ligasyon tamponundan 1 μ L, 10mM ATP'den 1 μ L, T4 PNK'den 0,25 μ L ve 5,75 μ L distile su eklenerek hazırlanan karışım 37 °C'de 30 dakika, 95 °C'de 5 dakika ve her dakika 5 °C'de düşerek 25 °C'de 5 dakika bekletilmiştir. Bağlanan gRNA çiftleri steril distile su ile 1:200 oranında seyreltilmiştir.

Ana vektörün DNA'sından 50 ng olacak şekilde x μ L, seyreltilmiş gRNA çiftinden 1 μ L, 10X T4 tamponundan 1 μ L, T4 DNA ligazdan 0,2 μ L ve son hacim 10 μ L olacak şekilde steril distile su alınarak ligasyon reaksiyonu hazırlanmış ve oda ısısında 1 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrasında buz dolu kap üzerinde ligasyon reaksiyonundan 5 μ L alınıp 50 μ L kompetan hücreye eklenmiş ve transformasyon işlemleri uygulanmıştır (162).

4. BULGULAR

Bakteriyoloji laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden EUCAST standartlarına göre yapılan antibiyogram sonucunda karbapenemlere dirençli bulunan 5 *K. pneumoniae* izolatu dahil edildi.

4.1. İzolatlarda Karbapenemler İçin Saptanan MİK Değerleri

İzolatların MİK değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile EUCAST kriterlerine göre araştırılmış ve sınır değerlerine göre belirlenmiştir (Tablo 4-1). İzolatların MİK değerleri imipenem için 4-128 µg/mL, meropenem için 8-64 µg/mL ve ertapenem için 8-256 µg/mL aralığında saptanmıştır. İzolatların tümü ertapeneme, meropeneme ve imipeneme dirençli bulunmuştur (Tablo 4-2).

Tablo 4-1: Karbapenemlerin EUCAST'a göre MİK sınır değerleri (mg/L).

Antibiyotik	Duyarlı ≤ (mg/L)	Dirençli > (mg/L)
İmipenem	2	4
Meropenem	2	8
Ertapenem	0,5	0,5

Tablo 4-2: İzolatların MİK (µg/mL) değerleri ve sonuçları.

Suş no	İmipenem (µg/mL)	Sonuç	Meropenem (µg/mL)	Sonuç	Ertapenem (µg/mL)	Sonuç
1	128	Dirençli	64	Dirençli	256	Dirençli

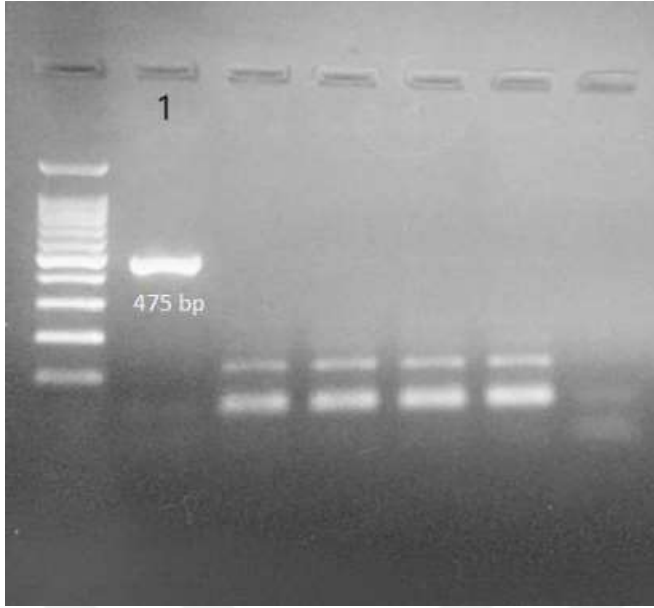
2	4	Dirençli	16	Dirençli	128	Dirençli
3	32	Dirençli	8	Dirençli	64	Dirençli
4	8	Dirençli	8	Dirençli	8	Dirençli
5	4	Dirençli	8	Dirençli	64	Dirençli

4.2. PCR Yöntemi ile Saptanan Direnç Genleri

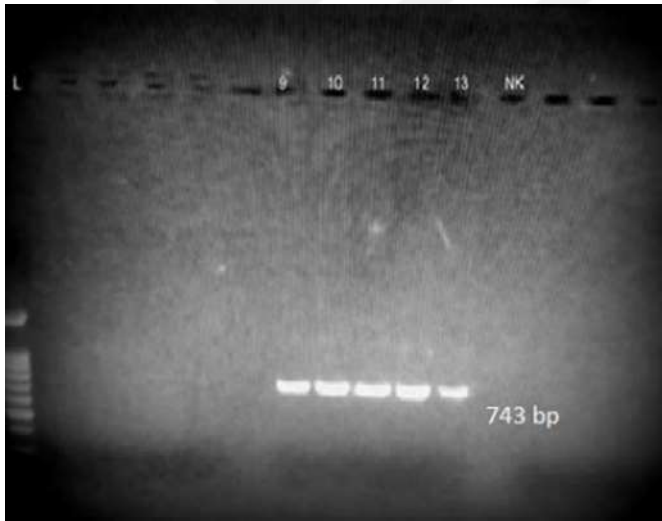
PCR yöntemi ile izolatlarının birinde (%20) bla_{NDM-1} bulunurken tamamında bla_{OXA-48 benzeri} ve bla_{CTX-M-15} genleri saptanmıştır (Tablo 4-3, Şekil 4-1, Şekil 4-2, Şekil 4-3).

Tablo 4-3 : İzolatlarda (n=5) saptanan direnç genleri ve örnek türü.

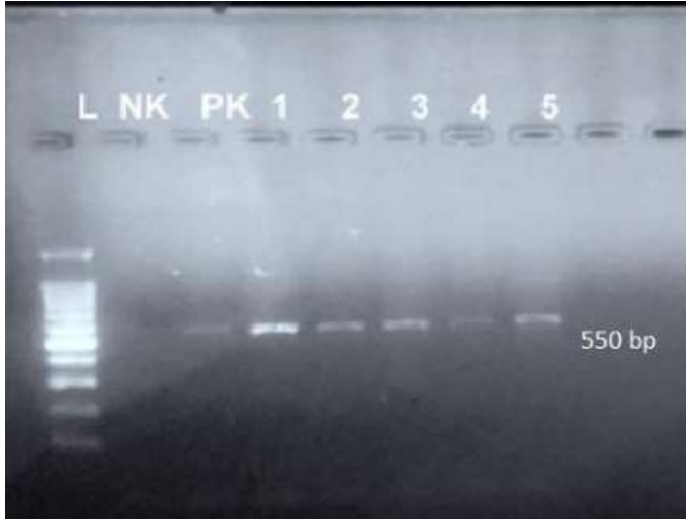
İzolat no	NDM-1	OXA-48 benzeri	CTX-M-15	Örnek türü
1	+	+	+	Katater ucu
2	-	+	+	Kan
3	-	+	+	Kan
4	-	+	+	Kan
5	-	+	+	Katater ucu



Şekil 4-1: NDM-1 pozitif suşun amplifikasyon ürününün bant görüntüsü.



Şekil 4-2: OXA-48 benzeri pozitif suşların amplifikasyon ürünlerinin bant görüntüleri.



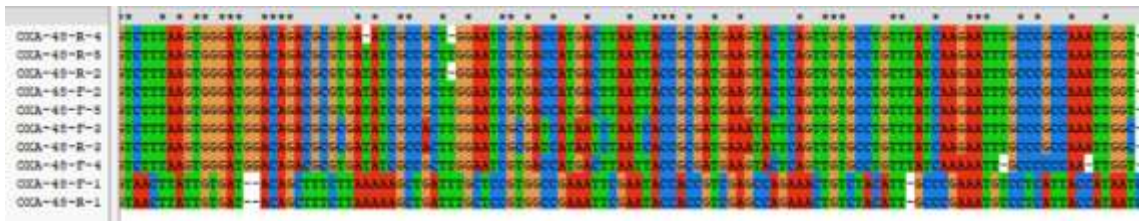
Şekil 4-3: CTX-M-15 pozitif suşların amplifikasyon ürünlerinin bant görüntüleri.

4.3. Transformasyonda Kullanılacak Antibiyotiklerin Belirlenmesi

Klonlamada seçim yapabilmek amacıyla suşlar sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile kanamisin (1 mg/mL), spektinomisin (>1 mg/mL), streptomisin (>1 mg/mL), higromisin (1 mg/mL), kloramfenikole (>1 mg/mL) dirençli ve yalnızca apramisine 1-0,0625 mg/mL konstransyonlarında duyarlı bulunmuştur.

4.4. CRISPR-Cas Sisteminde gRNA Tasarımları

İzolatların bla_{OXA-48} benzeri (Şekil 4-4), bla_{NDM-1} (Şekil 4-5), bla_{CTX-M-15} (Şekil 4-6) direnç genlerinin sekans sonuçlarına göre dizi hizalamaları yapılmıştır. Bu sonuçlara göre gRNA primerleri bla_{OXA-48} benzeri (Tablo 4-4), bla_{NDM-1} (Tablo 4-5), bla_{CTX-M-15} (Tablo 4-6) gösterilmiştir.



Şekil 4-4 : Suşların bla_{OXA-48} benzeri Genlerinin Dizi Hizalaması.

Tablo 4-4: bla_{OXA-48} benzeri Genlerinin gRNA dizileri.

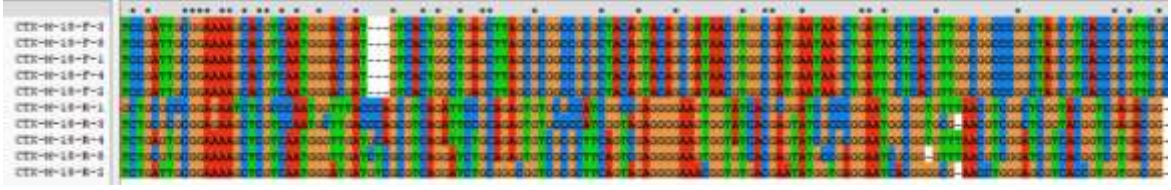
CRISPR/Baz düzenleme (Edit)	Primerler
Kp_OXA-48_gRNA_CRISPR_F	TAGTTTTACTGAACATAAATCACA
Kp_OXA-48_g1_CRISPR_R	AAACTGTGATTTATGTTTCAGTAAA
Kp_OXA-48_gRNA_Edit_F	TAGTAATGGCAAGAAAACAAAAGT
Kp_OXA-48_gRNA_Edit_R	AAACACTTTTGTTTTCTTGCCATT



Şekil 4-5: bla_{NDM-1} Geni Pozitif Suşun Dizi Hizalaması.

Tablo 4-5: bla_{NDM-1} Geni gRNA dizileri.

CRISPR/Baz düzenleme (Edit)	Primerler
Kp_NDM-1_gRNA_CRISPR_F	TAGTATTGCCCAATATTATGCACC
Kp_NDM-1_gRNA_CRISPR_R	AAACGGTGCATAATATTGGGCAAT
Kp_NDM-1_gRNA_Edit_F	TAGTATTGGCCAGCAAATGGAAAC
Kp_NDM-1_gRNA_Edit_R	AAACGTTTCCATTTGCTGGCCAAT



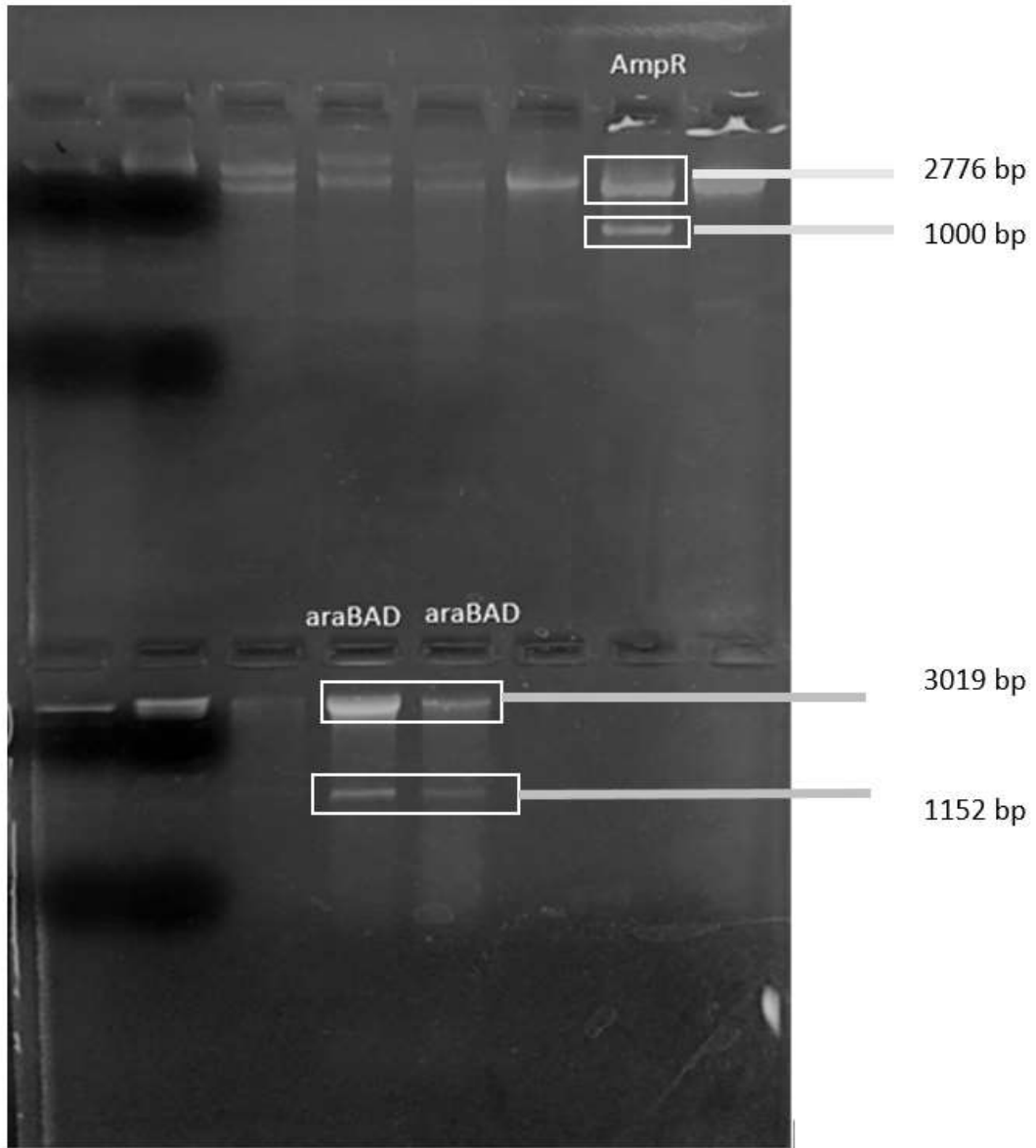
Şekil 4-6: Suşların bla_{CTX-M-15} Genlerinin Dizi Hizalaması.

Tablo 4-6: bla_{CTX-M-15} Genlerinin gRNA Dizileri.

CRISPR/Baz düzenleme (Edit)	Primerler
Kp_CTX-M-15_gRNA_CRISPR_F	TAGTACTTCCTAACAAACAGCGTGA
Kp_CTX-M-15_gRNA_CRISPR_R	AAACTCACGCTGTTGTTAGGAAGT
Kp_CTX-M-15_gRNA_Edit_F	TAGTCCAGTTCACGCTGATGGCGA
Kp_CTX-M-15_gRNA_Edit_R	AAACTCGCCATCAGCGTGAAGTGG

4.5. Hedef Bölgelerin Çoğaltılması, Ara Vektöre Klonlanması ve Verifikasyonu

PCR yöntemi ile pUC19 vektöründen AmpR(Pro) bölgesi, pSGKP-km plazmitten Cas9(D10A) nikaz, sitidin deaminaz (APOBEC1) bölgesi, pCasKP-apr plazmitten Cas9 proteinin, pCasKP-apr plazmitten araBAD ve ApmR bölgeleri çoğatılmış ve jelden saflaştırılmıştır. Elde edilen bölgeler ayrı ayrı pJET1.2 klonlanmış, transforme edilmiş ve plazmid DNA'sı izole edilmiştir. Verifikasyon amacıyla seçilen restriksiyon enzimleriyle kesimleri yapılmış ve jelde yürütülerek istenen bant büyüklükleri elde edilmiştir (Şekil 4-7) (Şekil 4-8).



Şekil 4-7 : pJET1.2'ye klonlanan ApmR ve AraBAD bölgelerinin verifikasyonunda elde edilen bant görüntüleri.

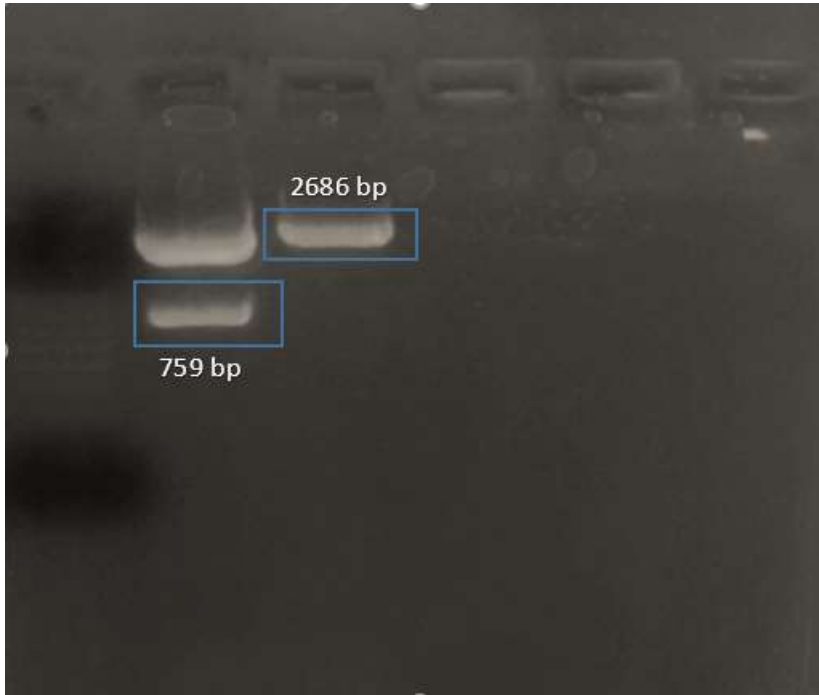
pJET1.2-AmpR plazmidi SacI ve HindIII; pJET1.2-AraBAD Eco32I ve HindIII restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir.



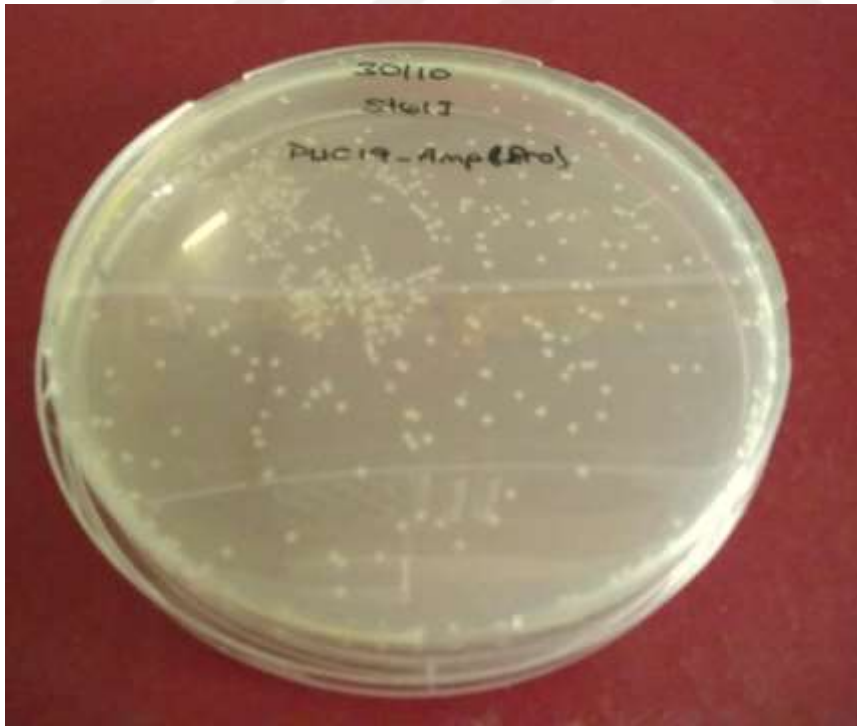
Şekil 4-8 : pJET1.2-Cas9'un (7077 bp) verifikasyonundaki jel görüntüsü.

pJET1.2-Cas9 plazmidi BglII, Eco32I ve BamHI restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir.

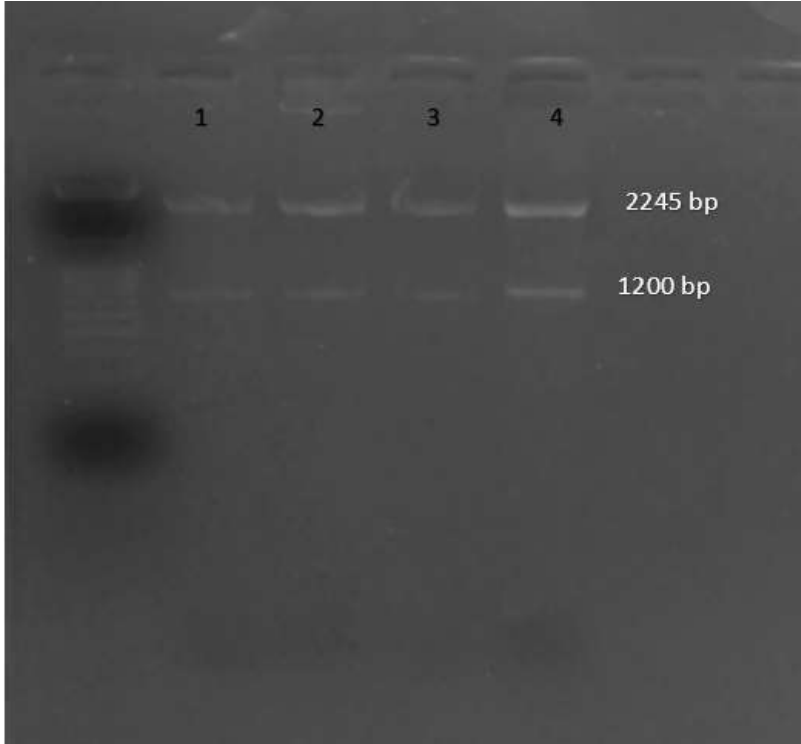
pJET1.2 vektöründen AmpR(Pro) bölgesi HindIII ve PstI restriksiyon enzimleriyle ve aynı enzimlerle pUC19 plazmidi de kesilmiş ve jelde yürütüldükten sonra istenen bant boyları doğrulanmıştır (Şekil 4-9). Jelden DNA izolasyonu sağlanmış ve pUC19 vektörüne klonlanmıştır. Transformasyondan bir gün sonra ampisilinli (100 µg/mL) LB agarda koloniler Şekil 4-10'da görülmektedir. Bu kolonilerden dört koloni seçilmiş ve LB sıvı besiyerine ekilmiştir. Bakteriler 37°C 180 rpm'de 18 saatlik inkübasyona bırakılmış Her birinin plazmid DNA'sı izole edilmiştir. Seçilen restriksiyon enzimleri ile kesilerek istenen bant boyları gözlenmiştir (Şekil 4-11).



Şekil 4-9: AmpR(Pro) (759 bp) ve pUC19 (2686 bp) plazmidinin agaroz jeldeki görüntüsü.
AmpR(Pro) ve pUC19 plazmidleri BpiI restriksiyon enzimiyle kesilmiştir.



Şekil 4-10: pUC19-AmpR(Pro)'nun transformasyondan oluşan kolonileri.

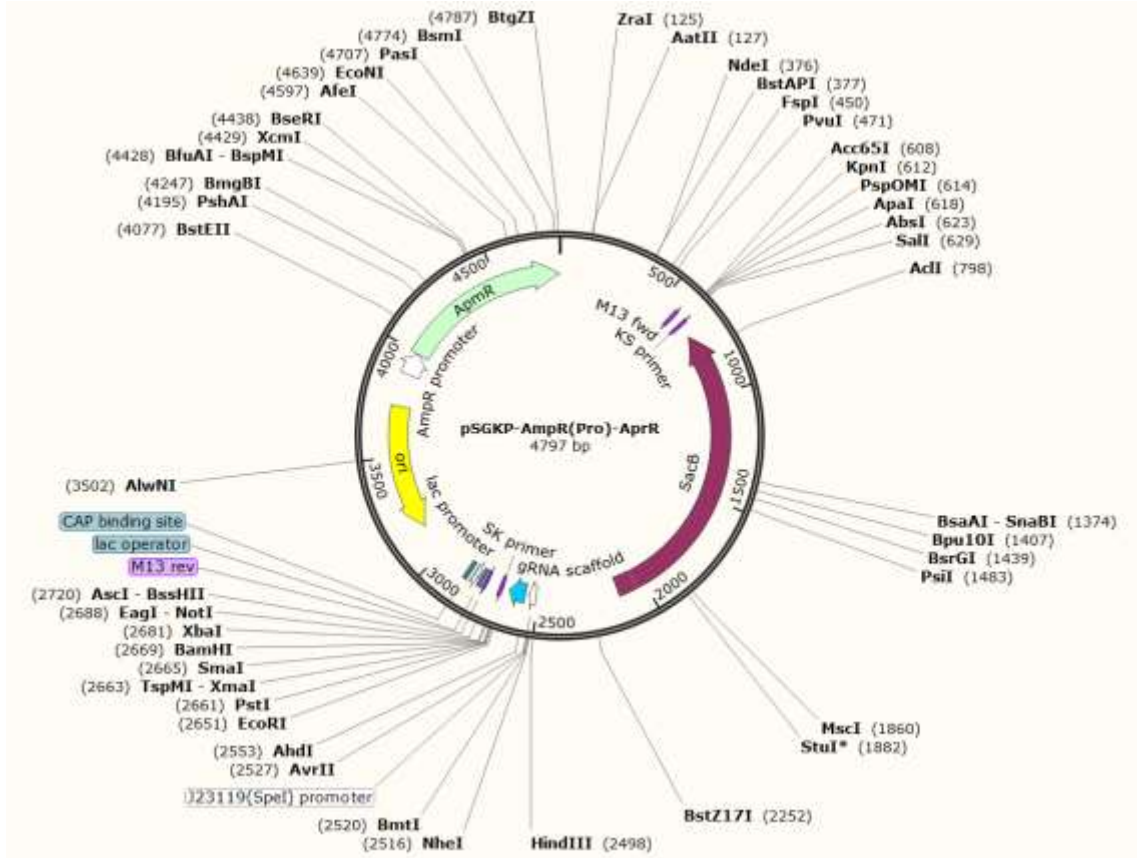


Şekil 4-11: pUC19-AmpR(Pro) plazmidinin (3445 bp) verifikasyonunda elde edilen bantların görüntüsü.

1-4 nolu bantlar: pUC19-AmpR(Pro) plazmidi BglII ve MssI restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir.

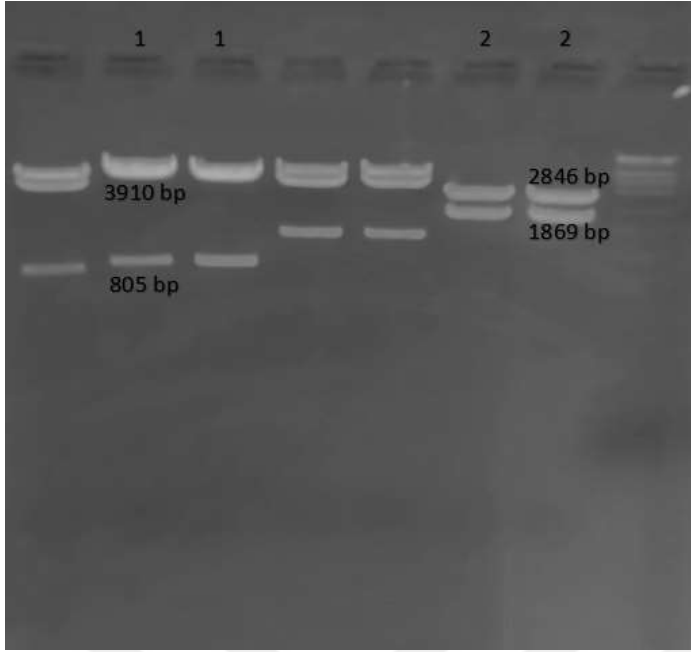
CRISPR-Cas9 sisteminde kullanılacak ana vektörü oluşturacak esas omurga pSGKP'ye AmpR(Pro) ve AprR bölgesi TEDA yöntemi ile eklenmiştir (Şekil 4-12).

Verifikasyon amaçlı iki ayrı kesim reaksiyonu hazırlanmıştır. İlk reaksiyon KpnI-BoxI, ikinci reaksiyon HindIII-SalI restriksiyon enzimleriyle kesimleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4-13).



Şekil 4-12: pSGKP-AmpR(Pro)-AprR vektörünün haritası.

Verifikasyon amaçlı iki ayrı kesim reaksiyonu hazırlanmıştır. İlk reaksiyon (1) KpnI-BoxI restriksiyon enzimleri ile kesilmiş 3910 bp ve 805 bp; ikinci reaksiyon (2) HindIII-SalI ile kesilmiş 2846 bp ve 1869 bp bantları görülmüştür (Şekil 4-13)



Şekil 4-13:pSGKP-AmpR(Pro)-AprR plazmidinin verifikasyonunda elde edilen bantların görüntüsü.

pSGKP-AmpR(Pro)-AprR plazmidi;

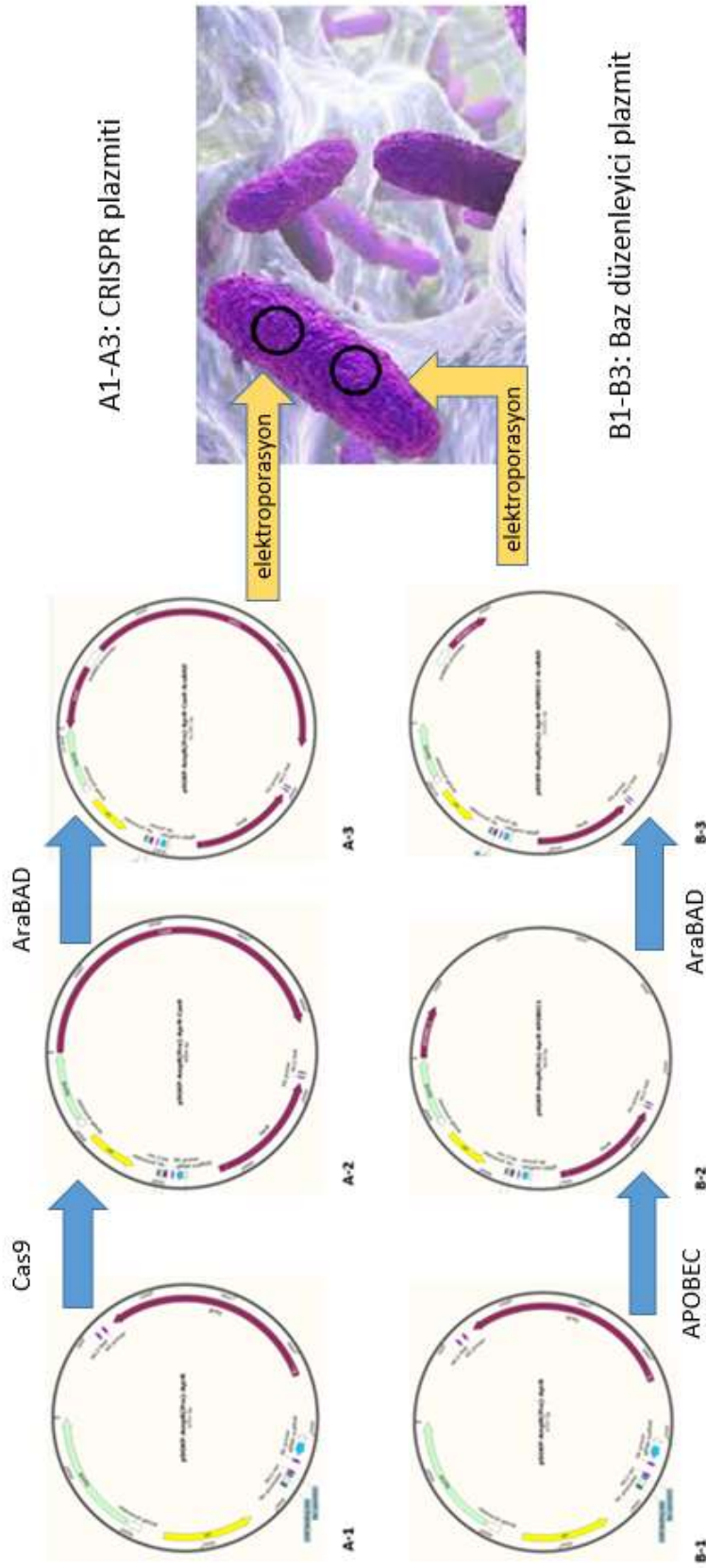
- 1) KpnI-BoxI restriksiyon enzimleri ile kesilmiş 3910 bp ve 805 bp,
- 2) HindIII-SalI enzimleri ile kesilmiş 2846 bp ve 1869 bp bantları görülmüştür.

Tablo 4-7: Çalışmada kullanılan plazmidler.

Plazmid (büyüklüğü)	Özellik	Referans
pCasKP-apr (11.393 bp)	<i>K. pneumoniae</i> 'de Cas9 nükleaza ve Apramisin direnç bölgesine sahip	146
pCasKP-hph (11.615 bp)	<i>K. pneumoniae</i> 'de Cas9 nükleaza ve Higromisin direnç bölgesine sahip	146
pSGKP-km (4729 bp)	(Boş Vektör) <i>K. pneumoniae</i> 'de genom düzenlemesi için gRNA ekspresyonu, Kanamisin direnç bölgesine sahip	146
pSGKP-spe (4705 bp)	(Boş Vektör) <i>K. pneumoniae</i> 'de genom	146

	düzenlemesi için gRNA ekspresyonu, Spektinomisin direnç bölgesine sahip	
pBECKP-km (10.252 bp)	<i>K. pneumoniae</i> 'de sitidin deaminaz aracılı bir baz düzenleyici plazmid, Kanamisin direnç bölgesine sahip	146
pBECKP-spe (10.229 bp)	<i>K. pneumoniae</i> 'de APOBEC1'in füzyon proteni ve nCas9 (Cas9 nikaz), Spektinomisin direnç bölgesine sahip	146
pSGKP-AmpR(Pro)-AprR	<i>K. pneumoniae</i> 'de Apramisin direnci ve promotör bölgesine sahip	Bu çalışma
pSGKP-AmpR(Pro)-AprR-Cas9	<i>K. pneumoniae</i> 'de Apramisin direnci, promotör bölge ve Cas9 nükleaza sahip	*Bu çalışma
pSGKP-AmpR(Pro)-AprR- APOBEC1	<i>K. pneumoniae</i> 'de Apramisin direnci, promotör bölge ve APOBEC1 nükleaza sahip	*Bu çalışma

*:Çalışmamızda hedeflenen ancak klonlanamayan plazmid.



Şekil 4-14: CRISPR-Cas ikili sisteminin elektroporasyon ile *K. pneumoniae* izolatına aktarılması.

5. TARTIŞMA

Antimikrobiyal direnç, 21. yüzyılın önemli halk sağlığı tehditlerinden biridir. Antimikrobiyal direnç yükünün mevcut büyüklüğü, dünyanın farklı bölgelerindeki durumu ve bu yüke katkıda bulunan önde gelen patojen-antibiyotik kombinasyonları hakkındaki bilgi çok önemlidir. Direnç gelişimi kontrolsüz bırakılırsa birçok bakteriyel patojen gelecekte bugün olduğundan çok daha ölümcül hale gelebileceği düşünülmektedir (163).

DSÖ tarafından insan sağlığına en büyük tehdit oluşturan öncelikli patojenler yayınlanmış ve yeni antibiyotiklere ihtiyacın aciliyetine göre kritik, yüksek ve orta öncelikli olarak üç kategoriye ayırmıştır. Karbapeneme dirençli *Enterobacteriaceae* türleri kritik öncelikli ilk üç patojen arasındadır. Son seçenek antimikrobiyallere dirençli suşların artan izolasyonu *K. pneumoniae* enfeksiyonlarının tedavisi için teröpatik seçenekleri önemli ölçüde daraltmış ve bazı durumlarda olanaksız kalmıştır. Tüm bunların sonucunda Birleşmiş Milletler de dahil olmak üzere birçok uluslararası kuruluş çoğul dirençli *K. pneumoniae*'yi insan sağlığına yönelik acil bir tehdit olarak kabul etmiştir. Yeni antibiyotiklerin keşfi ile dünya çapında dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlardan kaynaklanan ölümlerin azaltılması hedeflenirken tek başına çözüm olamayacağı da bilinmektedir. Mevcut antibiyotiklerin akılcı kullanımı ve yeni moleküler teknikler kullanılarak geliştirilen faj terapilerine yer verilerek direnç sorununa çözüm aranmalıdır. (17, 163).

2019 yılında antimikrobiyal direnç ile ilişkili ölümden sorumlu altı patojen ölüm sayısı sırasına göre sırasıyla *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* ve *P. aeruginosa* olarak belirtilmiştir. Karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* ile üçüncü kuşak sefalosporinlere dirençli *K. pneumoniae*'lerin her biri 50.000-100.000 insan ölümüne neden olmuştur (2).

Karbapenemazların üretimi, tüm dünyada karbapenemlere dirençli *Enterobacteriaceae* türlerinde karbapenem direncinde altta yatan ana mekanizmadır. Karbapenemazların coğrafik bölgelerdeki görülme oranları değişebildiği gibi bu enzimleri kodlayan genlerin plazmid aracılı geçişiyle taşınabildiği görülmektedir (164).

2009 yılında bla_{NDM} ile ilişkili karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* ilk kez Hindistan'da bildirilmiştir (69). O zamandan beri, bla_{NDM} *Enterobacteriaceae* türlerinin

çoğunda saptanmıştır (164, 165). NDM tipi beta laktamaz esas olarak Hindistan, Pakistan, Bangladeş gibi Asya ülkelerinde, özellikle Çin'de yayılmıştır (166). Son yıllarda yapılan çalışmalarda Karadağ, Sırbistan, Kosova ve Orta Doğu gibi Balkanlar bölgesinde bulunan farklı ülkelere gelen hastalardan NDM-1 üreten izolatlar tanımlanmıştır (167).

2010-2014 yılları arasında ülkemizdeki altı hastanenin (Ankara, Antalya, İstanbul, Kayseri) klinik örneklerinden izole edilen 34 karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* izolatının %58'inde yalnızca OXA-48 geni, dört izolatta ise hem OXA-48 hem de NDM-1 geni bulunmuştur (168).

Ülkemizde 2013 yılında İç Anadolu'da bir üniversite hastanesinde yapılan çalışmada 94 karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* izolatında direnç genleri araştırılmış, bunların %4,3'ünde NDM-1 geni ve %91,5'inde OXA-48 geni bulunmuştur. Yalnızca bir izolatta hem NDM-1 hem de OXA-48 geni saptanmıştır (169).

2014-2015 yıllarında Sakarya Üniversitesi Hastanesi'nde yoğun bakım ünitesindeki sekiz hastada NDM-1 tipi karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* epidemisi ele alınmıştır. İzolatların ikisinde NDM-1 ve OXA-48 tipi beta laktamaz bulunmuş ve sekiz süşun altısında %95'lik klonal yakınlık ortaya konmuştur. NDM-1 üreten izolatların ülkemizde yayılma eğilimine dikkat çekilmiştir (170).

Ülkemizde ilk NDM-1 üreten *K. pneumoniae* izolatının rapor edilmesinin (73) ardından geçen 10 yıl içinde NDM-1 ve OXA-48 tipi beta laktamazın birlikte saptandığı araştırmalara benzer şekilde çalışmamıza dahil ettiğimiz beş izolatın birinde NDM-1 ve OXA-48 geninin beraber bulunduğu gösterilmiştir.

CTX-M-15 tipi beta laktamaz ilk kez 1999 yılında Yeni Delhi'de bildirildikten iki yıl sonra hastanemizde bir hastanın idrar örneğinden izole edilen çoğul dirençli *K. pneumoniae* izolatında saptanmıştır (65). 2008 yılında İstanbul Tıp Fakültesi'nde yapılan bir başka çalışmada CTX-M-15 üreten izolatların ortaya çıkmasından kısa bir süre içinde yayıldığı belirtilmiştir (171). Bu sonucu destekler şekilde çalışmamızda tüm *K. pneumoniae* izolatlarında CTX-M-15 geni bulunmuştur.

2014 yılında ülkemizde 18 merkezden alınan kapsamlı çalışmada karbapenemaz varlığı saptanan 124 *K. pneumoniae* izolatının %83,1'inde OXA-48 enzimi, %6,5'inde NDM-1 enzimi ve 19 *E. coli* izolatının %94,7'sinde OXA-48 enzimi, %5,3'ünde NDM-

1 enzimi bulunmuştur. KPC enziminin izolatların hiçbirinde görülmediği bildirilmiştir. Bunun yanı sıra karbapenemaz taramasında ertapenemin diğer karbapenemlere kıyasla en doğru antibiyotik olduğu belirtilmiştir (172). Çalışmamızda izolatların ertapenem, imipenem ve meropenem MİK değerlerine bakılmış ve bu karbapenemlere sırasıyla 256, 128 ve 64 mg/L ile en yüksek düzeyde dirence sahip olan izolatta araştırılan tüm beta laktamazlar (OXA-48, NDM-1, CTX-M-15) bulunmuştur.

OXA-48 enzimi 2001 yılında dünyada ilk kez hastanemizde, üriner sistem enfeksiyonu ve cilt yanıkları olan bir hastadan izole edilen tüm beta laktam antibiyotiklere dirençli *K. pneumoniae* izolatında tespit edilmiştir (77). Ardından Kasım 2004-Mart 2005 tarihleri arasında hastanemizde iki farklı çocuk hastanın klinik örneğinden izole edilen imipeneme dirençli *K. pneumoniae* izolatında OXA-48 enzimi bulunmuştur. Aktaş ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada, *Enterobacteriaceae* türleri arasında aktarılabilen beta laktamaz genleri aracılığıyla karbapenem direncinin insanlar arasında yayılabileceği tehdidi vurgulanmıştır (153). Hastanemizde ilk kez tanımlanan OXA-48 enziminin üzerinden geçen 20 yıl sonrasında çalışmamıza alınan tüm izolatlarda saptanması karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının neden olduğu enfeksiyonlardaki geline durumu açıklar niteliktedir.

Yine hastanemizden Mayıs 2006-Şubat 2007 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 39 *K. pneumoniae* izolatında OXA-48 enzimi saptanmış ve daha önce ülkemizden tanımlanan OXA-48 üreten *K. pneumoniae* 11978 klonu ile ilişkili bulunmamıştır. Bu durum, OXA-48 üreten birkaç izolatın İstanbul'da yayıldığını göstermektedir. OXA-48 pozitif karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının oluşturduğu ilk büyük salgın olarak açıklandığı çalışmada iki farklı klondan gelen izolatların çoğunda CTX-M-15 enziminin varlığı gösterilmiştir. GSBL üreten izolatlarla bağlı enfeksiyonların tedavisinde son seçenek olarak kullanılan karbapenemler açısından endişe verici olarak yorumlanmıştır (78).

OXA-48 üreten izolatların sadece ana rezervuar olarak bilinen Türkiye ile sınırlı kalmayıp Orta Doğu ve Kuzey Afrika ülkelerinde yayıldığı görülmüştür (85). Sporadik vakaların yanı sıra OXA-48 üreten *K. pneumoniae*'ye bağlı artan sayıda salgınlar da sadece ülkemizde değil 2011 yılında Belçika'da, Yunanistan, Fransa, Hollanda ve İspanya'da da gözlenmektedir (85, 173-176).

Potron ve arkadaşlarının Ocak 2001 ile Aralık 2011 arasında Avrupa ve Kuzey Afrika ülkelerinden elde edilen OXA-48 enzimi üreten 107 izolatın (67 *K. pneumoniae*, 24 *E. coli* ve 10 *Enterobacter cloacae*) %91,6'sı ertapeneme orta duyarlı ya da dirençli, %66'sı imipeneme duyarlı bulunmuştur. OXA-48 pozitif izolatların %75'inde CTX-M-15 enzimi saptanmış ve bu iki genin aynı transpozon üzerinde bulunması çoğul dirence neden olan genlerin gelecekte daha da yayılabileceği ile açıklanmıştır (177).

2011 yılında Hollanda'daki bir hastanede yatan hastanın *K. pneumoniae* izolatında bla_{CTX-M-15} geni ile birlikte bla_{OXA-48} geni tespit edilmiş, hastanede salgının kaynağı olduğu ve aynı sekans tipine ait olan Fransa ve Fas'ta tanımlanan OXA-48 pozitif *K. pneumoniae* izolatları ile yakın ilişkili bulunmuştur. Tek bir OXA-48 üreten *K. pneumoniae* klonunun Avrupa'daki yayılmasını ortaya koymuştur (178).

2017 yılının Ekim-Aralık ayları arasında, ülkemizin doğu bölgesindeki bir üniversite hastanesinde karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* enfekte hastalarla oluşan salgından şüphe edilerek çalışma yapılmıştır. Bu üç aylık süreçte 21 karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* izolatının dokuzunda bla_{OXA-48} ve bla_{NDM-1} genlerinin birlikte bulunduğu ayrıca bunların yedisinin klonal olarak ilişkili olduğu saptanmıştır (179).

2019 yılında ülkemizdeki 26 hastaneden alınan 493 izolatın (366 *K. pneumoniae* ve 127 *E.coli*) %12,6'sını OXA-48 ve NDM-1 enzimlerinin birlikte bulunduğu izolatlar oluşturmaktadır. Ülkemizdeki çoğu hastanede OXA-48 enzimin endemik hale geçtiği görülmüştür. Ayrıca *K. pneumoniae* izolatlarının %58,7'si herhangi bir karbapeneme dirençli iken, %47,5'i üç karbapeneme de dirençlidir (180). Çalışmamızda tüm izolatlar üç karbapeneme de dirençlidir.

OXA-48 ve NDM, dünya çapında *K. pneumoniae* ile ilişkili en yaygın karbapenemazlar arasındadır ve son yıllarda prevalansı artmıştır. Artan antimikrobiyal direnç ile tedavi stratejileri üzerine değerlendirmeler yapılmıştır (181). Ancak içinde bulunduğumuz bu antimikrobiyal direnç sorunun son derece önemli ve ciddi olması faj tedavilerini düşündürmüş ve moleküler biyolojide yeni yöntemler arasında olan CRISPR-Cas sistemi kullanılarak gen düzenlenmesi amaçlanmıştır.

Son yıllarda dirençli bakterileri antibiyotiklere karşı yeniden duyarlı hale getirmek için CRISPR-Cas sistemi kullanılmaya başlanmıştır. Bikard ve arkadaşları 2014 yılında MRSA (Metilisine dirençli *S. aureus*)'da metisiline duyarlı hale getirmede CRISPR-Cas sisteminin rolünü doğrulamışlardır (182).

Yosef ve arkadaşları 2015 yılında, antibiyotiğe dirençli bakterilerin genomuna CRISPR-Cas sistemini kullanmak için fajları dahil etmiştir. Antibiyotiğe duyarlı bakterileri korurken, litik fajların sadece antibiyotiğe dirençli bakterileri öldürmesine olanak sağlanmıştır. Bunun geliştirilerek hastane yüzeylerinde ve el dezenfektanlarında kullanılabileceği belirtilmiştir (183).

Çoğul dirençli bakterilerde direnç plazmidleri üzerindeki genleri hedeflemek için bir CRISPR dizisi ve birden fazla gRNA kullanarak CRISPR-Cas sistemini tasarlanması gerekmektedir (184). Çalışmamızda çoğul dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının dizi analizlerine ve sahip oldukları direnç genlerine (OXA-48, NDM ve CTX-M-15) göre farklı gRNA dizileri oluşturulmuştur.

Wang ve arkadaşları 2018 yılında CRISPR-Cas sistemi ile klinik örnekten izole edilen iki çoğul dirençli *K. pneumoniae* izolatında gen düzenlenmesi yapmak için iki plazmidli bir sistem olan pCasKP-pSGKP plazmidleriyle çalışma tasarlamıştır. Ayrıca sitidin deaminaz APOBEC1 ve Cas9 nikazından oluşan bir sistemle hem kromozomal hem de plazmid kaynaklı genlerde C'nin T'ye dönüşümü için sitidin deaminaz aracılı baz düzenleme vektörü pBECKP kullanılarak, bla_{KPC-2} geninin karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatının karbapenem direncine katkıda bulunan ana faktör olduğunu doğrulanmıştır. pBECKP vektörü ile dört kodonu (CAA, CAG, CGA ve TGG) programlanabilir bir şekilde erken durdurma kodonlarına dönüştürerek genleri (*dhaF*, *pyrF*, *fepB*, *ramA*, *fosA*, *pyrF*, *fepB* ve *ramA*) geri dönüşümsüz olarak etkisiz hale getirebilen sistem oluşturulmuştur. Bu ikili düzenleme aracının geliştirilmesinin *K. pneumoniae*'de moleküler çalışmaları önemli ölçüde kolaylaştıracağı belirtilmiştir. Çalışmada pCasKP-apr, pCasKP-hph, pSGKP-km, pSGKP-spe, pBECKP-km, pBECKP-spe plazmidleri kullanılmış ve kanamisin dirençli olan izolatlarda kanamisin yerine plazmide apramisin klonlanarak seçilim sağlanmıştır. pCasKP-pSGKP sistemi ve pBECKP sistemi, klinik olarak izole edilmiş çeşitli *K. pneumoniae* izolatlarında düzenleme etkinliklerine sahip olduğu açıklanmıştır (154). Araştırmamızda bu çalışma referans alınarak, aynı plazmidler kullanılmış, benzer şekilde CRISPR ve gen düzenleme yapabilecek şekilde ikili sisteme göre planlanmıştır. Ancak plazmidlerin kanamisin, spektinomisin ve higromisine direnç genlerine sahip olması ve izolatlarımızın araştırılan bu antibiyotiklere dirençli olması bu sistemde karşılaşılan zorlukların temelini oluşturmuştur. İzolatların tümü bu antibiyotiklere dirençli

olduğundan dolayı, apramisine duyarlılıkları araştırılmış ve tümü apramisine duyarlı bulunmuştur. CRISPR-Cas sisteminde kullanılacak ana vektöre apramisin direnç bölgesi ve bu direncin eksprese edilmesini sağlayan promotör bölgesinin başarılı bir şekilde klonlanması gerçekleştirilmiştir. Fakat ana vektöre Cas9 ve APOBEC bölgelerinin klonlanması yapılamamıştır. Bu bölgeler ana vektöre klonlanabilseydi oluşturan ana vektör, her bir *K. pneumoniae* izolatına elektroporasyon ile gönderilecek ve ardından izolatların ertapenem, meropenem ve imipeneme MİK değerleri araştırılacaktı.

Banno ve arkadaşları 2018 yılında, *E. coli*'de CRISPR-Cas sistemi ile altı farklı genin (galK, xylB, manA, pta, adhE ve tpiA) aynı anda multipleks düzenlenmesini sağlamışlardır (Tablo 5-1) (185).

Chen ve arkadaşları 2018 yılında, *P. aeruginosa* izolatlarında hem Cas9 hem de gRNA bölgelerine sahip olan tek plazmid sistemi pCasPAGm plazmidi oluşturmuştur. Bu sistemle wspF geni başarılı bir şekilde silinirken nalD ve rhlR genleri silinememiştir. Sistemin farklı genleri silmedeki tutarsızlığı *P. aeruginosa*'nın intrinsik homolog rekombinasyon kapasitesine bağlanmıştır. Sitidin deaminaz APOBEC1 ve Cas9 enzimi ile tasarlanan ikili sistemde (Tablo 5-1) gen inaktivasyonu ve nokta mutasyonlarını sağlayan temel bir düzenleme sistemi geliştirilmiş ve nalD ve rhlR genleri silinmiştir (186).

Wang ve arkadaşları 2019 yılında, çoğul dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarında erken durdurma kodonlarını tanıtmak için pBECab-apr plazmidi kullanılarak bla_{OXA-23}, bla_{TEM-1D}, bla_{ADC-25} genlerinin fonksiyonlarını araştırılmışlardır. CRISPR-Cas9 ikili düzenleme sistemi ile gen silme ve eklemeyi gerçekleştirmiş ve izolatların imipenem MİK değerlerini önemli ölçüde (2 ile 8 kat) azalttığını göstermişlerdir (187). Çalışmamızda planlanan ikili CRISPR-Cas sistemiyle izolatlara plazmidler gönderilebilseydi başlangıçta yapılan izolatların karbapenemlere MİK değerleriyle karşılaştırılacak ve duyarlılıktaki değişiklik gösterilecekti.

Sun ve arkadaşları 2019 yılında, karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında CRISPR-Cas9 sistemi *tetA* ve *ramR* genlerindeki mutasyonların tigesiklin direnci, *mgrB* geninin silinmesinin ise kolistin direnci ile ilişkili olduğunu göstermiştir (188). Çalışmamızda hedeflenen vektör oluşturulsaydı, bla_{OXA-48}, bla_{NDM-1}, bla_{CTX-M-15} genlerinin ertapenem, meropenem ve imipenem dirençleriyle ilişkisi açıklanacaktı.

Tagliaferri ve arkadaşları 2020 yılında, beta laktamlara dirençli çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Enterobacteriaceae* türlerinde bla_{TEM-1} geninin ifadesini başarıyla azaltmıştır. Kullanılan plazmidler, kloramfenikol, ampicilin ve kanamisine direnç genlerini taşımaktadır. Bu araştırma, *Enterobacteriaceae* üyesi olmasına rağmen farklı türler içermesi (*E. coli*, *Enterobacter hormaechei* and *Klebsiella variicola*) ve farklı antibiyotiklere duyarlı olmaları ile çalışmamızdan ayrılmaktadır (189).

Hao ve arkadaşları 2020 yılında, karbapeneme dirençli çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Enterobacteriaceae* türlerinde bla_{KPC}, bla_{NDM} ve bla_{OXA-48} genlerinin silinmesini gerçekleştirmek için pSGKP-km ve pCasKP plazmidlerinden yararlanmışlardır. pSGKP-km vektöründeki kanamisine direnç bölgesinin yerine rifampisin ve apramisin dirençleri eklenerek sırasıyla pSGKP-rif ve pSGKP-apr; pCasKP vektöründen de Cas9 nükleazı çoğaltılarak her iki plazmide klonlanmıştır. Sonuçta Cas9 bölgesinin klonlamasıyla pCasCure-rif ve pCasCure-apr ana vektörleri oluşturulmuştur. *Enterobacteriaceae* türlerinde bla_{KPC}, bla_{NDM} ve bla_{OXA-48} genlerinin silinmesinde %94'ün üzerinde verimlilik sağlanmış ve karbapenemlere MİK değerleri >16µg/ml'den 0,25µg/ml'ye düşerek yeniden duyarlı hale getirilmiştir. Klinikte uygulanabilir bir sisteme entegre etmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (190). Çalışmamızda aynı şekilde pSGKP-km vektörüne izolatların apramisine duyarlı olması sebebiyle apramisin direnç bölgesi eklenmiş ve yine aynı (pCasKP) vektörden Cas9 nükleazı PCR ile çoğaltılmıştır. Son aşamada gerçekleştirilen Cas9 bölgesinin pSGKP-AmpR(Pro)-AprR plazmidine uyguladığımız tüm ligasyon yöntemleri ile eklenememiştir. Hao ve arkadaşlarının çalışmada Cas9 enzimini hangi ligasyon yöntemi kullanarak klonladıkları belirtilmemiştir.

Tablo 5-1: Gram Negatif Bakterilerde CRISPR-Cas Sisteminde Kullanılan Plazmidler.

Çalışma (Yıl)	Bakteri türü	Plazmid adı	Kaynak No
Wang ve ark. (2018)	<i>K. pneumoniae</i>	pCasKP-apr	154
		pCasKP-hph	
		pSGKP-km	

		pSGKP-spe	
		pBECKP-km	
		pBECKP-spe	
Banno ve ark. (2018)	<i>E. coli</i>	pCas9	185
		pCRISPR	
		pCasPA	
Chen ve ark. (2018)	<i>P. aeruginosa</i>	pACRISPR	186
		pCasAb-apr	
		pSGAb-km	
		pSGAb-spe	
Wang ve ark. (2019)	<i>A. baumannii</i>	pBECAb-apr	187
		pCas9	
		pCRISPR	
		pCasKP-apr	
		pSGKP-spe	
Sun ve ark. (2019)	<i>K. pneumoniae</i>	pSGKP-spe_mgrB	188
		pSGKP-spe_ramR	
		pBECKP-spe	
		pBECKP-spe_tetA	
Tagliaferri ve ark. (2020)	<i>Enterobacteriaceae</i> türleri	pSB1A2	189
		pSB1K3	
		pSB1C3	

Hao ve ark. (2020)	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>türleri</i>	pCasCure-apr pCasCure-rif	190
--------------------	---	------------------------------	-----

Kanada’da 2022 yılında yapılan bir çalışma lac promotör, lac operatör ve katabolit aktivatör proteini içeren 125 bp bir bölge pSPPH21 vektörüne (3520 bp) klonlanamamış ve farklı koşullar (kompetan bakteri, inkübasyon süresi, ligasyon karışımı ve ligasyon oranları) karşılaştırılarak gelecekte yapılacak çalışmalara katkı sağlamak için optimize edilmiş prosedür sunulmuştur (191). Benzer şekilde çalışmamızda, pJET 1.2 ara vektöre klonlanan Cas9 ve APOBEC1 bölgeleri PCR ile çoğaltıldıktan sonra oluşturulan ana vektöre (pSGKP-AmpR(Pro)-AprR) eklenmesi amacıyla T4 DNA ligaz ile 22 °C’de 1 saat, 16 °C’de 18 saat ve 10 °C’de 30 sn-30 °C’de 30 sn olacak şekilde 10 saatlik inkübasyon süreleri ile ligasyon yapılmıştır. Ayrıca her bir koşul için vektör:eklenecek parça oranları 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 şeklinde uygulanmıştır. Transformasyondan oluşan kolonilerden DNA izolasyonu sağlanmış ancak restriksiyon enzimleri ile kesimleri yapıldığında istenen bant boyları görülememiştir.

Ana vektörü oluştururken pSGKP plazmidine AmpR(Pro)-AprR bölgesi TEDA yöntemi ile başarılı bir şekilde eklendiği için Cas9 ve APOBEC1 bölgelerinde de aynı yöntem kullanılmış ancak klonlama ve transformasyon aşamalarından sonra elde edilen kolonilerde klonlanmanın gerçekleşmediği görülmüştür. AmpR(Pro)-AprR bölgesi 760 bp uzunluğunda iken, Cas9 ve APOBEC1 bölgelerinin ise yaklaşık 5000 bp olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

T4 DNA ligaz, TEDA ve AQUA metodları ile yapılan ligasyonlara göre daha yüksek maliyeti olan Gibson Yönteminde; DNA’yı 5’ ile 3’ yönünde ayıran T5 ekzonükleaz, DNA fragmanlarındaki boşlukları dolduran Phusion DNA polimeraz, DNA’da kalan çentikleri kapatan Taq DNA ligaz ve bu sistemde boşlukları dolduran enzim Taq DNA polimerazdan oluşturulan karışım ile etkinliğinin gösterilmesine dayanılarak (160, 161) Cas9 ve APOBEC1 bölgeler ana vektöre bağlama çalışmaları yapılmış ancak restriksiyon enzimleri ile kesilerek yapılan verifikasyonda klonlanmadığı görülmüştür.

CRISPR-Cas teknolojisi, genom düzenlemede devrim niteliğinde olup ökaryotik organizmalara kıyasla prokaryotlara uyarlaması daha yavaş olmuştur. Bakterilerde yaygın bir şekilde uygulanmasında her bir tür/izolat için CRISPR sisteminin kapsamlı karakterizasyonu gerekmektedir. Aynı zamanda Cas9'un sitotoksik olabileceğini, hedef dışı etkilerin görülmesi sebebiyle ve APOBEC gibi sitidin deaminazların prokaryotlarda incelenmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (192).

Nielsen ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptığı çalışmada genel olarak *E. coli* de iyi tolere edilse de Cas9 toksisitesi belirtilmiştir. Toksisite mekanizmasının henüz açıklanamasa da diğer türlerde de bildirildiğini belirtmişlerdir (193).

Farklı çalışmalarda da Cas9'un birçok bakteride toksik olduğu ve hedef dışı etkilerin görülmesi vurgulanmıştır (194-196). Benzer şekilde çalışmamızda da ana vektöre dahil edilmeyen iki bölgenin Cas9 ve APOBEC olması aynı etkilerin söz konusu olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmaya alınan çoğul dirençli *K. pneumoniae* izolatlarına özgü gRNA dizileri oluşturulmuş ve ikili plazmid sistemi tasarımı yapılmıştır. Ana vektöre Cas9 ve APOBEC bölgeleri eklenememiş olsa da, pSGKP-Amp (Pro)-AprR (ana vektör) başarılı bir şekilde oluşturulmuştur. Kullanılan vektörler, ticari olarak satın alınan vektörlerden izolatlara göre tasarlanmış ve modifiye edilmiştir. CRISPR-Cas teknolojisinin yeni ve bu konuda yapılan araştırmaların sınırlı sayıda olması ayrıca çalışmaya ayrılan bütçenin kısıtlı olması çalışmamızın sınırlılıkları arasındadır.

Sonuç olarak, çalışmamızda karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* sorununu ve tedavide etkili ajanların kısıtlı kalması (örn. seftazidim/avibaktam) dirençli mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde yeni çözüm yollarının geliştirilmesi gerektiğine dikkat çekmektedir. Çalışmamız, direnç sorununun giderilmesine olanak sağlayacağı düşünülen CRISPR-Cas sistemi ile dirençli bakterilerin gen düzenleme çalışmalarının yapıldığı ülkemizdeki ilk araştırmadır. Bu çalışmadan elde edilen ön verilere göre, uygun alt yapı, malzeme ve eğitimli personel desteği sağlandığı takdirde, yapılacak daha fazla ve ileri çalışmalar ile *K. pneumoniae* ve diğer çoğul dirençli bakterilerde gen düzenlemesine izin veren CRISPR-Cas sisteminin, mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanım alanı bulabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! Cell Press. 2012.
2. World Health Organization. WHO priority pathogens list for R&D of new antibiotics. [http:// www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/2017](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/2017).
3. van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Virulence. 2017;8(4):460-9.
4. Arato V, Raso MM, Gasperini G, Berlanda Scorza F, Micoli F. Prophylaxis and Treatment against Klebsiella pneumoniae: Current Insights on This Emerging Anti-Microbial Resistant Global Threat. Int J Mol Sci. 2021;22(8).
5. Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of Klebsiella pneumoniae. Nat Rev Microbiol. 2020;18(6):344-59.
6. Knott GJ, Doudna JA. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. Science. 2018;361(6405):866-9.
7. D.L.C. Gary W. Procop GSH, William M. Janda, Elmer , Kluwer W. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. seventh ed2017. 269-71 p.
8. Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of Klebsiella pneumoniae. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8:4.
9. Podschun R, Ullmann U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev. 1998;11(4):589-603.
10. Zaidi AK, Huskins WC, Thaver D, Bhutta ZA, Abbas Z, Goldmann DA. Hospital-acquired neonatal infections in developing countries. Lancet. 2005;365(9465):1175-88.
11. MacKenzie FM, Forbes KJ, Dorai-John T, Amyes SG, Gould IM. Emergence of a carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae. Lancet. 1997;350(9080):783.
12. Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in Klebsiella pneumoniae is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41(3):563-9.
13. Hu Y, Liu C, Shen Z, Zhou H, Cao J, Chen S, et al. Prevalence, risk factors and molecular epidemiology of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in patients from Zhejiang, China, 2008-2018. Emerg Microbes Infect. 2020;9(1):1771-9.
14. Rello J, Kalwaje Eshwara V, Lagunes L, Alves J, Wunderink RG, Conway-Morris A, et al. A global priority list of the TOP TEN resistant Microorganisms (TOTEM) study at intensive care: a prioritization exercise based on multi-criteria decision analysis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2019;38(2):319-23.
15. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2020. . European Centre for Disease Prevention and Control. 2022.
16. Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial

resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(27):E3574-81.

17. Bengoechea JA, Sa Pessoa J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiol Rev*. 2019;43(2):123-44.
18. Bush K, Bradford PA. beta-Lactams and beta-Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(8).
19. Georgopapadakou NH, Liu FY. Penicillin-binding proteins in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 1980;18(1):148-57.
20. Lima LM, Silva B, Barbosa G, Barreiro EJ. beta-lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *Eur J Med Chem*. 2020;208:112829.
21. Cole M. 'Beta-lactams' as beta-lactamase inhibitors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980;289(1036):207-23.
22. Brown AG, Butterworth D, Cole M, Hanscomb G, Hood JD, Reading C, et al. Naturally-occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity. *J Antibiot (Tokyo)*. 1976;29(6):668-9.
23. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(11):4943-60.
24. Kahan JS, Kahan FM, Goegelman R, Currie SA, Jackson M, Stapley EO, et al. Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *J Antibiot (Tokyo)*. 1979;32(1):1-12.
25. Zhanel GG, Johanson C, Embil JM, Noreddin A, Gin A, Vercaigne L, et al. Ertapenem: review of a new carbapenem. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2005;3(1):23-39.
26. Nunez LE, Mendez C, Brana AF, Blanco G, Salas JA. The biosynthetic gene cluster for the beta-lactam carbapenem thienamycin in *Streptomyces cattleya*. *Chem Biol*. 2003;10(4):301-11.
27. Hashizume T, Ishino F, Nakagawa J, Tamaki S, Matsushashi M. Studies on the mechanism of action of imipenem (N-formimidoylthienamycin) in vitro: binding to the penicillin-binding proteins (PBPs) in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and inhibition of enzyme activities due to the PBPs in *E. coli*. *J Antibiot (Tokyo)*. 1984;37(4):394-400.
28. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ, et al. Comparative review of the carbapenems. *Drugs*. 2007;67(7):1027-52.
29. Norrby SR. Carbapenems. *Med Clin North Am*. 1995;79(4):745-59.
30. Hellinger WC, Brewer NS. Carbapenems and monobactams: imipenem, meropenem, and aztreonam. *Mayo Clin Proc*. 1999;74(4):420-34.
31. Edwards SJ, Emmas CE, Campbell HE. Systematic review comparing meropenem with imipenem plus cilastatin in the treatment of severe infections. *Curr Med Res Opin*. 2005;21(5):785-94.
32. Livermore DM, Sefton AM, Scott GM. Properties and potential of ertapenem. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(3):331-44.
33. Curran M, Simpson D, Perry C. Ertapenem: a review of its use in the management of bacterial infections. *Drugs*. 2003;63(17):1855-78.
34. Shah PM, Isaacs RD. Ertapenem, the first of a new group of carbapenems. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(4):538-42.
35. Ge Y, Wikler MA, Sahm DF, Blosser-Middleton RS, Karlowksy JA. In vitro antimicrobial activity of doripenem, a new carbapenem. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(4):1384-96.

36. Walsh F. Doripenem: A new carbapenem antibiotic a review of comparative antimicrobial and bactericidal activities. *Ther Clin Risk Manag.* 2007;3(5):789-94.
37. Miyazaki S, Hosoyama T, Furuya N, Ishii Y, Matsumoto T, Ohno A, et al. In vitro and in vivo antibacterial activities of L-084, a novel oral carbapenem, against causative organisms of respiratory tract infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(1):203-7.
38. Kuroki H, Tateno N, Ikeda H, Saito N. Investigation of pneumonia-causing pathogenic organisms in children and the usefulness of tebipenem pivoxil for their treatment. *J Infect Chemother.* 2010;16(4):280-7.
39. Hikida M, Kawashima K, Yoshida M, Mitsuhashi S. Inactivation of new carbapenem antibiotics by dehydropeptidase-I from porcine and human renal cortex. *J Antimicrob Chemother.* 1992;30(2):129-34.
40. Perry CM, Ibbotson T. Biapenem. *Drugs.* 2002;62(15):2221-34; discussion 35.
41. Bassetti M, Nicolini L, Esposito S, Righi E, Viscoli C. Current status of newer carbapenems. *Curr Med Chem.* 2009;16(5):564-75.
42. Lucic A, Hinchliffe P, Malla TR, Tooke CL, Brem J, Calvopina K, et al. Faropenem reacts with serine and metallo-beta-lactamases to give multiple products. *Eur J Med Chem.* 2021;215:113257.
43. Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance. World Health Organization. 2014.
44. Doi Y, Paterson DL. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Semin Respir Crit Care Med.* 2015;36(1):74-84.
45. van Duin D, Bonomo RA. Ceftazidime/Avibactam and Ceftolozane/Tazobactam: Second-generation beta-Lactam/beta-Lactamase Inhibitor Combinations. *Clin Infect Dis.* 2016;63(2):234-41.
46. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S. Activity of MK-7655 combined with imipenem against Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(10):2286-90.
47. Yahav D, Giske CG, Gramatniece A, Abodakpi H, Tam VH, Leibovici L. Erratum for Yahav et al., "New beta-Lactam-beta-Lactamase Inhibitor Combinations". *Clin Microbiol Rev.* 2021;34(2).
48. Hecker SJ, Reddy KR, Totrov M, Hirst GC, Lomovskaya O, Griffith DC, et al. Discovery of a Cyclic Boronic Acid beta-Lactamase Inhibitor (RPX7009) with Utility vs Class A Serine Carbapenemases. *J Med Chem.* 2015;58(9):3682-92.
49. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):440-58, table of contents.
50. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980;289(1036):321-31.
51. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):969-76.
52. Ambler RP, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, et al. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J.* 1991;276 (Pt 1):269-70.
53. Naas T, Vandael L, Sougakoff W, Livermore DM, Nordmann P. Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38(6):1262-70.

54. Fairfax MR, Queenan AM, Lephart PR, Kaye KS, Dror M, Arnous N, et al. Detection of 2 SME-1 carbapenemase-producing *Serratia marcescens* in Detroit. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;71(3):325-6.
55. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Ch*. 2001;45(4):1151-61.
56. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(9):785-96.
57. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*. 2009;9(4):228-36.
58. Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase blaKPC-2 gene. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(9):1349-56.
59. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(9):821-30.
60. Baraniak A, Grabowska A, Izdebski R, Fielt J, Herda M, Bojarska K, et al. Molecular characteristics of KPC-producing Enterobacteriaceae at the early stage of their dissemination in Poland, 2008-2009. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(12):5493-9.
61. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(1):1-14.
62. Canton R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol*. 2006;9(5):466-75.
63. Lascols C, Hackel M, Hujer AM, Marshall SH, Bouchillon SK, Hoban DJ, et al. Using nucleic acid microarrays to perform molecular epidemiology and detect novel beta-lactamases: a snapshot of extended-spectrum beta-lactamases throughout the world. *J Clin Microbiol*. 2012;50(5):1632-9.
64. Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME, Turton J, Fagan EJ, James D, et al. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54(4):735-43.
65. Lartigue MF, Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. First description of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in Turkey. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(2):315-6.
66. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(12):4654-61.
67. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(2):306-25.
68. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991;35(1):147-51.
69. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(12):5046-54.

70. Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol.* 2011;19(12):588-95.
71. Poirel L, Yilmaz M, Istanbulu A, Arslan F, Mert A, Bernabeu S, et al. Spread of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in a neonatal intensive care unit in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(5):2929-33.
72. Poirel L, Savov E, Nazli A, Trifonova A, Todorova I, Gergova I, et al. Outbreak caused by NDM-1- and RmtB-producing *Escherichia coli* in Bulgaria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(4):2472-4.
73. Poirel L, Ozdamar M, Ocampo-Sosa AA, Turkoglu S, Ozer UG, Nordmann P. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* now in Turkey. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(5):2784-5.
74. Livermore DM, Walsh TR, Toleman M, Woodford N. Balkan NDM-1: escape or transplant? *Lancet Infect Dis.* 2011;11(3):164.
75. Aktas Z, Kayacan C, Oncul O. In vitro activity of avibactam (NXL104) in combination with beta-lactams against Gram-negative bacteria, including OXA-48 beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39(1):86-9.
76. Lomovskaya O, Sun D, Rubio-Aparicio D, Nelson K, Tsivkovski R, Griffith DC, et al. Vaborbactam: Spectrum of Beta-Lactamase Inhibition and Impact of Resistance Mechanisms on Activity in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(11).
77. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(1):15-22.
78. Carrer A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(8):2950-4.
79. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases.* 2011;17(10):1791-8.
80. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(1):559-62.
81. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Derepressed transfer properties leading to the efficient spread of the plasmid encoding carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):467-71.
82. Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing Enterobacteriaceae in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(3):1274-8.
83. Potron A, Rondinaud E, Poirel L, Belmonte O, Boyer S, Camiade S, et al. Genetic and biochemical characterisation of OXA-232, a carbapenem-hydrolysing class D beta-lactamase from Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;41(4):325-9.
84. Poirel L, Castanheira M, Carrer A, Rodriguez CP, Jones RN, Smayevsky J, et al. OXA-163, an OXA-48-related class D beta-lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(6):2546-51.
85. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(7):1597-606.

86. Potron A, Nordmann P, Lafeuille E, Al Maskari Z, Al Rashdi F, Poirel L. Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(10):4896-9.
87. Samuelsen O, Naseer U, Karah N, Lindemann PC, Kanestrom A, Leegaard TM, et al. Identification of Enterobacteriaceae isolates with OXA-48 and coproduction of OXA-181 and NDM-1 in Norway. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(7):1682-5.
88. Doi Y, O'Hara JA, Lando JF, Querry AM, Townsend BM, Pasculle AW, et al. Co-production of NDM-1 and OXA-232 by *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(1):163-5.
89. Lupski JR, Roth JR, Weinstock GM. Chromosomal duplications in bacteria, fruit flies, and humans. *Am J Hum Genet*. 1996;58(1):21-7.
90. Bachellier S, Clement JM, Hofnung M, Gilson E. Bacterial interspersed mosaic elements (BIMEs) are a major source of sequence polymorphism in *Escherichia coli* intergenic regions including specific associations with a new insertion sequence. *Genetics*. 1997;145(3):551-62.
91. van Belkum A, Scherer S, van Alphen L, Verbrugh H. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62(2):275-93.
92. Dybvig K. DNA rearrangements and phenotypic switching in prokaryotes. *Mol Microbiol*. 1993;10(3):465-71.
93. Belland RJ, Morrison SG, Carlson JH, Hogan DM. Promoter strength influences phase variation of neisserial opa genes. *Mol Microbiol*. 1997;23(1):123-35.
94. Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*. 2002;43(6):1565-75.
95. Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*. 1995;269(5223):496-512.
96. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. 1987;169(12):5429-33.
97. Groenen PM, Bunschoten AE, van Soolingen D, van Embden JD. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol Microbiol*. 1993;10(5):1057-65.
98. Mojica FJ, Ferrer C, Juez G, Rodriguez-Valera F. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Mol Microbiol*. 1995;17(1):85-93.
99. Hoe N, Nakashima K, Grigsby D, Pan X, Dou SJ, Naidich S, et al. Rapid molecular genetic subtyping of serotype M1 group A *Streptococcus* strains. *Emerg Infect Dis*. 1999;5(2):254-63.
100. Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol*. 2000;36(1):244-6.
101. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*. 1997;35(4):907-14.

102. van Embden JD, van Gorkom T, Kremer K, Jansen R, van Der Zeijst BA, Schouls LM. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *J Bacteriol.* 2000;182(9):2393-401.
103. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 2007;315(5819):1709-12.
104. Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJ, Snijders AP, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science.* 2008;321(5891):960-4.
105. Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science.* 2008;322(5909):1843-5.
106. Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature.* 2012;482(7385):331-8.
107. Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet.* 2011;45:273-97.
108. Terns MP, Terns RM. CRISPR-based adaptive immune systems. *Curr Opin Microbiol.* 2011;14(3):321-7.
109. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature.* 2011;471(7340):602-7.
110. Jinek M, Jiang F, Taylor DW, Sternberg SH, Kaya E, Ma E, et al. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science.* 2014;343(6176):1247997.
111. Wang R, Preamplume G, Terns MP, Terns RM, Li H. Interaction of the Cas6 ribonuclease with CRISPR RNAs: recognition and cleavage. *Structure.* 2011;19(2):257-64.
112. Sashital DG, Jinek M, Doudna JA. An RNA-induced conformational change required for CRISPR RNA cleavage by the endonuclease Cse3. *Nat Struct Mol Biol.* 2011;18(6):680-7.
113. Lintner NG, Kerou M, Brumfield SK, Graham S, Liu H, Naismith JH, et al. Structural and functional characterization of an archaeal clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)-associated complex for antiviral defense (CASCADE). *J Biol Chem.* 2011;286(24):21643-56.
114. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012;337(6096):816-21.
115. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(6):467-77.
116. Gottesman S. Microbiology: Dicing defence in bacteria. *Nature.* 2011;471(7340):588-9.
117. Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature.* 2010;468(7320):67-71.
118. Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(21):9275-82.

119. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13(11):722-36.
120. Makarova KS, Aravind L, Wolf YI, Koonin EV. Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biol Direct.* 2011;6:38.
121. Huo Y, Nam KH, Ding F, Lee H, Wu L, Xiao Y, et al. Structures of CRISPR Cas3 offer mechanistic insights into Cascade-activated DNA unwinding and degradation. *Nat Struct Mol Biol.* 2014;21(9):771-7.
122. Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJJ, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat Rev Microbiol.* 2020;18(2):67-83.
123. Ozcan A, Pausch P, Linden A, Wulf A, Schuhle K, Heider J, et al. Type IV CRISPR RNA processing and effector complex formation in *Aromatoleum aromaticum*. *Nat Microbiol.* 2019;4(1):89-96.
124. Koonin EV, Makarova KS, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol.* 2017;37:67-78.
125. Shmakov S, Smargon A, Scott D, Cox D, Pyzocha N, Yan W, et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15(3):169-82.
126. Burstein D, Harrington LB, Strutt SC, Probst AJ, Anantharaman K, Thomas BC, et al. New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes. *Nature.* 2017;542(7640):237-41.
127. Chylinski K, Makarova KS, Charpentier E, Koonin EV. Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(10):6091-105.
128. Briner AE, Donohoue PD, Gomaa AA, Selle K, Slorach EM, Nye CH, et al. Guide RNA functional modules direct Cas9 activity and orthogonality. *Mol Cell.* 2014;56(2):333-9.
129. Charpentier E, Richter H, van der Oost J, White MF. Biogenesis pathways of RNA guides in archaeal and bacterial CRISPR-Cas adaptive immunity. *FEMS Microbiol Rev.* 2015;39(3):428-41.
130. Schunder E, Rydzewski K, Grunow R, Heuner K. First indication for a functional CRISPR/Cas system in *Francisella tularensis*. *Int J Med Microbiol.* 2013;303(2):51-60.
131. Makarova KS, Koonin EV. Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. *Methods Mol Biol.* 2015;1311:47-75.
132. Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, Wolf YI, Gootenberg JS, Semenova E, et al. Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Mol Cell.* 2015;60(3):385-97.
133. Smargon AA, Cox DBT, Pyzocha NK, Zheng K, Slaymaker IM, Gootenberg JS, et al. Cas13b Is a Type VI-B CRISPR-Associated RNA-Guided RNase Differentially Regulated by Accessory Proteins Csx27 and Csx28. *Mol Cell.* 2017;65(4):618-30 e7.
134. Anantharaman V, Makarova KS, Burroughs AM, Koonin EV, Aravind L. Comprehensive analysis of the HEPN superfamily: identification of novel roles in intra-genomic conflicts, defense, pathogenesis and RNA processing. *Biol Direct.* 2013;8:15.
135. Mojica FJM, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology (Reading).* 2009;155(Pt 3):733-40.
136. Marraffini LA, Sontheimer EJ. Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature.* 2010;463(7280):568-71.

137. Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu Rev Biophys.* 2017;46:505-29.
138. Murugan K, Babu K, Sundaresan R, Rajan R, Sashital DG. The Revolution Continues: Newly Discovered Systems Expand the CRISPR-Cas Toolkit. *Mol Cell.* 2017;68(1):15-25.
139. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(39):E2579-86.
140. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 2013;339(6121):819-23.
141. Zhang Y, Heidrich N, Ampattu BJ, Gunderson CW, Seifert HS, Schoen C, et al. Processing-independent CRISPR RNAs limit natural transformation in *Neisseria meningitidis*. *Mol Cell.* 2013;50(4):488-503.
142. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2281-308.
143. Andersson AF, Banfield JF. Virus population dynamics and acquired virus resistance in natural microbial communities. *Science.* 2008;320(5879):1047-50.
144. Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science.* 2010;327(5962):167-70.
145. Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology (Reading).* 2005;151(Pt 3):653-63.
146. Horvath P, Romero DA, Coute-Monvoisin AC, Richards M, Deveau H, Moineau S, et al. Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol.* 2008;190(4):1401-12.
147. Hale CR, Zhao P, Olson S, Duff MO, Graveley BR, Wells L, et al. RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell.* 2009;139(5):945-56.
148. Carte J, Wang R, Li H, Terns RM, Terns MP. Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. *Genes Dev.* 2008;22(24):3489-96.
149. Carte J, Pfister NT, Compton MM, Terns RM, Terns MP. Binding and cleavage of CRISPR RNA by Cas6. *RNA.* 2010;16(11):2181-8.
150. Haurwitz RE, Jinek M, Wiedenheft B, Zhou K, Doudna JA. Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science.* 2010;329(5997):1355-8.
151. Deveau H, Barrangou R, Garneau JE, Labonte J, Fremaux C, Boyaval P, et al. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol.* 2008;190(4):1390-400.
152. EUCAST warnings concerning antimicrobial susceptibility testing products or procedures. Available from: URL: http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/warnings/. Alıntılanma tarihi 19.08.2019.
153. Aktas Z, Kayacan CB, Schneider I, Can B, Midilli K, Bauernfeind A. Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, OXA-48, persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy.* 2008;54(2):101-6.
154. Wang Y, Wang S, Chen W, Song L, Zhang Y, Shen Z, et al. CRISPR-Cas9 and CRISPR-Assisted Cytidine Deaminase Enable Precise and Efficient Genome Editing in *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol.* 2018;84(23).

155. Chang AY, Chau V, Landas JA, Pang Y. Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. *JEMI methods*. 2017;1:22-5.
156. Tu Z, He G, Li KX, Chen MJ, Chang J, Chen L, et al. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2005;8(1):113-20.
157. Saunders SE, Burke JF. Rapid isolation of miniprep DNA for double strand sequencing. *Nucleic Acids Research*. 1990;18(16):4948.
158. Xia Y, Li K, Li J, Wang T, Gu L, Xun L. T5 exonuclease-dependent assembly offers a low-cost method for efficient cloning and site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(3):e15.
159. Beyer HM, Gonschorek P, Samodelov SL, Meier M, Weber W, Zurbriggen MD. AQUA Cloning: A Versatile and Simple Enzyme-Free Cloning Approach. *PLoS One*. 2015;10(9):e0137652.
160. Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA, 3rd, Smith HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods*. 2009;6(5):343-5.
161. Gibson DG, Benders GA, Andrews-Pfannkoch C, Denisova EA, Baden-Tillson H, Zaveri J, et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science*. 2008;319(5867):1215-20.
162. Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods*. 2014;11(8):783-4.
163. Antimicrobial Resistance C. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022;399(10325):629-55.
164. Cui X, Zhang H, Du H. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Detection and Antimicrobial Therapy. *Front Microbiol*. 2019;10:1823.
165. Tsang KY, Luk S, Lo JY, Tsang TY, Lai ST, Ng TK. Hong Kong experiences the 'Ultimate superbug': NDM-1 Enterobacteriaceae. *Hong Kong Med J*. 2012;18(5):439-41.
166. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Biomed Res Int*. 2014;2014:249856.
167. Nordmann P, Poirel L, Toleman MA, Walsh TR. Does broad-spectrum beta-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(4):689-92.
168. Candan ED, Aksoz N. *Klebsiella pneumoniae*: characteristics of carbapenem resistance and virulence factors. *Acta Biochim Pol*. 2015;62(4):867-74.
169. Alp E, Percin D, Colakoglu S, Durmaz S, Kurkcu CA, Ekinoglu P, et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary university hospital in Turkey. *J Hosp Infect*. 2013;84(2):178-80.
170. Karabay O, Altindis M, Koroglu M, Karatuna O, Aydemir OA, Erdem AF. The carbapenem-resistant Enterobacteriaceae threat is growing: NDM-1 epidemic at a training hospital in Turkey. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2016;15:6.
171. Gonullu N, Aktas Z, Kayacan CB, Salcioglu M, Carattoli A, Yong DE, et al. Dissemination of CTX-M-15 beta-lactamase genes carried on Inc FI and FII plasmids among clinical isolates of *Escherichia coli* in a university hospital in Istanbul, Turkey. *J Clin Microbiol*. 2008;46(3):1110-2.
172. Cakar A, Akyon Y, Gur D, Karatuna O, Ogunc D, Ozhak Baysan B, et al. [Investigation of carbapenemases in carbapenem-resistant *Escherichia coli* and

- Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2014 in Turkey]. *Mikrobiyol Bul.* 2016;50(1):21-33.
173. Cuzon G, Ouanich J, Gondret R, Naas T, Nordmann P. Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(5):2420-3.
 174. Pitart C, Sole M, Roca I, Fabrega A, Vila J, Marco F. First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(9):4398-401.
 175. Glupczynski Y, Huang TD, Bouchahrouf W, Rezende de Castro R, Bauraing C, Gerard M, et al. Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates in Belgian hospitals. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39(2):168-72.
 176. Voulgari E, Zarkotou O, Ranellou K, Karageorgopoulos DE, Vrioni G, Mamali V, et al. Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(1):84-8.
 177. Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill.* 2013;18(31).
 178. Potron A, Kalpoe J, Poirel L, Nordmann P. European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(12):E24-6.
 179. Duman Y, Ersoy Y, Gursoy NC, Altunisik Toplu S, Otlu B. A silent outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* that co-produced NDM-1 and OXA-48 carbapenemases, and infection control measures. *Iran J Basic Med Sci.* 2020;23(1):46-50.
 180. Suzuk Yildiz S, Simsek H, Bakkaloglu Z, Numanoglu Cevik Y, Hekimoglu CH, Kilic S, et al. [The Epidemiology of Carbapenemases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated in 2019 in Turkey]. *Mikrobiyol Bul.* 2021;55(1):1-16.
 181. Isler B, Aslan AT, Akova M, Harris P, Paterson DL. Treatment strategies for OXA-48-like and NDM producing *Klebsiella pneumoniae* infections. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2022:1-12.
 182. Bikard D, Euler CW, Jiang W, Nussenzweig PM, Goldberg GW, Duportet X, et al. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nat Biotechnol.* 2014;32(11):1146-50.
 183. Yosef I, Manor M, Kiro R, Qimron U. Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(23):7267-72.
 184. Wu Y, Battalapalli D, Hakeem MJ, Selamneni V, Zhang P, Draz MS, et al. Engineered CRISPR-Cas systems for the detection and control of antibiotic-resistant infections. *J Nanobiotechnology.* 2021;19(1):401.
 185. Banno S, Nishida K, Arazoe T, Mitsunobu H, Kondo A. Deaminase-mediated multiplex genome editing in *Escherichia coli*. *Nat Microbiol.* 2018;3(4):423-9.
 186. Chen W, Zhang Y, Zhang Y, Pi Y, Gu T, Song L, et al. CRISPR/Cas9-based Genome Editing in *Pseudomonas aeruginosa* and Cytidine Deaminase-Mediated Base Editing in *Pseudomonas* Species. *iScience.* 2018;6:222-31.
 187. Wang Y, Wang Z, Chen Y, Hua X, Yu Y, Ji Q. A Highly Efficient CRISPR-Cas9-Based Genome Engineering Platform in *Acinetobacter baumannii* to Understand the H₂O₂-Sensing Mechanism of OxyR. *Cell Chem Biol.* 2019;26(12):1732-42 e5.

188. Sun Q, Wang Y, Dong N, Shen L, Zhou H, Hu Y, et al. Application of CRISPR/Cas9-Based Genome Editing in Studying the Mechanism of Pandrug Resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(7).
189. Tagliaferri TL, Guimaraes NR, Pereira MPM, Vilela LFF, Horz HP, Dos Santos SG, et al. Exploring the Potential of CRISPR-Cas9 Under Challenging Conditions: Facing High-Copy Plasmids and Counteracting Beta-Lactam Resistance in Clinical Strains of Enterobacteriaceae. *Front Microbiol*. 2020;11:578.
190. Hao MJ, He YZ, Zhang HF, Liao XP, Liu YH, Sun J, et al. CRISPR-Cas9-Mediated Carbapenemase Gene and Plasmid Curing in Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Ch*. 2020;64(9).
191. MacPherson K. MJ, Haroon N. , Musa A. Cloning optimization for substrate-induced gene expression technology. *Undergraduate Journal of Experimental Microbiology and Immunology (UJEMI)*. 2022;27:1-12.
192. Arroyo-Olarte RD, Bravo Rodriguez R, Morales-Rios E. Genome Editing in Bacteria: CRISPR-Cas and Beyond. *Microorganisms*. 2021;9(4).
193. Nielsen AA, Voigt CA. Multi-input CRISPR/Cas genetic circuits that interface host regulatory networks. *Mol Syst Biol*. 2014;10:763.
194. Zhang S, Voigt CA. Engineered dCas9 with reduced toxicity in bacteria: implications for genetic circuit design. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(20):11115-25.
195. Lee YJ, Hoynes-O'Connor A, Leong MC, Moon TS. Programmable control of bacterial gene expression with the combined CRISPR and antisense RNA system. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(5):2462-73.
196. Alberti F, Corre C. Editing streptomycete genomes in the CRISPR/Cas9 age. *Nat Prod Rep*. 2019;36(9):1237-48.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN ÇOĞUL DİRENÇLİ KLEBSIELLA PNEUMONIAE İZOLATLARINDA CRISPR-CAS SİSTEMİ İLE GEN DÜZENLEMESİNİN YAPILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% **17**
BENZERLİK ENDEKSİ

% **15**
İNTERNET KAYNAKLARI

% **5**
YAYINLAR

% **4**
ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%6
2	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	%4
3	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
4	iupress.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
5	Submitted to Mehmet Akif Ersoy Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
6	dspace.cuni.cz İnternet Kaynağı	<%1
7	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	Submitted to University of Liverpool Öğrenci Ödevi	<%1