

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TRANSGENİK TÜTÜNDE CRISPR/CAS9 SİSTEMİ
KULLANILARAK SİSTEİN PROTEAZ GEN (*NtCP6*)
EKSPRESYONUNUN SUSTURULMASINA YÖNELİK
ÇALIŞMALAR

ÇİĞDEM BOZKURT
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2020

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TRANSGENİK TÜTÜNDE CRISPR/CAS9
SİSTEMİ KULLANILARAK SİSTEİN
PROTEAZ GEN (*NtCP6*)
EKSPRESYONUNUN SUSTURULMASINA
YÖNELİK ÇALIŞMALAR

ÇİĞDEM BOZKURT
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
DR. ÖĞRETİM ÜYESİ F. İNCİ ÖZDEMİR
II. DANIŞMANI
PROF. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ

GEBZE

2020

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**STUDIES FOR SILENCING THE PROTEASE
GEN (NtCP6) EXPRESSION BY USING
CRISPR / CAS9 SYSTEM IN TRANSGENIC
TOBACCO**

ÇİĞDEM BOZKURT
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
ASSIST. PROF. DR. FATMA İNCİ ÖZDEMİR
II. THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ

GEBZE

2020

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 24/07/2020 tarih ve 2020/36 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 27/07/2020 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Çiğdem BOZKURT'un tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Dr. Öğr. Üye. F. İNCİ ÖZDEMİR

ÜYE

: Prof. Dr. SEDEF TUNCA GEDİK

ÜYE

: Doç.Dr. ERGUN KAYA

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Son yıllarda bitkiler, artan oranda rekombinant proteinlerin üretimi için alternatif konakçılar olarak kullanılmaktadırlar. Tütün yabancı proteinlerin ekspresyonu için önemli konakçılardan biridir. Bununla birlikte, üretimde karşılaşılan ana sorunlardan biri, ürün ekstraksiyonu ve saflaştırılmasından önce hasat edilen biyokütlenin depolanması sırasında yabancı proteinin stabilitesidir. Aspartik ve sistein (papain benzeri sistein) proteazları gibi endojen proteazlar, genellikle depolama sırasında protein kaybından sorumlu olarak kabul edilir. Proteaz aktivitesinin, rekombinant protein üretimini iyileştirmek ve ekonomik olarak üretilmesine izin vermek için susturulabileceği düşünülmektedir. Böylece bu çalışmada, yabancı protein birikimini engellediği düşünülen NTCP6 geninin (GeneID: 107781604) CRISPR / Cas9 sistemi kullanılarak transgenik tütünde bakteriyel nitroredüktaz geni olan Ssap-NtrB'nin susturulmasını amaçladık. Tütün bitkisinde NtCP6 geninin ilk ekzonunda iki bölgeyi hedef alan sgRNA kasetleri oluşturulmuştur. Oluşturulan bu kasetlerle enzim kesim/ligasyon reaksiyonu ile tam bir ekspresyon kaseti elde edilmiş ve Golden gate klonlama ile pYLCRISPR/Cas9 plazmitine aktarılmıştır. pYLCRISPR/Cas9 plazmiti aktarılan Agrobacterium transgenik tütün bitkilerine infiltrasyon yöntemiyle transforme edilmiştir. Gözlenen morfolojik farklılıklar, sürgün uzamasının 7 kat azaldığını ve kök oluşumunun, kontrole kıyasla rejenere mutant tütün bitkilerinde geciktiğini gösterdi. Bu sonuçlara göre; bitki papain benzeri sistein proteazlarının bitkilerde yabancı protein stabilitesinde önemli bir rol oynamasının yanısıra bitki büyüme ve gelişiminde de etkili olduğu gözlenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Crispr/Cas9, Sistein Proteaz, Rekombinant Protein, Transgenik Tütün.

SUMMARY

In recent years, plants have been used as alternative hosts for the production of increasingly recombinant proteins. Tobacco is one of the attractive host system for expression of the foreign proteins. However, one of the main problems faced in production is the stability of the foreign protein during storage of the harvested biomass prior to the product extraction and purification is the main problem. Endogenous proteases such as aspartic and cysteine (papain-like cysteine) proteases are generally considered as responsible for protein loss during storage. It is contemplated that protease activity may be silenced to improve recombinant protein production and allow it to be produced economically. Thus, in this study, we aimed to silence the *NTCP6* gene (GeneID: 107781604) which is thought to inhibit the accumulation of foreign protein, in this case bacterial nitroreductase gene, *Ssap-NtrB*, in transgenic tobacco by using CRISPR/Cas9 system. In the tobacco plant, sgRNA cassettes are created that target two regions in the first exon of the *NtCP6* gene. With these cassettes, a complete expression cassette was obtained by enzyme cut / ligation reaction and transferred to pYLCRISPR / Cas9 plasmid by Golden gate cloning. The pYLCRISPR / Cas9 plasmid transferred to *Agrobacterium* were transferred to transgenic tobacco plant by infiltration method. The observed morphological differences showed that shoot elongation was reduced 7 fold and root formation was delayed in regenerated mutant tobacco plants in comparison to controls. Based on the these results, although plant papain-like cysteine proteases seems to play an important role in foreign protein stability in plants, it also effects the plant growth and development.

Key Words: Crispr/Cas9, Cysteine Protease, Recombinant Protein, Transgenic Tobacco.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman desteklerini üzerimde hissettiğim, bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren, anlayışını, sabrını ve güler yüzünü benden hiç esirgemeyen birlikte çalışmaktan büyük onur ve mutluluk duyduğum değerli danışmanlarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi F. İnci Özdemir'e ve Sayın Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ'ye,

Yüksek lisans eğitimim sırasında desteğini ve güler yüzünü esirgememiş olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Sedef Tunca Gedik'e,

Her türlü yardımlarını, desteklerini, dostluklarını sakınmayan, birlikte çokça güzel anılar biriktirdiğimiz sevgili laboratuvar arkadaşlarım Nagihan GENEL, Buse ÇINAR, Zeynep GİRGİN ERSOY, Halil YILMAZ, Aslı BAYRAKTAR KAVALCI, Ğarip DEMİR ve Mouktar BARKAD'a,

Tüm süreç boyunca ne zaman ihtiyacım olsa özveriyle destek olan sevgili arkadaşlarım İrem BAKŞAN İLTER, Ömer İLTER, İlkay ÜNAL, Nicat CEBRAİLOĞLU ve çalışmamda yardımcı olan Bitki Biyoteknolojisi laboratuvar ekibine,

Gebze Teknik Üniversitesi'nde tanıştığım ve arkadaşlıklarını saymakla bitiremeyeceğim yardımlarını ve muhabbetlerini eksiltmeyen bütün arkadaşlarıma,

Her zaman olduğu gibi bu zorlu süreçte de yanımda olan kıymetli arkadaşım Oğuzhan GÜRHAHTA'ya,

Son olarak, beni yetiştiren, eğitimim boyunca benden desteği esirgemeyen, her döneminde yanımda bulunan çok kıymetli annem Gamze BOZKURT ve babam Hüseyin BOZKURT'a; her zaman yanımda olan çok sevgili kardeşlerim Zeynep BOZKURT, Bahar BOZKURT ve Ayhan BOZKURT'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	xiv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Bitkilerde Rekombinant Protein Üretimi	4
2.1.2. Nicotiana Tabacum	5
2.2. Kırletici Nitroaromatikler	5
2.3. Nitroredüktazlar	7
2.4. Kırletici Nitroaromatiklerin Fitoremediasyonu ve Transgenik Bitkilerin Kullanımı	7
2.5. Bitkilerde Rekombinant Protein Üretimini Arttırma Yöntemleri	10
2.5.1. Stabilize Edici Ajanların Eklenmesi	11
2.5.2. Proteaz İnhibitörlerinin İfadesi	12
2.5.3. Subsellüler Hedefleme ve Füzyon Proteinleri	13
2.5.4. Gen Baskılama	13
2.6. Bitki Papain Benzeri Sistein Proteazları	15
2.6.1. Papain Benzeri Sistein Proteazların Rekombinant Protein Üretimine Etkisi	18
2.6.2. Papain Benzeri Sistein Proteazların Tohum Çimlenmesindeki Fonksiyonu	19

2.6.3. Papain Benzeri Sistein Proteazların Programlanmış Hücre Ölümündeki Rolü	20
2.6.4. Papain Benzeri Sistein Proteazların Yaprak Yaşlanma Sürecindeki Rolü	21
2.6.5. Stres Koşulları Altında Papain Benzeri Sistein Proteazların Fonksiyonu	22
2.6.6. Papain Benzeri Sistein Proteazların Bitki Savunma Sistemindeki Rolü	23
2.7. CRISPR CAS9 Sistemi	25
3. MATERYAL VE YÖNTEM	29
3.1. Materyal	29
3.1.1. Kullanılan Bitki Materyali	29
3.1.2. Kullanılan Mikroorganizma Suşları	29
3.1.3. Kullanılan Plazmitler	29
3.1.4. Kullanılan Enzimler ve Antibiyotikler	32
3.1.5. Kullanılan DNA Moleküler Belirteçleri	32
3.1.6. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler	33
3.1.7. Kullanılan Kitler	34
3.1.8. Cihazlar	35
3.1.9. Kullanılan Kimyasallar	35
3.2. Yöntem	35
3.2.1. Adaptör Primerlerin Dizaynı ve sgRNA İfade Kasetlerinin pYLCRISPR/CAS9 Vektörüne Klonlanması ve <i>Agrobacterium</i> 'a Aktarılması	35
3.2.1.1 Adaptör Primerlerin Dizaynı (U3-U6) ve sgRNA İfade Kasetlerinin pYLCRISPR Vektörüne Klonlanması	36
3.2.1.2. <i>E. coli</i> 'den Plazmit İzolasyonu	36
3.2.1.3. sgRNA İfade Kasetlerinin pYLCRISPR Vektörüne Klonlanması	37
3.2.1.4. pYLCRISPR Vektörünün <i>E. coli</i> DH5α Hücrelerine Transformasyonu	42
3.2.1.5. <i>Agrobacterium</i> EHA105 Hücrelerine Transformasyonu	43

3.2.2. Bakteriyel Nitroredüktaz Geni Aktarılmış Transgenik Tütün Bitkilerinin Eldesi ve Transformasyonu	44
3.2.3. Transgenik Mutant Adayı Tütün Bitkilerinin Moleküler Analizi	46
4. SONUÇLAR	48
4.1. <i>E. coli</i> 'den Plazmit İzolasyonu	48
4.2. SgRNA İfade Kasetlerinin pYLCRISPR Vektörüne Klonlanması	48
4.3. pYLCRISPR Vektörünün <i>E. coli</i> DH5 α Hücrelerine Transformasyonu	50
4.4. <i>Agrobacterium</i> EHA105 Hücrelerine Transformasyonu	51
4.5. Bakteriyel Nitroredüktaz Geni Aktarılmış Transgenik Tütün Bitkilerinin Rekombinant <i>Agrobacterium</i> ile Transformasyonu	52
4.6 Transgenik Mutant Adayı Tütün Bitkilerinin Moleküler Analizi	54
5. TARTIŞMA	56
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	78

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kisaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
μg	: Mikrogram
μM	: Mikromolar
μl	: Mikrolitre
%	: Yüzde
$^{\circ}C$	: Santigrat derece
2,4,6 TNT	: 2,4,6-Trinitrotoluen
ABA	: Absisik Asit
BAP	: Benzil amino pürin
BSA	: Sodyum bikinkoninik asit
BCA	: Bovin serum albumin
Cm	: Santimetre
CRISPR/Cas9	: Düzenli aralıklarla tekrarlanmış kısa palandromik tekrarlar
crRNA	: CRISPR RNA
CysP	: Sistein proteaz
DSB	: Çift zincir DNA kırıkları
DTT	: Ditiyotreitol
DMSO	: Dimetil sülfoksit
dH ₂ O	: Distile su
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
ERSID	: ER stresine bağlı programlanmış hücre ölümü
ET	: Etilen
EtOH	: Etil alkol
FAD	: Flavın adenin dinükleotid
FMN	: Flavın mononükleotid
HCl	: Hidroklorik asit
HGM-CSF	: İnsan granülosit-makrofaj uyarıcı faktör
hGH	: İnsan büyüme hormonu
HR	: Homolog rekombinasyon

GA	:	Gibberelik asit
GTN	:	Gliserol trinitrat
ihpRNA	:	İntron içeren kendiliğinden tamamlayıcı firkete RNA
JA	:	Jasmonik asit
LB	:	Luria-bertani broth
M	:	Molar
NAD(P)H	:	Nikotinamid adenin dinükleotid
NTR	:	Nitroredüktaz
NHEJ	:	Homolog olmayan uçların birleşimi
mM	:	Milimolar
mg	:	Miligram
mL	:	Mililitre
MS	:	Murashige ve skoog
nm	:	Nanometre
NaOH	:	Sodyum hidroksit
NaCl	:	Sodyum klorür
Nm	:	Nanometre
NtCP	:	Nicotiana tabacum sistein proteaz
PCD	:	Programlanmış hücre ölümü
PCR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
PEG	:	Polietilen glikol
PLCP	:	Papain benzeri sistein proteaz
PTGS	:	Transkripsiyon sonrası gen susturma
PVP	:	Polivinilpolipirrolidon
PAGE	:	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
Rpm	:	Dakika başına dönüş
SA	:	Salisik asit
SDS	:	Sodyum dodesilsülfat salt
SOB	:	Süperoptimal brot
TALENs	:	TAL efektör nükleazları
TEMED	:	Tetrametiletildiamin
tracrRNA	:	Trans-aktive edici CRISPR RNA

UV	:	Ultraviyole
US-EPA	:	Amerika Birleşik Devletleri Çevresel Koruma Ajansı
ZFNs	:	Çinko parmak nükleazları
	:	
	:	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Bakterilerde polinitro aromatik bileşiklerin indirgenme yolları.	6
2.2: Nitroredüktaz ile TNT'nin muhtemel indirgenme yolları.	7
2.3: Proteazların isimlendirilmesi.	16
2.4: Proteazların dört ana katalitik sınıfının kesme mekanizmaları.	16
2.5: DNA onarım mekanizması.	26
3.1: pYLsgRNA-AtU3d/LacZ kaset plazmitinin fiziksel haritası.	30
3.2: pYLsgRNA-AtU6-1 kaset plazmitinin fiziksel haritası.	31
3.3: pYLsgRNA/Cas9Pkaset plazmitinin fiziksel haritası.	31
3.4: Kullanılan belirteçler.	33
3.5: sgRNA ekspresyon kasetlerinin hazırlanma stratejisi	38
3.6: Golden gate klonlama.	42
4.1: İzole edilen plazmitlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü.	48
4.2: Nested PCR Sonucu.	49
4.3: Ekspresyon kasetleri koloni PCR primer haritası.	50
4.4: <i>E. coli</i> DH5α transformantlarının koloni PCR sonucu.	51
4.5: <i>Agrobacterium EHA105</i> transformantlarının koloni PCR sonucu.	52
4.6: Transgenik tütün yaprak disklerinin transformasyon sonrası <i>in vitro</i> koşullarda 4 hafta kültürlenmesi sonucunda oluşan rejenerasyon.	52
4.7: Transgenik tütün mikro gövdelerinin <i>in vitro</i> koşullarda 60 gün kültürü sonrası elde edilen proliferasyon.	53
4.8: gDNA İzolasyonu.	54
4.9: PCR Sonucu.	55

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa</u>
3.1: Tez çalışmasında kullanılan plazmitler.	30
3.2: Kullanılan antibiyotikler.	32
3.3: Kullanılan besiyerleri ve içerikleri.	33
3.4: Kullanılan çözeltiler ve içerikleri.	34
3.5: <i>NtCP6</i> geni için tasarlanan adaptör primer seti	36
3.6: sgRNA ifade kasetlerinin pYLCRISPR vektörüne klonlanmasında kullanılan primer setleri.	40
4.1: Trangenik tütün mikro gövdelerinin <i>in vitro</i> koşullarda 60 gün kültürü sonrası elde edilen proliferasyon.	54

1. GİRİŞ

Son yıllarda bitkiler, artan oranda rekombinant proteinlerin üretimi için alternatif konakçılar olarak kullanılmaktadırlar. Bitkilerin post-translasyonel modifikasyonları gerçekleştirme kabiliyetlerine sahip olmaları özellikle ökaryotik proteinlerin aktif olarak üretiminde bitkilere birçok avantaj sağlamaktadır. Translasyon sonrası bu modifikasyonlar kompleks proteinlerin doğru şekilde katlanması, multimerik proteinlerin oluşumu ve bazı proteinlerin aktivitelerinde ve kararlılığında rol oynayan glikosilasyonlu kompleks glikoproteinlerin üretilmesine olanak sağlamaktadır. Bununla birlikte bitki sistemleri hayvan kaynaklı patojenler tarafından kontaminasyon riskini düşürmekte ve fermentör temelli sistemler tarafından üretilemeyen değerli farmosötik proteinlerin üretimi için platform sağlamaktadır. Diğer bir avantajı ise mikrobiyal ve memeli hücre kültürü sistemleri ile karşılaştırıldığında; daha düşük sermaye yatırımı ve işlem maliyeti gerektirdiğinden, bitkiler tarafından büyük ölçekli protein üretiminin tasarruflu olmasını sağlamasıdır.

Yaşayan organizmalar için birçok nitroaromatik bileşiğin toksik ve mutajenik olmasından dolayı nitroaromatik bileşikler canlılar için oldukça tehlike arz etmektedir. Nitroredüktazlar, oksidoredüktaz sınıfı enzimler olup prostetik grup olan flavin mononükleotid (FMN) veya flavin adenin dinükleotid (FAD), indirgeyici güç olarak nikotinamid adenin dinükleotid (NAD(P)H) kullanarak nitro gruplu bileşiklerin indirgenme reaksiyonunu katalizleyen enzimlerdir [Bryant et al., 1981; Kobori et al., 2001]. Nitroredüktazların en önemli kullanım alanlarından biri de kirliliğe neden olan nitroaromatik bileşiklerin biyodegradasyon ve dolayısıyla toprak kirliliklerinin biyolojik olarak giderilmesinde kullanılmasıdır. Nitroaromatik bileşenler farmasötikler, pestisitler ve patlayıcılar olarak yaygın şekilde kullanılmakta ve çevre kirleticilerinin önemli bir grubunu oluşturmaktadır [Nivinskas et al., 2000]. Bunlar arasında patlayıcılar, özellikle askeri atış alanlarında, eski savaş alanlarında, endüstriyel amaçlı kullanıldıkları yerlerde bulunarak, çevreyi kirletmektedirler [Rylott and Bruce, 2008]. Kirleticili nitroaromatiklerin biyoremediasyonunda potansiyel çözümlerden biri, belli bileşenleri özgün olarak degrade etmek üzere tasarlanmış transgenik bitkilerin uygulanmasıdır. Bakteriyel genleri eksprese eden bitkilerin fitoremediasyon kapasitesi, yaban tipi bitkilerden daha yüksektir. Çünkü transgenik hatlar, nitroaromatiklerin toksik etkilerine karşı daha dirençlidirler, daha yüksek miktarda patlayıcıyı bünyelerine alabilir ve daha etkin şekilde degrade edebilirler

[Panz and Miksch, 2012]. Rekombinant proteinlerin bitkiler dâhil tüm heterolog sistemlerde ekonomik olarak üretilmesinde proteaz aktivitesi önemli bir engel oluşturmaktadır. Rekombinant protein üretiminin iyileştirilmesi ve ekonomik olarak üretilmesine olanak sağlayabilmek adına proteaz aktivitesinin susturulabileceği düşünülmektedir.

1.1. Tezin Amacı, Literatüre Katkısı ve İçeriği

Biyodegradasyon özelliğini taşıyan transgenik bitkilerin geliştirilmesi çevre temizliği açısından sosyoekonomik bir önem taşımaktadır. Bunun yanısıra büyük ölçekli protein üretiminde transgenik bitkilerin kullanılması düşük sermaye yatırımı ve iş maliyetine sahip olması nedeniyle çalışma ekonomik olarak önem taşımaktadır.

Bölümümüz öğretim üyesi Prof. Dr. Yelda Özden Çiftçi ve grubunun yürüttüğü TUBİTAK tarafından desteklenmiş 214Z157 No'lu 'Kirletici nitroaromatiklerin düşük sıcaklıklarda *in vitro* fitoremediasyonu: Bakteriyal nitroredüktazın (*Ssap-NtrB*) tütünde heterolog ekspresyonu ve biyobozunum uygulamalarının araştırılması' başlıklı proje 2016 yılında tamamlanmıştır. Proje kapsamında, *Staphylococcus saprophyticus* bakterisinden izole edilmiş olan nitroredüktaz geni (*Ssap-NtrB*) tütün bitkisine *Agrobacterium* aracılığı ile başarılı bir şekilde aktarılmış ve genin transkripsiyonel seviyede eksprese olduğu gösterilmiştir. Söz konusu projede T2-TR3-4 tütün bitkisinden izole edilen total protein ile gerçekleştirilen nitroredüktaz aktivitesi deneyinde, DNT substratında azalma tespit edilmemiştir. Ayrıca, gerçekleştirilen SDS-PAGE analizinde, T2-TR3-4 bitkisine ait total proteinde olası *Ssap-NtrB* enzimi gözlemlenememiştir. Normal (22°C) ve düşük (15°C) sıcaklıkta DNT uygulamasından sonra yapılan HPLC analizlerinde, substrat miktarının azalması açısından, TR3-4 ve yaban tipi bitkileri arasında anlamlı fark görülmemiştir. Ancak normal (22°C) ve düşük (4, 15°C) sıcaklıklarda toksik seviyede DNT uygulamasını takiben yapılan yaş ağırlık analizlerinde, TR3-4 bitkisinin DNT etkisi altında yaş ağırlık yüzde artışın sıcaklık düştükçe yaban tipine göre daha fazla olduğu görülmüştür ve bunun 4°C uygulamasında 2 kattan fazla olduğu belirlenmiştir. Bu durum, aktarılan nitroredüktazın soğukta aktif olduğu düşünüldüğünde, enzimin çok düşük miktarda da olsa üretildiğini göstermiştir.

Düşük üretimin sebeplerinin en başında proteazlar tarafından yabancı olarak algılanan rekombinant proteinlerin yıkımı gelmektedir.

Tez kapsamında rekombinant protein üretiminin iyileştirilmesi ve ekonomik olarak üretilmesine olanak sağlayabilmek adına öncelikle proteaz aktivitesinin susturulması amaçlanmıştır. Bu bağlamda transgenik tütünde nitroredüktaz proteinin birikimine engel olduğu düşünülen *NtCP6* geni (GeneID:[107781604](#)) güncel gen düzeltme tekniklerinden CRISPR/Cas9 yöntemi kullanılarak susturulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bitkilerde Rekombinant Protein Üretimi

Son yıllarda klinik olarak faydalı rekombinant proteinlerin üretimi için, memeli proteinlerine özgü karmaşık posttranslasyonel modifikasyonlar yapmada yetkin ökaryotik konakçıları içeren bir dizi heterolog ekspresyon sistemi tasarlanmıştır [Dyck et al., 2003; Ma et al., 2003; Gerngross, 2004; Wurm, 2004]. Translasyon sonrası bu modifikasyonlar kompleks proteinlerin doğru şekilde katlanması, multimerik proteinlerin oluşumu ve bazı proteinlerin aktivitelerinde ve kararlılığında rol oynayan glikosilasyonlu kompleks glikoproteinlerin üretilmesine olanak sağlamaktadır. Özellikle bitki bazlı ekspresyon sistemleri geleneksel ifade sunucularına göre maliyet verimliliği, ürün güvenliği, kültür ve depolama olanakları, üretim ihtiyaçlarına kolayca uyarlanabilirlik ve ölçeklenebilirlik açısından benzersiz avantajlar sunmaktadır. Bu nedenle bitkiler, farmasötik açıdan önemli ve ticari olarak değerli proteinlerin ve endüstriyel proteinlerin üretimi için fotosentetik fabrikalar olarak büyük bir potansiyele sahiptir [Malabadi et al., 2016]. Bugüne kadar, çeşitli antikorlar, aşı antijenleri, protein alerjenleri, enzimler ve enzim inhibitörleri, pıhtılaşma faktörleri, sitokinler ve hormonlar dahil olmak üzere çeşitli proteinler bitkilerde başarıyla ifade edilmiştir [Ma et al., 1995, 2003, 2005a; Ruggiero et al., 2000; Kirk and Webb, 2005; Twyman et al., 2005; Lienard et al., 2007].

Şimdiye kadar yonca, mısır gevrekleri (pirinç ve mısır), baklagiller (soya fasulyesi) , meyve ve sebzeler (havuç, domates, patates) gibi çok çeşitli bitki türleri rekombinant protein üretimi için kullanılmıştır [Ma et al., 2003]. Ancak bu bitkilerin temel gıda maddesi olarak kullanılması rekombinant üretimi için dezavantaj sağlamaktadır. Gıda olarak kullanılmayan tütün (*Nicotiana tabacum*) bitkisi rekombinant protein üretiminde kullanılan aday bitkilerden biridir. Tütün, yılda 3-4 kez toplanabilmesi ve üretken tohum oluşturma kabiliyetine sahip olmasıyla her bir yaprağı yüksek protein verimi sağlamaktadır [Conley et al., 2011]. Ayrıca, yabancı genin transferi ve ifadesi için tütünün moleküler ve genetik yapısı iyi bilinmektedir. Rekombinant olarak üretilen ilk farmasötik protein olan insan büyüme hormonu (hGH) tütün yapraklarında ifade edilmiştir [Barta et al., 1986]. O zamandan beri, monoklonal antikorlar, rekombinant alt birim aşılar ve sitokinler gibi birçok

rekombinant protein de tütün bitkisinde başarıyla üretilmiştir [Stoger et al., 2014; Kolotilin et al., 2014; Fischer et al., 2012].

2.1.2. *Nicotiana Tabacum*

Solanaceae familyasına ait çok yıllık otsu bir bitki olan tütün (*N. tabacum*) , Güney Amerika kökenli olup 1-2 metre yüksekliğe kadar büyüeyebilen, dünya çapında yaygın olarak yetiştirilen gıda dışı ürünlerden biridir [Moon et al., 2009]. Amerika'dan Avrupa'ya bu bitki türlerini ithal eden ilk kişi olan Jean Nicot de Villemain'in adını alan *Nicotiana* cinsine aittir. Yaklaşık 200.000 yıl önce *Nicotiana sylvestris* ve *Nicotiana tomentosiformis* atalarının spesifik hibridizasyonu yoluyla gelişmiştir. Tütün en kapsamlı çalışılan çiçekli bitki türlerinden biridir [Sierro et al., 2014].

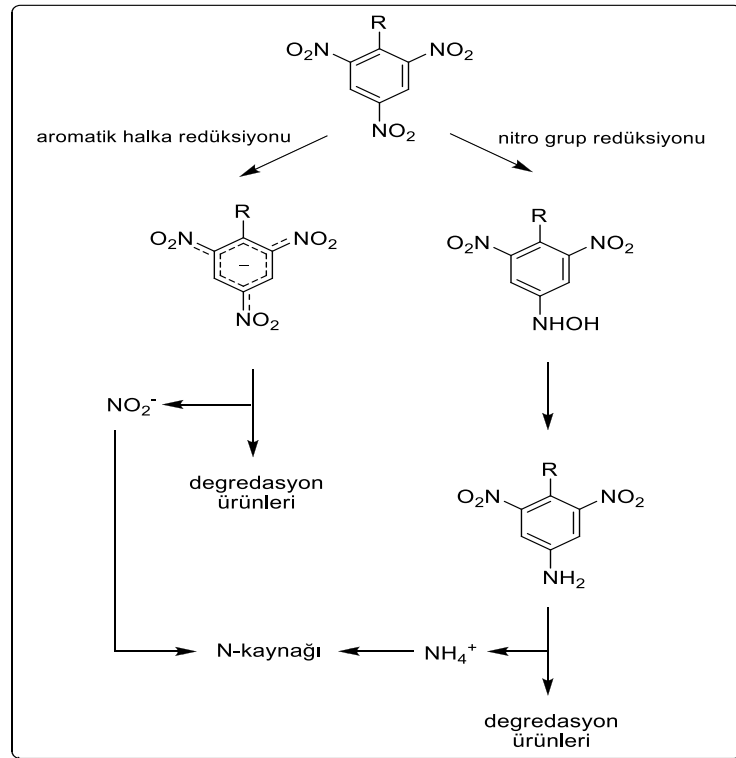
2.2. Kirletici Nitroaromatikler

Nitroaromatik bileşikler endüstriyel kimyasallar içerisinde yer alan en önemli gruplardan biridir. Aromatik bileşikler çoklu nitro grubu içermekte ve elektrofiller ile reaksiyona girdiğinde kararlı Meisenheimer komplekslerini oluşturabilmektedir. Bu nedenle bahsi geçen kimyasalların degradasyonu zorlaşmaktadır. Geçmişten günümüze kadar geçen süre zarfında nitroaromatik bileşiklerin biyodegradasyonu [Nishino et al., 2000; Nishino and Spain, 2004; Spain, 1995b, 1995a; Symons and Bruce 2006; Xu et al., 2019] nitroaromatiklerin toksisitesi ve mutajenitesini [Padda et al., 2003; Purohit and Basu, 2000; Sunahara, 2009; Ding et al., 2016] konu alan çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

Nitropiyoluteorin, kloramfenikol, fidolopin ve oksipayrolnitrin gibi sadece birkaç nitroaromatik bileşik doğal olarak oluşmaktadır. Astragalus gibi bazı bitkiler de nitroglikozidi savunma mekanizması olarak sentezlerler. Bunun yanı sıra poliüretan, pestisid [örneğin parathion (diethyl-p-nitrophenylmonothiophosphate), dinoseb (2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol), ve çeşitli patlayıcıların (2,4,6-trinitrotoluen (TNT), pikrik asit 2,4,6-trinitrofenol, vb.) eldesinde olduğu gibi çoğu endüstriyel alanda da nitroaromatik bileşikler üretilmektedir. İlaçların, solventlerin, plastiklerin ve boyaların sentezinde mono ve di-nitrofenoller oluşmaktadır [Spain, 1995a; Peres and Agathos, 2000]. Ayrıca aşırı askeri faaliyet sonucunda ve üretim, yükleme, taşıma, boşaltma ve kullanım işlemleri süresince de nitroaromatik bileşikler çevreye yayılmaktadır.

Çevreye yayılan birçok nitroaromatik bileşik yaşayan organizmalar için toksik ve mutajeniktir dolayısıyla canlılar için oldukça tehlike arz etmektedir.

Polinitrat aromatik bileşiklerin indirgenmesinde başlıca iki yol izlenir (Şekil 2.1); ilki hidrür transferaz veya OYE (old yellow enzyme, eski sarı enzim) ailesinden bazı enzimler tarafından katalizlenen reaksiyondur. Bu reaksiyon süresince iki hidrür iyonu ilavesiyle aromatik halkanın indirgenmesi sonucu dihidrür-Mesenheimer kompleksi oluşur. Nitroredüktaz aktivitesine sahip farklı enzimler tarafından katalizlenen diğer başlıca yol ise ardarda elektron ilavesiyle nitro gruplarının indirgenmesi reaksiyonudur. Her iki durumda da nitrit veya amonyum inorganik azot kaynağı olarak salınabilir ve bakteriyal büyüme için kullanılabilir. Uluslararası başlıca endişelerden biri çok fazla kalıcı patlayıcı artıklarla toprağın geniş ölçekli kontaminasyonu ve bunlarla yeraltı sularının birleşmesidir. Örneğin, dünya genelinde 2,4,6-Trinitrotoluen (TNT) ile çokça yer kirletilmiştir [Lewis et al., 2004; Rieger, 2002]. Bu nedenle patlayıcı kontaminasyonuna karşı etkili temizleme teknolojilerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

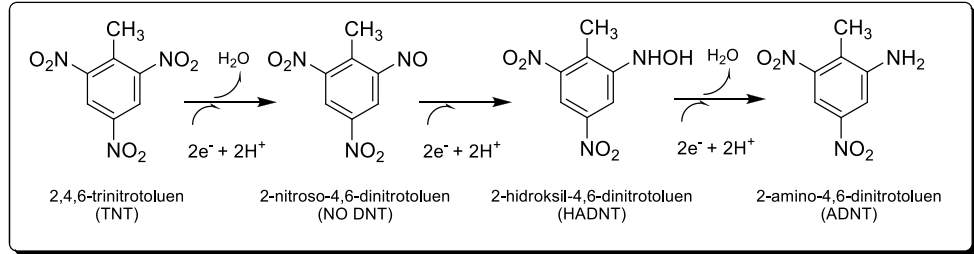


Şekil 2.1: Bakterilerde polinitroaromatik bileşiklerin indirgenme yolları.

2.3. Nitroredüktazlar

Oksidoredüktaz sınıfı enzimlerden olan nitroredüktazlar prostetik grup olarak flavin mononükleotid (FMN) veya flavin adenin dinükleotid (FAD), nikotinamid adenin dinükleotid (NAD(P)H)i ise indirgeyici güç olarak kullanarak nitro gruplu bileşiklerin indirgenme reaksiyonunu katalizler [Bryant et al., 1981; Kobori et al., 2001]. FMN bağlı nitroredüktazlar (NTR), *Escherichia coli* NTR, *Enterobacter cloacae* NTR, *Salmonella typhimurium* NTR ve *Vibrio fischeri* flavin oksidoredüktazı ve *S. saprophyticus* Ssap-NtrB'yi içine alan yapısal olarak homolog enzimler grubudur [Anlezark et al., 1992; Bryant and DeLuca, 1991; Çelik ve Yetiş, 2012; Watanabe et al., 1998; Zenno et al., 1994].

Nitroredüktaz enzimi geniş çeşitlilikte nitro grubu taşıyan bileşiklerin indirgenmesi reaksiyonunu katalizler [McCalla et al., 1978; Whiteway et al., 1998)](Şekil 2.2). Nitroredüktazlar geniş bir kullanım alanına sahiptir. Ticari değeri yüksek kimyasalların sentezinde, kanser terapilerinde ve kirliliğe neden olan nitroaromatik bileşiklerin biyodegradasyonunda kullanılır. Dolayısıyla nitroredüktazlar toprak kirliliklerinin biyolojik olarak giderilmesinde önemli bir rol alır.



Şekil 2.2 : Nitroredüktaz ile TNT'nin muhtemel indirgenme yolları.

2.4. Kirlletici Nitroaromatiklerin Fitoremediasyonu ve Transgenik Bitkilerin Kullanımı

Patlayıcıların çevresel kalımlılıkları ve biyodegradasyona olan düşük seviyedeki duyarlılıkları ve canlı organizmalara olan olumsuz etkisi, kontamine olmuş toprakların remediasyonunu zorunlu hale getirmektedir [Sens et al., 1999; Pennington and Brannon, 2002]. Kullanılan güncel yöntemler genelde pahalı, etkinliği düşük ve zaman alan yaklaşımlardır. Yakma gibi fiziksel yöntemler enerji gereksinimi duymasının yanı

sıra, NO_x emisyonu gibi yeni çevresel sorunlara da yol açmaktadır. Adsorpsiyon gibi kimyasal süreçler genelde pahalı olup, bileşenlerin yıkımından ziyade sadece ayrışmasını sağlamaktadır. Bununla birlikte kimyasal redüksiyon ve ileri oksidasyon süreçleri gibi iyileştirme yöntemleri sonucunda oluşan ürünler inatçı ve toksik reaksiyonlara yol açabilmektedir. Ayrıca fiziksel ve kimyasal yöntemlerin en kritik dezavantajı sadece *ex situ* (alan dışında) uygulanabilir olmalarıdır [Rodgers and Bunce, 2001].

Son zamanlarda en popüler teknolojilerden olan mikroorganizmaların ve/veya bitkilerin potansiyel olarak çevreyi temizleme yeteneklerinden faydalanan biyoremediasyon gibi biyoteknolojik yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler görece daha ucuz, çevre dostu ve toplum tarafından oldukça kabul gören çözümlerdir. Zararlı maddelerle kirlenmiş bölgelerde biyoremediasyon yönteminin uygulanması, geleneksel yöntemlere göre 10 kat daha ucuz bulunduğu için ABD Çevre Koruma Kurumunun (EPA) programına göre kullanımı uygun görülmüştür. Doğal bir yöntem olması toplum tarafından diğer teknolojilere göre daha kabul edilebilir olmasını sağlamaktadır. Bunun yanı sıra diğer remediasyon tekniklerinde olduğu gibi kirleticisi bir fazdan diğerine dönüşmediği için daha kalıcı bir çözüm yöntemidir.

Çevredeki kirleticilerin alınmasında ya da onların zararsız hale getirilmesinde yeşil bitkilerin kullanımı olarak tanımlanan [Raskin et al., 1997] fitoremediasyon da bir *in situ* biyoremediasyon yöntemidir. Bitkiler organik kirleticileri bozabilir, parçalayabilir ya da metallerde olduğu gibi bünyesine alarak stabilize edebilir [EPA, 1995]. Fitoremediasyon uygulanan toprağın yapısı değişmeden biyolojik özellikleri ve fiziksel yapısı korunduğu için sonrasında doğrudan tarımsal amaçlar için kullanılabilir.

Fitoremediasyon amacı ile geliştirilen ilk transgenik bitki çalışmasında metal toleransı hedeflenmiştir. Ancak daha sonra bu strateji, patlayıcı ve halojenli bileşenler gibi organik kirleticilerin bitkiler tarafından metabolize edilmelerini artırmak üzere geliştirilmiştir [Doty et al., 2000]. Nitroaromatikler grubundan 2,4,6-trinitrotoluen (TNT) ile heterosiklik nitramin olan heksahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX) ve oktahidro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazosinin (HMX) çevrede en sık bulunan patlayıcılardır. Bugüne kadar TNT'nin toprakta tespit edilen en yüksek konsantrasyonları 4000-10000 mg/kg arasında olmakla beraber bazı ekstrem durumlarda bu değer 87000 mg/kg olduğu da tespit edilmiştir [Clark and Boopathy, 2007; Vila et al., 2008]. RDX ve HMX maddeleri ise genel olarak sırasıyla 800-1900 mg/kg ve 600-900 mg/kg konsantrasyonlarında bulunsun da bu maddelerin toprakta

tespit edilen en yüksek konsantrasyonları sırası ile 74000 mg/kg ve 5700 mg/kg'dır [Clark and Boopathy, 2007].

Patlayıcı ile kontamine topraktan izole edilmiş *Enterobacter cloacae* kökenli bakteriyel enzimi kodlayan pentaeritritoltetranitrat (PETN) redüktaz geninin aktarımı ile modifiye edilmiş tütün (*Nicotiana tabacum*), organik bileşen biyoremediasyonu amacına yönelik tasarlanan ilk bitkidir [French et al., 1999]. Bu enzim nitrat esterleri ve nitroaromatik patlayıcıların degradasyonunda rol alan bir flavonitroredüktazdır. Transgenik tütün tohumları, yaban tipi bitkilerin inhibe olduğu 0,05 mM TNT içeren solüsyonda çimlenmiş ve büyüebilmişlerdir. Ayrıca aynı transgenik bitkilerin, yaban tipi bitkileri inhibe eden 1 mM konsantrasyonda GTN (gliserol trinitrat) içeren ortamda da çimlenip büyüebildikleri gösterilmiştir. Bir diğer çalışmada ise *E. cloacae* kökenli NfsI nitroredüktazı eksprese eden transgenik tütünün geleneksel bitkiler için letal konsantrasyonda (0,5 mM =113 mg/L) TNT'yi tolere ettiğini gösterilmiştir [Hannink et al., 2007]. Hannink ve arkadaşları (2007) aynı transgenik bitkileri kullanarak, TNT dönüşüm ürünlerinin (4-hidroksiloamino-2,6-dinitrotoluen) yaban tipi ile karşılaştırıldığında bitki makromoleküllerine bağlanmasının daha yüksek olduğunu göstermiştir [Hannink et al., 2007]. Travis ve ekibi yapmış oldukları çalışmada ise (2007) *E. cloacae* kökenli transgenik nitroredüktazı eksprese eden tütün bitkilerinin TNT ile kontamine toprağa yaban tipine göre daha toleranslı olduğunu bildirmiştir [Travis et al., 2007]. Transgenik bitkilerin büyüdüğü kontamine toprağın rizosferinde, yaban tipinin rizosferinden farklı olarak, kültüre edilebilir bakteri sayısının arttığını ve bunun yanı sıra mikrobiyal topluluktaki işlevsel ve genetik çeşitliliğin de arttığını tespit etmiştir. *E. coli* kökenli nitroredüktaz NfsA'nın aktarıldığı *Arabidopsis thaliana* transgenik bitkisi, yaban tipine göre 7-8 kat daha fazla TNT'yi bünyesine alabilmiştir. Bu transgenik bitkiler yaban tipinden farklı olarak TNT'nin doku-içi redüksiyonunu da sağlamıştır [Kurumata et al., 2005]. Ayrıca yapılan nitroredüktaz aktivite deneyi sonucunda yaban tipinde tespit edilebilir aktivite bulunamazken, transgenik hatlarda önemli ölçüde nitroredüktaz aktivite artışı belirlenmiştir. 2009 yılında *A. thaliana* ile yapılan bir başka transgenik çalışmasında *E. cloacae* kökenli *nfsI* geni aktarılmış olan bitki, solüsyonda 250 µM konsantrasyonda bulunan TNT'nin tamamını asimile edebilmiştir [Strand et al., 2009]. *Pseudomonas putida* kökenli nitroredüktaz *pnrA* genini eksprese eden bir titrek kavak hibrit türü, hidroponik kültürde 57 mg/L, toprakta 1000 mg/kg TNT'de büyüebilmiştir. Oysa bu

ortamlarda yaban tipi için inhibe edici konsantrasyonların sırasıyla 11 mg/L ve 500 mg/kg olduğu gösterilmiştir [van Dillewijn et al., 2008].

Yapılan bir diğer çalışma da bölümümüz öğretim üyesi Prof. Dr. Yelda Özden Çiftçi ve grubunun yürüttüğü , ‘Kirletici nitroaromatiklerin düşük sıcaklıklarda in vitro fitoremediasyonu: Bakteriyal nitroredüktazın (Ssap-NtrB) tütünde heterelog ekspresyonu ve biyobozunum uygulamalarının araştırılması’ başlıklı 2016 yılında tamamlanmış olan ve TUBİTAK tarafından desteklenmiş 214Z157 no’lu projedir. *Ssap-NtrB* geninin aktarıldığı transgenik tütün T2-TR3-4 bitkisinde transkribe olmasına rağmen, protein seviyesinde yüksek miktar tespit edilememiştir. Bu durumun sebeplerin başında proteazlar tarafından yabancı olarak algılanan nitroredüktazın yıkımı gelmektedir.

2.5. Bitkilerde Rekombinant Protein Üretimini Arttırma Yöntemleri

Rekombinant protein üretimi için başta tütün olmak üzere bitkiler ekonomik bir alternatif olarak ortaya çıkmasına rağmen, düşük rekombinant protein birikimi bitkilerin ticari bir protein üretim platformu olarak kullanımını sınırlamaktadır. Düşük üretimin sebeplerin en başında, proteazlar tarafından yabancı olarak algılanan rekombinant proteinlerin yıkımı gelmektedir. Plazminojen aktivatörleri [Schiermeyer et al., 2005], sitokinler [Sirko et al., 2011], insan serum albümini [Sun et al., 2011] ve monoklonal antikorlar [Stevens et al., 2000; Sharp and Doran, 2001; Muynck et al., 2009] gibi biyofarmöstatik proteinlerin bitki hücrelerinde üretildiklerinde farklı derecelerde proteolitik işleme tabi tutulduğu gösterilmiştir.

Bitki genomları yüzlerce proteolitik enzim kodlar [van der Horn, 2008] dolayısıyla belirli bir rekombinant proteinin bozulmasından sorumlu proteazları tanımlamak zordur. Bu nedenle bitkide hangi proteazların salgılandığı ve salgı yolu boyunca hücre bölmelerinde nerede bulunduğunu bilmek rekombinant proteinin stabilizasyonu için uygun stratejilerin geliştirilebilmesinde kritik öneme sahiptir. Tütünde, proteazların büyük bir kısmını aspartik ve sistein (papain benzeri sistein proteazlar) proteazlar oluşturmaktadır [Pillay et al., 2014]. Papain benzeri sistein proteazlar, proteoliz sırasında nükleofil olarak aktif bölgelerinde (yani Cys, His ve Asn) bulunan sisteini kullanmaktadırlar [Rawlings et al., 2010] ve bitkilerde, papain

benzeri sistein proteazların büyüme, tohum çimlenmesi, anter gelişimi, yaşlanma, bağışıklık ve stres yanıtlarında rol oynadığı bilinmektedir [Liu et al., 2018].

Gelişmiş bitki konakçı sistemlerinde rekombinant proteini degradasyonlara karşı korumak için bitki ekspresyon sistemlerindeki proteolitik aktiviteyi baskılayacak pek çok stratejiler geliştirilmiştir. Bitki süspansiyon hücre kültürlerine stabilizasyon ajanlarının eklenmesi, proteaz inhibitörlerinin ilgili protein ile birlikte ekspresyonu, rekombinant proteinleri apoplast veya vakuol içindeki bozunmadan korumak için rekombinant proteini bu hidrolitik hücresel bölmelerden ayıracak hedefleme teknikleri kullanma ve bitki proteazlarını kodlayan ilgili genin susturulması gibi stratejiler geliştirilmiştir [Manoj and Mandal, 2016].

2.5.1. Stabilize Edici Ajanların Eklenmesi

Bitkilerde rekombinant protein üretimini arttırmak için uygulanabilecek stratejilerden biri hücre süspansiyon kültürlerine protein stabilize edici ajanların eklenmesidir. Tütün bitkisinde rekombinant fare IgG1 antikorunun üretimi amaçlanan bir çalışmada tütün NT-1 hücre süspansiyon kültür ortamına stabilize edici ajan olarak jelatin ve polivinilpirolidon (PVP) eklenmiş ve böylece IgG1 antikorunun üretim düzeyinin dokuz kata kadar arttığı gözlenmiştir [Wongsamuth and Doran, 1997]. Benzer şekilde bir fare IgG1 antikoru eksprese eden transgenik tütün NT-1 hücrelerinin kültür ortamına PVP eklenmesiyle kültür ortamında antikor ağır zincir birikiminde 35 kat artışa bile yol açtığı gözlemlenmiştir [La Count et al., 1997].

Başka bir çalışmada ise transgenik tütün NT-1 hücrelerinin kültür ortamına sığır serum albümin ilave edilerek, hücre dışı insan GM-CSF birikiminde iki kat artış sağlanmıştır [James et al., 2000]. 2005 yılında yapılan bir çalışmada ise insan vasküler endotelial büyüme faktörünü eksprese eden transgenik yosun (*Physcomitrella patens*) hücrelerinin kültür ortamına insan serum albümininin eklenmesiyle rekombinant proteinin üretiminde üç kat artış olduğu bildirilmiştir [Baur et al., 2005]. Bir diğer çalışmada ise saçak kök kültür ortamına PVP eklendiğinde anti-vitronektin insan IgG1 λ mAb M12'nin birikme seviyesi iki kat artmıştır [Häkkinen et al., 2014]. Bahsi geçen stabilize ajanların proteolitik enzimler üzerinde engelleyici bir etki gösterip göstermediği henüz analiz edilmemiştir, ancak bu ajanlar proteini stabilize edebildiği için hücre dışı proteazlar için alternatif bir substrat olarak işlev görebilir.

2.5.2. Proteaz İnhibitörlerinin İfadesi

Bitki hücrelerinde rekombinant proteinlerin istenmeyen proteolizini azaltmak için proteaz inhibitörlerinin ilgili protein ile birlikte ekspresyonu gibi farklı stratejiler araştırılmıştır. Özellikle sistein, serin veya aspartik proteazlar için spesifik proteaz inhibitörleri bu amaçla kullanılmaktadır. İnsan α 1antichymotrypsin (α 1-ACT) içeren transgenik domateslerde katepsin D inhibitörünün (SlCDI) de ekspresyonunun, rekombinant proteini stabilize ettiği ve transgenik patates yapraklarında birikmesinde ise 2.5 kat artışa yol açtığı bildirilmiştir [Goulet et al., 2010b]. Akabinde gelen diğer çalışmada, SlCDI veya domates sistatin SlCYS9'un (I25 ailesi) geçici ekspresyonu, fare C5-1 IgG monoklonal antikorlu geni taşıyan transgenik *N. benthamiana*'daki protein üretiminde stabilizasyonu sağlama potansiyeli araştırılmıştır. Her iki inhibitörün fare C5-1 IgG monoklonal antikorla birlikte ekspresyonu, antikor hafif zincirinin daha fazla birikmesine yol açarken, sadece SlCDI'nın ekspresyonu antikor ağır zincirin daha yüksek üretimine neden olduğu bildirilmiştir [Goulet et al., 2012]. Bir diğer çalışmada ise domates sistatin ailesinin başka bir üyesi olan SlCYS8, *N. benthamiana*'daki C5-1 antikorlu ile birlikte geçici olarak ekspresyonu yapılmıştır. Tüm bitki ölçeğinde C5-1 antikorunun birikmesinin yaklaşık %40 arttığı rapor edilmiştir. Bununla birlikte SlCYS8 nin etkisinin bitkinin yaşına bağlı olduğu bildirilmiştir. Daha yaşlı yapraklarda, SlCYS8 seviyelerinin oldukça düşük olduğu ve bu yapraklarda papain benzeri sistein proteaz PLCP aktivitelerinde artış olduğu gözlemlenmiştir [Robert et al., 2013]. Pirinç sistein proteaz inhibitörü orizasittatin-I'in konstitütif ekspresyonu, transgenik olmayan kontrollere kıyasla model bütün bitkilerinde protein glutatyon redüktazın birikiminin artmasına ve daha yüksek aktivite sahip olmasına neden olmuştur [Pillay et al., 2012].

Nepenthes alata'dan elde edilen proteaz inhibitörü II (I20 ailesi) geninden tripsin ve kimotripsin inhibitör alanlarını içeren sentetik bir yapının, rekombinant insan granülostemasrofaj koloni uyarıcı faktör (hGM-CSF) ile birlikte ekspresyonu, pirinç süspansiyon kültürlerinde hGM-CSF salgısında iki kat artışa yol açmıştır [Kim et al., 2008b]. Soya fasulyesi Bowman-Birk serin proteaz inhibitörünün (I12 ailesi), transgenik bütün bitkilerinin köklerinden rekombinant insan tek zincirli IgG1 ile birlikte salgılanması antikor birikiminin 2 kat arttığı belirtilmiştir [Komarnytsky et al., 2006].

2.5.3 Subsellüler Hedefleme ve Füzyon Proteinleri

Rekombinant proteinleri apoplast veya vakuol içindeki bozunmadan korumak için, hedef proteini bu hidrolitik hücresel bölmelerden ayıracak hedefleme stratejileri geliştirilmiştir. Rekombinant proteinlerin ER veya ER türevi yapılarda tutulmasının özellikle yararlı olduğu kanıtlanmıştır [Conrad and Fiedler, 1998]. Bitki tohumlarında rekombinant proteinleri büyük miktarlarda depolamak için mısır tohumu depolama proteini olan γ -zein kullanarak bir füzyon protein stratejisi geliştirilmiştir.

Bitki kaynaklı veba aşısı geliştirme projesinin bir parçası olarak, füzyon Zera domaini olan ve olmayan model antijenler *Nicotiana benthamiana*, *Medicago sativa* (yonca) ve *Nicotiana tabacum* NT1 olmak üzere üç farklı bitki sisteminde ifade edildiğinde *Nicotiana tabacum* NT1 hücre kültüründe Zera-F1-V protein birikiminin tek başına F1-V'den 3 kat daha yüksek olduğu gösterilmiştir [Alvarez et al., 2010]. Geçici olarak transforme edilmiş *N. benthamiana* ve stabil transforme edilmiş yonca bitkilerinde benzer sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada ise rekombinant proteinlerin *Trichoderma reesei* kaynaklı hidrofofin I ile füzyonu, *N. tabacum* ve *N. benthamiana*'da protein cisimlerinin oluşumunu kolaylaştırdığı ve ürün verimini arttırdığı gözlemlenmiştir [Joensuu et al., 2010; Gutiérrez et al., 2013].

2.5.4. Gen Baskılama

Rekombinant proteinlerin proteolitik degradasyonunu azaltmak için bir başka umut verici strateji, proteaz kodlayan genlerin ekspresyonunu baskılamaktır. 2008 yılında Kim ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada sistein proteazın (CysP), şeker açlığı yoluyla indüksiyonun ardından pirinç hücre süspansiyon kültürlerinde majör olarak salgılanan bir proteaz olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada pirinç hücre süspansiyon kültürlerinde CysP ekspresyonunu baskılamak için intron içeren kendiliğinden tamamlayıcı firkete RNA (ihpRNA) kaynaklı transkripsiyon sonrası gen susturma (PTGS) uygulanmış ve toplam salgılanan proteaz ve CysP aktivitelerinin analizi sonucu, yaban tipinde gözlenenenden daha düşük aktivite olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, pirinç hücre süspansiyon kültürlerine hem insan granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (hGM-CSF) hem de CysP'nin ihpRNA'sını ifade eden gen transforme edilmiştir. Toplam proteaz ve CysP aktivitelerinde bir azalma ve hGM-CSF

üretiminde, sadece hGM-CSF eksprese eden bir pirinç hücre hattında gözlemlenenlere kıyasla bir 1.9 kat artış gösterdiği ortaya konmuştur. Bu sonuçlar, proteaz aktivitesini azaltmak ve pirinç hücre süspansiyon kültürlerinde hedef protein birikimini arttırmak için CysP'nin RNA etkileşimi yoluyla baskılanmasının uygulanabilirliğini göstermiştir [Kim *et al.*, 2008]. Biraz daha geniş bir proteaz susturma yaklaşımını, dört katalitik sınıftan (aspartik, sistein, metalo-ve serineproteazlar) proteazları kodlayan dört proteaz geninin (NtAP, NtCP, NtMMP1 ve NtSP) bütün BY-2 hücrelerinde karşılık gelen antisens dizilerinin ekspresyonu yoluyla eşzamanlı susturulması izlemiştir [Mandal *et al.*, 2014]. Bu çalışma antisens RNA ifade eden BY-2 hücrelerinin kültür ortamında, yaban tipi BY-2 hücrelerine göre toplam proteolitik aktivitenin daha düşük bir seviyelerde olduğunu göstermiştir. Bu transgenik BY-2 hücre dizisi, rekombinant IgG1κ antikor 2F5 üretmek için kullanıldığında, aynı antikor eksprese eden yaban tipi hücrelerle karşılaştırıldığında sağlam antikor ağır zincirinin dört kat daha fazla birikmesine neden olduğu gösterilmiştir. Sekansa özgü nükleazlara dayanan farklı gen hedefleme stratejilerinin geliştirilmesiyle, artık aktivitesini tamamen ortadan kaldırmak için herhangi bir proteaz genini bozmak mümkündür [Fichtner *et al.*, 2014].

Sistein proteazlarının rekombinant protein yıkımında rol aldığını gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. 2003 yılında Outchkourov ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, deniz anemonuna ait proteaz inhibitörü equistatin proteininin patates yumrularında eksprese edildiği ancak sistein proteazların rekombinant equistatinin fonksiyonel birikimini ciddi şekilde engellediği gösterilmiştir [Outchkourov *et al.*, 2003]. Duwadi ve arkadaşları tarafından yapılan diğer bir çalışmada (2015) fonksiyonel genomik yaklaşım kullanarak sistein proteazların bütün yapraklarında üretilen terapötik interleukin (IL) birikim seviyesine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, varsayılan 60 sistein proteaz geni (CysP) tanımlanmıştır. Yaprak dokusunda ifade olduğu belirlenen 10 aday CysP geni daha fazla karakterizasyon çalışması için seçilmiş ve seçilen CysP'ler RNAi tekniği kullanılarak susturulmuştur. Seçilen proteazlar arasından CysP6 (NtCP6)'nin (*Nicotiana tabacum* Cysteine Protease (NtCP)) susturulması sonucunda IL-10 birikim seviyesinin kontrole kıyasla 1.6 kat arttığı gözlemlenmiştir. Bu sonuç, CysP6'nın susturulmasının bütün transgenik bitki hatlarında IL-10 birikimini pozitif olarak etkilediğini göstermiştir. CysP6, endopeptidaz aktivitesinden sorumlu olan papain domaini, I29 olarak adlandırılan katepsin propeptit inhibitör domaini ve ilave olarak belirli proteazların

hedeflenmesinde ve aktivitelerinin düzenlenmesinde rol oynadığı bilinen granülün benzeri tekrarlarına sahiptir [Duwadi et al., 2015].

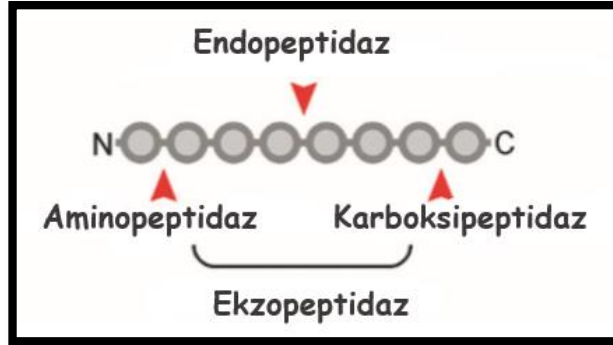
Yukarıda tartışılan stratejilere dayanarak rekombinant proteinlerin proteolitik degradasyonunu önlemek için kullanılabilecek tüm hedef proteinleri stabilize edebilen sihirli bir teknik olmadığı açıktır. Bununla birlikte, bu önemli sorunun üstesinden gelmek için yukarıda açıklanan araçlardan uygun prosedürlerin seçilmesi sağlanmalıdır. Bu tez kapsamında model organizma olan tütün bitkisinde rekombinant nitroredüktaz protein birikimini artırmak için; sistein proteazlarının rekombinant protein yıkımında önemli bir rol aldığını gösteren birçok çalışmaya dayanarak ve gen baskılama sisteminin diğer stratejilere kıyasla daha etkili ve daha güncel olduğu göz önünde bulundularak NtCP6 geni güncel gen düzeltme tekniklerinden CRISPR/Cas9 yönetimi kullanılarak susturulmuştur.

2.6. Bitki Papain Benzeri Sistein Proteazları

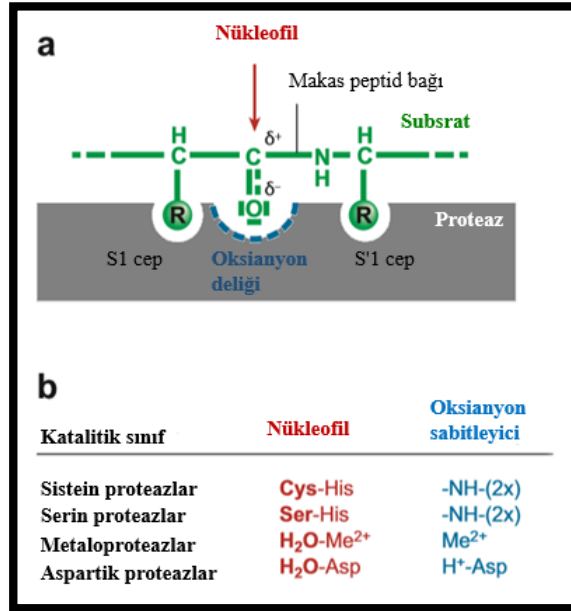
Diğer tüm organizmalarda olduğu gibi, bitkiler de fonksiyonel olmayan proteinleri amino asitlere indirmek için proteazlar kullanır. Ancak proteazlar bu temizlik fonksiyonundan daha fazlasına sahiptir. Proteazlar aynı zamanda kilit düzenleyicilerdir. Diğer proteinlerin kaderini geri dönüşümsüz bir şekilde belirleyerek, gelişimsel ve çevresel ipuçlarına yanıt olarak farklı süreçleri düzenlerler. Bu uygulama, spesifikliğı korur ve aktivitelerini hem zaman hem de mekanda sıkı bir şekilde düzenler [van der Horst, 2008]. Bitkilerde gerçekleşen proteoliz, çeşitli hücresel bölmelerde birçok enzimi ve çok yönlü proteolitik yolları içeren karmaşık bir süreçtir. Sistein proteazları da bu süreçte önemli bir rol oynamaktadır. Proteolizdeki toplam payları bitki türüne ve organına bağlı olarak değişmektedir. Sistein proteazları olgun organlarda toplam proteolitik aktivitenin % 30'unu oluştururlar. Bununla birlikte, sistein proteazları farklı iç ve dış uyaranlara önemli ölçüde yanıt verir ve bu durumlarda aktiviteleri toplam proteolitik aktivitenin % 90'ını içerir [Wiśniewski and Zagdańska, 2001].

Proteazlar, iç (endopeptidazlar), N-terminali (aminopeptidazlar) veya C-terminali (karboksipeptidazlar) olabilen peptit bağlarını keserler (Şekil 2.3). Tüm proteazlar, oksijeni bir oksianyon deliğinde stabilize ederek substrat peptit bağının karbonil grubunu polarize eder, bu da karbon atomunu aktif bir nükleofil tarafından saldırıya karşı daha savunmasız hale getirir (Şekil 2.4a). Proteazlar bunu dört ana yolla

yapabilir, bu da dört katalitik sınıfa isim verir: sistein proteazları, serin proteazları, metalo proteazları ve aspartik proteazlar (Şekil 2.4b).



Şekil 2.3: Proteazların isimlendirilmesi.



Şekil 2.4: Proteazların dört ana katalitik sınıfının kesme mekanizmaları.

Substrat proteini (yeşil), enzimin substrat (S) cepleriyle etkileşime girerek amino asit kalıntıları (R) yoluyla proteazın substrat bağlanma bölgesine (gri) bağlanır. Makas peptit bağı, oksianyon deliğini (mavi) stabilize ederek enzim tarafından polarize edilen bir karbonil grubuna bitişiktir; bu karbonil, karbonu nükleofilik saldırıya karşı savunmasız hale getirir (Şekil 4a). Katalitik sınıflar arasındaki en büyük farklar, nükleofil ve oksianyon stabilizatörünün yapısıdır. Sistein ve serin proteazlar, aktif bölgede histidin (His) tarafından aktive edilen nükleofil olarak bir Cys veya Ser

rezidüsü kullanır. Oksianyon deliği genellikle proteazın omurgasındaki iki rezidü tarafından stabilize edilir. Metaloproteazlar ve aspartik proteazlar suyu sırasıyla metal (Me^{2+}) veya aspartat (Asp) ile elektrostatik etkileşimlerle aktive edilen nükleofil olarak kullanırlar ve bu proteazların oksianyonu sırasıyla Me^{2+} ve Asp tarafından stabilize edilir (Şekil 4b).

Proteinlerin sınıflandırılmasını yapısal ve evrimsel ilişkiye dayandıran Rawlings & Barrett (1993), enzimleri aileler ve sınıflar halinde gruplandırmışlardır. Sınıf, evrimsel bir ilişki içinde olan bir grup aileden oluşur. Bu yazarlar tarafından önerilen sınıflandırma sürekli olarak güncellenmektedir (MEROPS peptidases veritabanı, <http://merops.sanger.ac.uk>). Sistein proteazları C ön eki ile etiketlenmiş ve en az altı süper aileye veya sınıfa gruplandırılmış 40'tan fazla peptidaz ailesini içermektedir. Bitki genomları, 5 sınıftan oluşan 15 aileye ait yaklaşık 140 sistein proteazı kodlamaktadır [Rawlings et al., 2006]. Farklı sınıflardan proteazların yapılarında farklılıklar bulunur, bu da yakınsak (convergent) evrimi ima eder. CA ve CE sınıflar papain benzeri bir kat içeren proteazlar içerirken, CD proteazlarının kaspaz benzeri bir katmanı vardır. Birçok sistein proteazı, hem gelişimsel ipuçlarına hem de patojenlere yanıt olarak programlanmış hücre ölümünde (PCD: programmed cell death) rol oynar. Diğer sistein proteazları, epidermal hücre kaderini, çiçeklenme zamanını, hastalık oluşumunu ve polen veya embriyo gelişimini düzenler [van der Horn, 2008].

Çoğu bitki sistein proteazları, papain (C1) ve legumain (C13) ailelerine aittir. Sistein proteazların üyelerinden olan kaspazlar (C14 ailesi) ve kalpana bağımlı proteazlar kalpainler (C2 ailesi) bitkilerde daha sonra bulunmuştur. Bitkilerde proteinlerin deubikitinasyonunu katalize edilmesinde rol alan proteazlar, ubikitin C-terminal hidrolazlar (C12 ailesi) ve ubikitine özgü proteazlar (C19)dır [Vierstra, 2003].

Bunlar arasında, aktif bölgede nükleofilik sistein tiyol (yani, Cys, His ve Asn), içeren papain benzeri sistein proteazları (PLCP: Papain-like cysteine proteases) sistein proteazlarının en bol gruplarından biridir [Rawlings et al., 2010]. Arabidopsis tarafından kodlanan C1A alt familyasında yaklaşık 30 papain benzeri proteaz vardır [Beers et al., 2004]. Bu C1A proteazları preproteazlar olarak üretilir. Oto inhibitör prodomain, katalitik bölge yarık üzerine geri katlanır ve proteazın [Taylor et al., 1995] aktivasyonu sırasında çıkarılır.

Sistein proteazlar (CysP) bakteri, mantar, virüs, bitki ve hayvanlara kadar değişen tüm organizmalarda bulunan proteinlerdir. Bitkilerde, CysP'ler çevresel stres

yanıtı, besinlerin yeniden stabilizasyonu ve hücrel temizlik konularında kilit rol oynarlar [Ueda et al., 2000]. Arabidopsis'te, CysP'lerin gelişim sırasında farklı dokularda çok yönlü rol oynadığı bilinmektedir [Lee et al., 2004; Gietl and Schmid, 2001]. Bununla birlikte, CysP'lerin tütündeki rolü hakkında çok fazla şey bilinmemektedir. Stres yanıtı [Linthorst et al., 1993], programlanmış hücre ölümü sırasında protein bozulması [Zhao et al., 2013], polen tane gelişimi [Zhang et al., 2009] ve yaşlanan yapraklarda aminoasitin yeniden stabilizasyonunda [Kantyka et al., 2001] yer alan az sayıda tütün CysP'leri karakterize edilmiştir.

Papain benzeri sistein proteazları da virüs [Rawlings et al., 1992], bakteriler [Kantyka et al., 2011], maya [Enenkel and Wolf, 1993], protozoa, bitkiler ve hayvanlar (Rawlings et al., 2010; Novinec and Lenarcic, 2013] dahil olmak üzere birçok organizmada bulunur. Bu enzimler, protein salgısı için bir sinyal peptidi ve istenmeyen protein bozulmasını önlemek için bir oto-inhibitör etki alanı ile aktif olmayan öncüler olarak üretilir [Coulombe et al., 1996]. Sırasıyla Arabidopsis, kauçuk, manyok, hint, kavak ve asmada tanımlanmış olan papain benzeri sistein proteaz genleri 31, 43, 40, 26, 40 ve 24 multigenik büyük bir familyaya aittir [Martinez and Diaz, 2008; Zou et al., 2017b]. Birçok proseste yer alan bitki PLCP'lerinin büyük çoğunluğu son yıllarda, karakterize edilmiştir. Bitki PLCP'lerinin büyüme, tohum çimlenmesi, anter gelişimi, yaşlanma, bağışıklık ve stres yanıtlarında yer aldığı gösterilmiştir [Liu et al., 2018].

2.6.1. Papain Benzeri Sistein Proteazların Rekombinant Protein Üretimi Üzerine Etkisi

Bitkilerde yapılan rekombinant proteinler sıklıkla hem ürün verimini hem de kaliteyi olumsuz etkileyen sınırlı proteolizden muzdariptir [Mandal et al., 20016]. Bitki tarafından üretilen proteinler sıklıkla hücreler arası boşluğa (apoplast) salgılanır ve orada protein parçalanmasını destekleyen proteaz açısından zengin bir ortamla karşılaşır [Hehle et al., 2011; Goulet et al., 2012]. Ayrıca, vakuolar proteazların salınması nedeniyle hasat sırasında rekombinant protein bozulması da görülebilir. Serin proteazların bu degradatif süreçlerde önemli bir rol oynadığı görülmekle birlikte [Mandal et al., 20016], mAb degradasyon fragmanlarının yakın zamandaki analizleri papain benzeri sistein proteazların da ilişkili olduğu konusunda kanıt sağlamıştır [Hehle et al., 2015]. Son yıllarda, PLCP aktivitesi ve fonksiyonu üzerine kapsamlı çalışmalar, bu enzimlerin *Arabidopsis Thaliana* model bitkisi üzerinde karakterize

edilmesine odaklanmış ve böylece bu proteaz ailesinin seçilmiş temsilcilerinin spesifik biyokimyasal özelliklerine ilk bakış açısı sağlamıştır [van der Hoorn et al., 2004; Lu et al., 2015]. Planta veya hasat sonrası ortamlarda rekombinant protein ekspresyonu sırasında proteolizin inhibisyonunda en iyi hedeflerin seçilmesi için yapılan çalışmalardan birinde *N. Benthamiana* PLCP'leri olan aleurain benzeri proteaz, katepsin B [Niemer et al., 2016] ve NbCP14 [Paireder et al., 2016]'nin enzimatik özellikleri hakkında ayrıntılı bilgiye ulaşılmıştır. Bu enzimlerin ikisi, *N. benthamiana* katepsin B (NbCathB) ve NbCP14, monoklonal antikorları parçalanmasında belirgin bir etki göstermektedir [Niemer et al., 2016; Paireder et al., 2016]. Bununla birlikte, *N. Tabacum*'da ek PLCP'ler tanımlanmıştır. Bunlardan CysP6 ve CysP7'nin seçici aşağı regülasyonu, bir rekombinant protein birikimi üzerinde yararlı etkilere sahiptir [Duwadi et al., 2015]. İlginç bir şekilde, bu iki enzimin ortologları diğer bitkilerin apoplastında da tespit edilmiştir [Horger et al., 2013]. *N. Benthamiana*'da, CysP6 ve CysP7'nin agrobakteri aracılı rekombinant protein üretimi üzerine yukarı regüle olduğu bulunmuştur [Pillay et al., 2016].

2.6.2. Papain Benzeri Sistein Proteazların Tohum Çimlenmesindeki Fonksiyonu

Bitkilerde yapısal, metabolik ve koruyucu proteinler tohumlarda depolanır. Çimlenme sırasında, bu tohum proteinleri büyüyen fideleri beslemek için düzenlenmektedir. Bu işlemlerde PLCP'ler de önemli görevler üstlenmektedir. Filizlenen mısır ve buğdayda, prolaminlerin toplam proteolitik aktivitesinin % 90'ını sistein proteazları oluşturur [Grudkowska and Zagdanska, 2004]. Yapılan çalışmalarda *Vicia sativa* tohum çimlenmesi sırasında, depolama proteinleri olan vicilin ve β -konglisinin (7S globülin) düzenlenmesinde dört PLCP (CPR1, CPR2, proteaz A ve CPR4)'nin rol alan [Fischer et al., 2000; Schlereth et al., 2000, 2001] ve arpa tanelerinin çimlenmesi sırasında etkin olan 27 PLCP tanımlanmıştır [Zhang and Jones, 1995]. Bunun yanı sıra iki PLCP (EP-A ve EP-B) de saflaştırılmıştır [Pouille and Jones, 1988]. Tohum çimlenmesi sırasında iki EP-B (EPB1 ve EPB2) izoformun ifadesi gibberellik asit (GA) ile indüklenerek ve absisik asit (ABA) tarafından represe edilerek düzenlenmektedir [Koehler and Ho, 1990; Mikkonen et al., 1996].

Tohum çimlenmesi sırasında bu proteazlar genç fideler için azotlu besinler sağlamak üzere kotiledon epitelleri ve aleurone tabakasından, depolama proteinlerini

parçalayan endosperme salgılanmaktadır [Mikkonen et al.,1996]. GA ile indüklenen bir PLCP olan HvPap-1'inin arpa tanesi çimlenmesi sırasında protein hareketlerinde temel fonksiyonları gerçekleştirdiği bildirilmiştir [Cambra et al., 2012]. HvPap-1, embriyodaki protein gövdelerine ve veziküllere lokalizedir ve arpa endosperm proteinleri olan hordeinler, albüminler ve globülinleri degrade edebilir. Bu sonuçlar PLCP'lerin, tohum çimlenmesini teşvik etmek için depolama proteinlerini harekete geçirmede önemli faktörler olduğunu ve bunların ekspresyon ve / veya aktivitelerinin GA, ABA ve sistatinler tarafından düzenlendiğini göstermektedir.

Arabidopsis PLCP genleri olan PAP2, PAP3 ve RD19A , farklı organlarda farklı ekspresyon gösterirken PAP4 ve PAP5 yaprakta yüksek ekspresyon gösterir. Araştırmalar farklı PLCP proteinlerinin farklı fonksiyonlarını ve lokalizasyonlarını vurgulamaktadır. Bunun yanı sıra RD21A, RD21B, RD19A gibi birçok PLCP'nin, çeşitli doku ve organlarda yüksek ekspresyon sergilemesi bitki büyümesi ve gelişmesinde düzenleyici rolü olduğunu gösterir [Richau et al., 2012].

Bitki tohumları ilk filizin büyümesi ve gelişmesi için besin maddelerini oluşturur. Bu süreci başlatan ve tamamlayan anahtar faktörlerden biri PLCP'lerdir [Szewinska et al., 2016]. Stres koşullarının tohum çimlenmesini olumsuz etkilediği ve hatta fideciklerin oluşamamasına neden olduğu iyi bilinmektedir. Bu nedenle stres koşulları altında, PLCP'lerin aktivitesinin ve düzenleyici faktörlerin de nasıl etkilendiği detaylı bir şekilde analiz edilmelidir.

2.6.3. Papain Benzeri Sistein Proteazların Programlanmış Hücre Ölümündeki Rolü

Bitkilerde programlanmış hücre ölümünün temel düzenleyicileri papain benzeri sistein proteazlarıdır. Yapılan çalışmalar Arabidopsis'te, trake element (TE), tapetum, süspansiyon ve ER stresine bağlı programlanmış hücre ölümünde çok sayıda PLCP'nin rol aldığını göstermiştir [Zhao et al., 2000; Cai et al., 2018]. Katepsinler, C1A sınıfında yer alan papain benzeri sistein proteazlarıdır ve yaprak yaşlanması ve PCD dahil olmak üzere çok sayıda bitki biyolojik sürecine katılan önemli düzenleyicilerdir. 2016 yılında yapılan bir çalışmada üç Arabidopsis katepsin B proteini (AtCathB13) tandem kütle spektrometrisi ile tanımlanmış ve üçlü mutantında abiyotik stres (örn. Ultraviyole, oksidatif stres) ve endoplazmik retikulum stresıyla indüklenen PCD'de güçlü bir azalma gösterdiği gözlenmiştir [Ge et al., 2016]. Daha

ileri araştırmalar, katepsin B'nin susturulmasının reaktif oksijen türleri (ROS) birikimini ve ER stresine bağlı programlanmış hücre ölümünü (ERSID) azalttığını, PBA1'in aşağı regülasyonunun ERSID'yi artırdığını, ERSID'in sırasıyla katepsin B ve PBA1 tarafından pozitif ve negatif olarak düzenlendiğini gösterdi [Cai et al., 2018]. Zhao ve ekibinin yürüttüğü çalışmada tütün PLCP proteini olan NtCP14' n yüksek katalitik aktivitesi, sadece PCD'nin başlangıcı ile ilişkili olan 8 ve 32 hücreli embriyo aşamalarındaki süspansiyon ile sınırlandırılmıştır. NtCP14' n aşırı ekspresyonu, bazal hücre hattı yaşında erken hücre ölümüne neden olduğu, embriyonik kitlenme ve tohum ölümüne yol açtığı bunu yanı sıra NtCP14' n susturulmasının ise süspansiyon PCD'sinde ciddi bir gecikmeye yol açtığı belirtilmiştir [Zhao et al., 2013]. Bu sonuçlar PLCP'lerin tohum, TE, tapetum, süspansiyon ve ERSID'de önemli düzenleyici olarak rol oynadığını göstermektedir.

2.6.4. Papain Benzeri Sistein Proteazların Yaprak Yaşlanma Sürecindeki Rolü

Yaprak yaşlanması, genç yaprakların ve üreme organlarının büyümesini desteklemek için endojen besinleri, yaşlanan yapraklardan geri dönüştüren fizyolojik bir süreçtir. Protein parçalanması, yaprak yaşlanması sırasında gerçekleşen en temel reaksiyonlardan biridir. Yaprak yaşlanması sırasında PLCP'ler protein proteolizinde önemli görevler üstlenirler [Bhalerao et al., 2003; Roberts et al., 2012; Diaz-Mendoza et al., 2014]. Arabidopsis'te, tanımlanan SAG12, RD21A, AtRD19A, RD19C, ALP / SAG2 / AALP / ALEU, CTB1 ve CTB3 dahil olmak üzere birçok PLCP  yesinin yaprak yaşlanması sürecinde yer aldığı belirlenmiştir [Gepstein et al., 2003; Guo and Cai, 2004; Guo and Gan, 2014]. Benzer işlevlere sahip çeşitli SAG12 ortolog genleri, pirinç, *B. napus*, tatlı patates ve tütün dahil olmak üzere çeşitli bitki türlerinde tanımlanmıştır [Chen et al., 2002; Beyene et al., 2006; Gombert et al., 2006; Liu , 2010]. 2010 yılında SAG39 sistein proteaz promotörü kesilen PSAG39-IPT transgenik pirinçlerde yapılan bir çalışmada, yapraklarda yaşlanmanın geciktiği ve daha fazla sayıda ortaya çıkan salkım fenotipi gözlenmiştir. Bu da Arabidopsis SAG12 homologu olarak işlev gösterdiğini düşündürmektedir [Liu , 2010]. Benzer şekilde, kauçuk ağacında (*Hevea brasiliensis*), HbSAG12H1 ile 17 Arabidopsis SAG12 ortologları (HbSAG12H1-17), yaşlanma ile ilişkili genlerle aynı ekspresyon modeli

göstermiştir bu da HbSAG12H1'in Hevea yaprak yaşlanma mekanizmasını incelemek için moleküler bir işaretçi olarak işlev görebileceğini gösterir. [Zou et al., 2017a].

Yaprak yaşlanması birçok maddenin proteolizini içeren son derece düzenlenmiş bir süreçtir. Bitkilerde yaşlılıkla ilişkili genler (SAG) tarafından kodlanan PLCP'lerin katalize edilen enzimatik reaksiyonlar, protein yıkımı için önemli bir yoldur. Günümüzde SAG12, işlevi birçok türde karakterize edilen en yoğun incelenen yaşlanma ile ilişkili PLCP'lerdir. Yaprak yaşlanmasına katılan SAG12 ve diğer PLCP'lere ek olarak çok daha fazla PLCP büyük ölçüde bilinmemektedir [Liu et al., 2018].

2.6.5. Stres Koşulları Altında Papain Benzeri Sistein Proteazların Fonksiyonu

Bitkiler sürekli olarak çevresel ısı, kuraklık, soğuk veya tuzluluk gibi abiyotik streslere maruz kalırlar. Bitkiler abiyotik streslerle başa çıkmak için, gen altkümelerinin ekspresyonunu yeniden programlayarak ve uyarlanabilir bir tepki indükleyebilen hassas mekanizmalar geliştirmiştir. Bitkinin hayatta kalmak için birincil savunma hattı olan proteinlerin proteoliz ile geri dönüşümünde bitki papain benzeri sistein proteazları önemli rol oynamaktadır. Çoklu çevresel streslere yanıt olarak PLCP'ler, ağırlıklı olarak yukarı regüle edilen bitki proteazlarıdır ve ekspresyon oranında artış gözlenmektedir [Rabbani et al., 2003; Kempema et al., 2007; Roberts et al., 2012; Diaz-Mendoza et al., 2014].

Dehidrasyon stres adaptasyonu için iki önemli protein markeri olan AtRD21A ve AtRD19A, kuraklık ve tuz stresleri tarafından büyük ölçüde indüklenmektedir [Koizumi et al., 1993]. Zang ve ekibinin yapmış olduğu çalışmada Polietilen glikol (PEG), tuz ve soğuk stresleri altında, buğday papain benzeri sistein proteaz geninin (*TaCP*) ekspresyonu yukarı regüle edildiği gözlenmiştir [Zang et al., 2010]. Ek olarak, *TaCP*'yi aşırı eksprese eden transgenik Arabidopsis, yabani tipe oranla çok daha güçlü kuraklık toleransı göstermiştir, bu da *TaCP*'nin dehidrasyon toleransına aracılık etmede bir rol oynadığını gösterir [Zang et al., 2010]. Tatlı patates *SPCP2* geni doğal yaşlanmanın yanı sıra karanlık, absisik asit (ABA), jasmonik asit (JA) ve etefon kaynaklı yaşlanma sırasında da önemli ölçüde artış göstermektedir [Chen et al., 2010]. Arabidopsis'te tatlı patates *SPCP2* geninin aşırı ekspresyonu, kuraklık ve tuz stresine karşı direnci arttırırken, tatlı patates *SPCP3* geninin aşırı ifadesi ise kuraklık stresine

duyarlılık kazandırmıştır [Chen et al., 2013]. Biber (*Capsicum annuum*) PLCP geni (CaCP) ekspresyonu yaprak yaşlanması sırasında uyarılmış ve abiyotik ve biyotik strese karşı cevap oluşturmada önemli ölçüde regüle edilmemiştir. Biberde CaCP'nin baskılanması, tuz ve ozmotik strese karşı toleransı arttırmıştır [Xiao et al., 2014]. 2016 yılında yapılan bir çalışmada arpa katepsin benzeri protein HvPap-1, karanlık ve azot açlığına yanıt olarak uyarılmıştır [Velasco-Arroyo et al., 2016]. HvPap-1'in arpada aşırı ifadesi yaprak yaşlanmasını hızlandırırken, HvPap1'i miRNA ile susturulması yaşlanma sürecini geciktirmiştir [Velasco-Arroyo et al., 2016]. Ek olarak, stres koşulları altında, arpa katepsin benzeri proteinlerin (HvPap-1, HvPap-6 ve HvPap-19) ifadesi arpa mikro gözeneklerinde artırılmış ve otofaji aktive edilmiştir. Katepsinlerin kaspaz3 inhibitörleri tarafından inhibisyonu otofajiyi azaltırken ve stres kaynaklı mikro-gözenekli embriyogenezi arttırmıştır. [Barany et al., 2018].

Protein hidrolizi, bitkilerin olumsuzluk streslerine yanıt vermesi için çok önemlidir. Pek çok PLCP proteazı ayrıca bitki yaprak yaşlanmasını hızlandırır veya abiyotik strese karşı bitki duyarlılığını artırır. Bu durumda, bitkiler, bitki büyümesini teşvik etmek ve mahsul verimini arttırmak için PLCP'lerin gen ekspresyonunu veya protein aktivitesini bazı düzenleyiciler aracılığıyla düzenler. Son zamanlarda yoğun bir şekilde çalışılan PLCP inhibitörü fitokistatindir ve birçok araştırma, fitokistatinlerin aşırı ifadesinin önemli ölçüde bitki yaprak yaşlanmasını geciktirdiğini ve stres toleransını arttırdığını ayrıca proteaz aktivitesinin doğrudan inhibisyonunun önemli bir neden olabileceğini ortaya koymuştur [Kunert et al., 2015; Subburaj et al., 2017; Tan et al., 2017a,b]. Sonuç olarak, farklı türlerdeki PLCP'lerin proteaz ekspresyonunun ve eyleminin uzamsal modeli olarak farklı etkileri, işlevsel substratı, spesifik büyüme periyodu ve bitkinin bulunduğu büyüme durumu gibi çeşitli faktörlerle belirlenir. Bu nedenle, farklı özel ortamlarda bitki stres toleransını arttırmak için PLCP'lerin aktivitesinin düzenlenmesi son derece önemlidir.

2.6.6. Papain Benzeri Sistein Proteazların Bitki Savunma Sistemindeki Rolü

Bitkiler doğal ortamda bakteri, mantar, oomisetler, toprak kurtları, böcekler ve mikroplar dahil olmak üzere pek çok patojen ve zararlıların saldırısına uğramaktadır. Çoğu çalışma, bitki patojenine karşı savunmada PLCP'nin önemini vurgulamıştır. Bir çok durumda, PLCP ekspresyonunun eksikliği patojen direncinde değişikliklere yol

açar çünkü PLCP mutasyonları bitkileri patojen enfeksiyonuna daha duyarlı hale getirir [Misas-Villamil et al., 2016]. Vezikül içinde lokalize olan salgılanmış mısır PLCP'si olan Mir1 (mısır doğuştan (inbred) direnci 1)'in larva beslenmesinden sonra yara yerinde yüksek miktarda biriktiği gözlenmiştir [Chang et al., 2000]. Mir1'i eksprese eden bitkilerle beslenen tütün tomurcuk kurdu larvaları ciddi hasara uğramış ve böcek bağırsağının peritrofik matriksi bozulmuştur [Pechan et al., 2000, 2002]. Son araştırmalar, Mir1'in birikmesi için etilenin (ET) gerekli olduğunu ve mısırdaki mısır yaprak bitine (CLA) karşı direncin artmasına katkıda bulunduğunu göstermiştir [Louis et al., 2015]. Ek olarak, PLCP'ler ayrıca salisilik aside (SA) bağımlı savunma sinyalleşmesinin önemli düzenleyicileridir.

Önceki çalışmalar SA tedavisinin mısır yapraklarında PLCP protein aktivitesini güçlü bir şekilde indükleyebildiğini ve aktive edilmiş apoplastik PLCP'lerin de SA ile ilişkili bağışıklık genlerinin ekspresyonunu indükleyebileceğini göstermiştir [van der Linde et al., 2012]. En son araştırmalar, PLCP'lerin SA birikimini indüklemek ve yapraklarda SA savunma sinyalini aktive etmek için protein öncüleri yoluyla *Z. mays* bağışıklık sinyali peptidi 1'i (Zip1) serbest bırakması gerektiğini ortaya koymaktadır [Ziemann et al., 2018]. Bu sonuçlar SA'nın PLCP'lerle etkileşiminin, biyotik stres altında savunma genlerinin ekspresyon regülasyonunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Domates Rcr3 (*Cladosporium* direnci-3) ve Pip1 (*Phytophthora* inhibe edilmiş proteaz-1) patojen tehdidi üzerine yukarı regüle edilmiş ve aktiviteleri patojen türevi inhibitörler tarafından inhibe edilmiştir [Kruger et al., 2002; Tian et al., 2007]. Rcr3'ün silinmesi, *Phytophthora infestans* [Song et al., 2009], *Cladosporium fulvum* [Dixon et al., 2000] ve toprak solucanı *Globodera rostochiensis*'e [Lozano-Torres et al., 2012] karşı bitkilerin duyarlılığını arttırmıştır. Rcr3'e benzer şekilde Pip1 mutant bitkileri de *C. fulvum*, *Pseudomonas syringae* ve *P. infestans*'a karşı daha duyalıdır [Ilyas et al., 2015]. *Nicotiana benthamiana*'da C14'ün susturulması bitkilerin *P. infestans*'a duyarlılığını artırırken [Kaschani et al., 2010], *Arabidopsis* rd19 ve rd21 mutantları da sırasıyla bakteriyel patojen *Ralstonia solanacearum* ve mantar patojeni *Botrytis cinerea*'ya karşı daha duyalıdır [Bernoux et al., 2008; Shindo et al., 2012].

Tüm bu veriler birlikte ele alındığında, PLCP'lerin patojen savunmasını düzenlemede belirleyici bir rol oynadığını göstermektedir. Bahsi geçen yukarıdaki çalışmalardan görülebileceği gibi, önceki çalışmalar PLCP genlerinin mutasyonunun bitki bağışıklığını azaltmasına odaklanmıştır, ancak PLCP'lerin bitki bağışıklık

savunmalarına nasıl katıldığına ilişkin nispeten az anlayış vardır. Ayrıca PLCP'ler, ET-ve SA-yolu gibi bitki savunma hormonu sinyal yollarında önemli bir rol oynamaktadır. Bitkinin çeşitli savunma hormonları arasındaki koordineli etkileşimin bitki bağışıklığı için çok önemli olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, PLCP'lerin çeşitli bitki hormonu yollarındaki rolünü ve etki mekanizmalarını incelemek PLCP'lerin bitki bağışıklığını nasıl koruduğunu veya geliştirdiğini anlamanın etkili bir yolu olacaktır. Öte yandan, bitki bağışıklık süreçlerinde PLCP'lerin rolünü sentetik olarak ortaya koymak, bitki bağışıklık mekanizmalarının kapsamlı bir şekilde araştırılması için bir başka önemli araştırma içeriğidir.

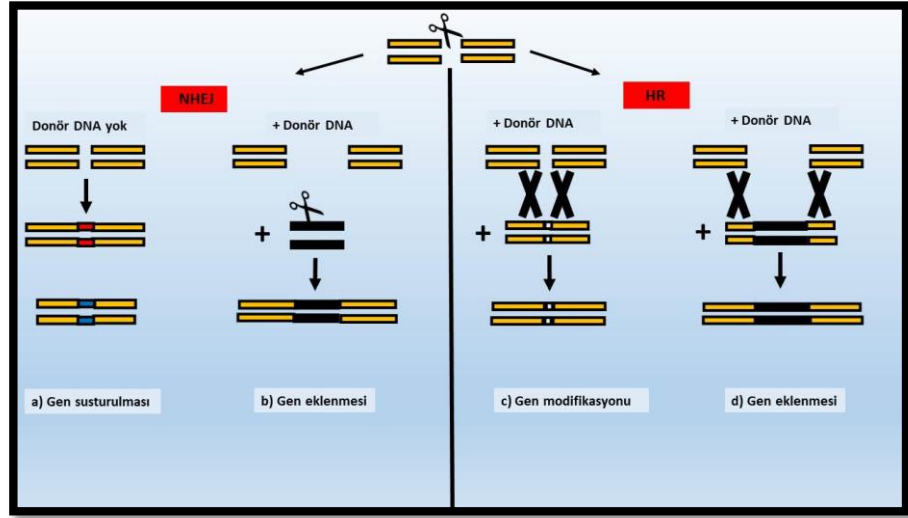
2.7. CRISPR Cas9 Sistemi

Genom düzeltme tekniklerinin başlıcaları arasında yer alan çinko parmak nükleazları (ZFNs): Zinc Finger Nucleases), TAL efektör nükleazları (TALENs: TAL Effector Nucleases) ve kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar/Cas nükleazları (CRISPR/Cas: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), ıslah sürecini hızlandıran aracılı transformasyon yöntemleridir [Belhaj et al., 2013; Sprink et al., 2015].

Belirli bölgelerdeki genleri değiştirerek ya da belirli bir bölgeye istenilen genin aktarılmasını sağlayan “moleküler makas” olarak da tanımlanan bu nükleazlar, aktarıldıkları bitki genomunda hedef gen ya da bölgede istenilen modifikasyonları bu bölgelerde çift zincir DNA kırıklarına (DSB: Double Strand Break) neden olarak başlatılır [Curtin et al., 2012]. DSB'lerin oluşmasından sonra, bu kırıklar hücrenin kendi tamir mekanizmaları olan Homolog Rekombinasyon (HR: Homolog Recombination) ya da Homolog Olmayan Uç Birleşimi (NHEJ: Non-Homologous End Joining) mekanizmaları ile tamir edilir (Şekil 2.5). Genomda meydana gelen modifikasyonlar hücre tarafından kullanılan tamir mekanizmasına bağlı olarak farklılıklar gösterir.

Bir tamamlayıcı donör DNA ya sahip HR tamir mekanizması ile, ekleme veya silme olaylarının indüklenmesi sonucunda genin susturulması sağlanabilir. Bununla birlikte HR tamir mekanizmalarını içeren homolog oryantasyon onarımı (HDR: Homology Directed Repeat), gen değiştirme veya gen ekleme gibi hatasız ve gene özgü modifikasyonları oluşturmak için kullanılabilir [Cao et al., 2016]. NHEJ ise daha çok çevresel mutasyonların genoma vermiş olduğu zararların düzeltilmesinde

kullanılan ve özellikle insanlar ve bitkiler gibi gelişmiş ökaryotlarda baskın olan bir tamir mekanizmasıdır. NHEJ tamir mekanizması genellikle rastgele baz çiftlerinin eklenmesi (kırmızı) veya silinmesi (mavi) ile sonuçlanır ve bu gen susturulmasına neden olur (Şekil 2.5) Bu yolla genomik bir bölgeye nükleotitler eklenip çıkabilir ve sonuçta genomda çerçeve kayması mutasyonları gözlenebilir. Eğer aynı nükleaz ile uyumlu çıkıntılar bırakarak aynı anda kesilen bir donör DNA mevcutsa, NHEJ tamir mekanizmasıyla gen eklenmesi de sağlanabilir.



Şekil 2.5: DNA onarım mekanizması.

Farklı prokaryotik canlılarda CRISPR bölgelerini saran DNA dizilerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi sonucunda CRISPR bölgelerinden önce veya sonra Cas proteinlerini kodlayan genlerin varlığı tespit edilmiş ve CRISPR bölgelerinin dört adet Cas geni (*Cas 1-4*) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [Jansen et al., 2002]. Birçok Cas geninin nükleaz ve helikaz gen ailelerine benzer DNA dizileri içerdiği keşfedilmiş ve böylece prokaryotların virüslere karşı geliştirmiş oldukları RNA-aracılı savunma sisteminin CRISPR/Cas sistemi olabileceği düşünülmüştür. Çalışmaların ardından, çoklu CRISPR/Cas alt tipleri ve farklı Cas protein aileleri rapor edilmiştir [Haft et al., 2005]. CRISPR bölgelerinin en önemli özelliği, palindromik olarak tekrarlanan, ileri ve geri yönlü aynı okunan kısa DNA dizilerine sahip olmasıdır. Bunun yanı sıra diziler arasında aralayıcı DNA bölgeleri de içermektedir. 2005 yılında, eş zamanlı yapılan birbirinden bağımsız çalışmalar sonucunda bazı CRISPR aralayıcı bölgelerinin faj ve plazmit DNA'sının prokaryot genomuna entegre edilmesi sayesinde oluşturulduğu

rapor edilmiştir [Mojica et al., 2005]. 2007 yılında ilk kez prokaryotlardaki kazanılmış bağışıklık sisteminin CRISPR/Cas mekanizması gösterilmiştir. Barrangou vd. yapmış olduğu bu çalışmada, *Streptococcus thermophilus* adlı bakterinin, kendisine saldıran virüse karşı direnç sağlamak için virüs genomunun bir parçasını kendi CRISPR lokusuna eklediği keşfedilmiştir [Barrangou et al., 2007].

Son yıllarda RNA-aracılı sistem olan CRISPR/Cas mekanizması büyük oranda aydınlatılmıştır. Brouns ve arkadaşlarının (2008) *E. coli*'de tanımladığı bir Cas protein kompleksi olan Cascade, öncü CRISPR RNA molekülünü olgun aralayıcı (spacer) içeren RNA moleküllerine (crRNA) kesmektedir. Ayrıca bir bakteriyel konakçının, DNA virüsü ile enfeksiyonuna karşı bağışıklığını sağlamak için Cascade ile birlikte crRNA ve bir helikaz/nükleazına (Cas3) da gereksinim duyduğu bulunmuştur. Bunun yanı sıra CRISPR RNA'lar (crRNA) CRISPR mekanizmasında rehber olarak da yer almaktadır [Brouns et al., 2008; Kira et al., 2015]. crRNA'nın sens ve antisens yönlerinde bakteride virüse karşı bağışıklık sağladığı bir anti-virüs CRISPR tasarlayarak, gösterilmiştir. Böylece crRNA kılavuzlarının dsDNA'yı hedeflediği belirtilir. Marraffini ve Sontheimer yapmış olduğu bir diğer çalışmayla (2008) , *S. epidermidis*'in bir CRISPR dizisinin gerçekten de DNA'yı hedeflediğini ayrıca konjügasyonu önlemek için de RNA'yı düzelttiğini keşfetmiştir. Takip eden sonraki yıllarda *S. thermophilus*'ta CRISPR/Cas'ın faj ve plazmid DNA dizisinin her iki ipliğini de kestiği belirlenmiştir [Garneau et al., 2010]. 2011 yılında kodlamayan trans-aktif edici CRISPR-RNA'lar (tracrRNA) tanımlanmıştır [Deltcheva et al., 2011] ve CRISPR/Cas sistemi, *E. coli*'den *S. thermophilus*'a ilk olarak aktarılmıştır [Sapranauskas et al., 2011]. Böylece tracrRNA, crRNA ve Cas9 fonksiyonları belirtilmiştir ve CRISPR/Cas sistemi *S. pyogenes* adlı organizmada gösterilmiştir [Jinek et al., 2012].

Cas9 endonükleaz, crRNA ve tracrRNA olarak adlandırılan iki küçük RNA molekülü içeren dört bileşenli bir sistemdir. Yapılan çalışmalar sonucunda Cas9 endonükleaz, iki RNA molekülünü, Cas9 ile kombine edildiğinde, DNA tarafından belirlenen DNA hedefini bulabilen ve kesebilen bir "tek kılavuz RNA" haline getirilmiştir. Böylece daha yönetilebilir iki bileşenli bir sisteme dönüştürülmüştür [Jinek et al., 2012]. Yapay Cas9 sisteminde, kılavuz RNA'nın nükleotit sekansı manipüle edilebilir ve herhangi bir DNA dizisinin kesilmesi için hedefleyecek şekilde programlanabilir. *S. thermophilus*' da yapılan bir çalışmada, genomda seçilen bir alanı hedeflemek için CRISPR sisteminde Cas9'un crRNA'sının dizisi değiştirilerek,

sistemin yeniden programlanabileceği gösterilmiştir [Mojica and Montoliu, 2016]. Bu gelişmeler, modifiye CRISPR/Cas9 sistemi ile genomları düzeltme çalışmalarına yeni bir boyut kazandırmıştır.

CRISPR/Cas9 uygulamasıyla yapılan genom düzeltmesi zebra balığı ve bakteri hücrelerinde başarıyla uygulanmıştır [Hwang et al., 2013]. Aynı zamanda, model bitki türleri olan *Arabidopsis thaliana* ve *Nicotiana benthamiana*'da, agroinfiltrasyon ve protoplast transfeksiyonu gibi farklı transformasyon yöntemleri kullanılarak, ekleme ve delesyon oluşturmak için NHEJ ve HDR gibi farklı onarım mekanizmalarıyla bitki genomunun düzeltilmesi için CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanılmıştır [Feng et al., 2013]. CRISPR, bilim insanlarının spesifik genleri hedef almasına ve etkinleştirmesine veya susturabilmesine olanak veren programlanabilir transkripsiyon faktörleri yapmak için değiştirilmiştir [Larson et al., 2013]. Akabinde insan da dahil olmak üzere memeli genomlarında CRISPR/Cas9 ile diziye özgü DNA mutagenesi oluşturulabildiği rapor edilmiştir [Cong et al., 2013].

Son zamanlarda, CRISPR/Cas9 teknolojisinin gelişmesi bitkilerdeki genetik manipülasyon çalışmalarında yeni imkanlar tanımıştır [Bao et al., 2019]. CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak genomları değişikliğe uğratılmış bitkiler arasında *Sorghum bicolor* [Jiang et al., 2013], *Triticum aestivum* [Gao et al., 2013], *Zea mays* [Liang et al., 2014], *Marchantia polymorpha* [Sugano et al., 2014], *Nicotiana tabacum* [Baltes et al., 2014], *Brassica oleracea* [Lawrenson et al., 2015], *Solanum tuberosum* [Wang et al., 2015], *Glycine max* [Jacobs et al., 2015], *Lactuca sativa* [Woo et al., 2015], *Nicotiana attenuate* [Woo et al., 2015], *Medicago truncatula* [Michno et al., 2015], *Populus tremula* [Zhou et al., 2015], *Populus tomentosa* [Fan et al., 2015], *Cucumis sativus* [Chandrasekaran et al., 2016], *Petunia hybrida* [Subburaj et al., 2016], *Papaver somniferum* [Alagoz et al., 2016], *Physcomitrella patens* [Collonnier et al., 2017], *Gossypium hirsutum* [Li et al., 2017], *Arabidopsis thaliana* [Miki et al., 2018] ve *Glycine max* [Bao et al., 2019] yer almaktadır. CRISPR / Cas9 teknolojisi, bitkilerdeki genom düzenleme için daha çok yönlüdür. Bu yeni teknolojinin bitki biyoteknolojisindeki kullanım alanları genellikle bitkilerin verim ve kalite özelliklerinin iyileştirilmesi, biyotik ve abiyotik streslere dayanıklı bitki geliştirilmesi, bitkilerin fitoremediasyon ve biyofortifikasyon amacıyla kullanılmasını içermektedir. CRISPR araçlarının nispeten düşük maliyeti ve kullanım kolaylığı, akademik alanlarda ve her boyuttaki şirketlerde, esas olarak ürün bazlı özellik gelişimini hızlandıran yenilikçi araştırmaları teşvik etmektedir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Bitki Materyali

Tez çalışmasında model bitki olan *Nicotiana tabacum* cv. Samsun tohumları kullanılmıştır. Gen aktarımı yapılmayan ve transgenik tütün bitkileri Gebze Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Yelda Özden Çiftçi’den temin edilmiştir. *Staphylococcus saprophyticus* bakterisinden izole edilmiş olan nitroredüktaz geni (*Ssap-NtrB*) aktarılmış transgenik T2 TR3-4 tütün bitkileri Prof. Dr. Çiftçi ve grubunun 2016’da tamamladığı 214Z157 No’lu “Kirlletici nitroaromatiklerin düşük sıcaklıklarda *in vitro* fitoremediasyonu: Bakteriyal nitroredüktazın (*Ssap-NtrB*) tütünde heterelog ekspresyonu ve biyobozunum uygulamalarının araştırılması” başlıklı TÜBİTAK proje çalışması sonucunda elde edilmiştir. Çalışma boyunca bitkiler, yarı-güçlü MS ortamında $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, $300\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ floresan ışığında, %70 nem ve 16/8 saat (aydınlık/karanlık) foto periyodu koşullarına sahip bitki büyütme odasında kültürlenmiştir.

3.1.2. Kullanılan Mikroorganizma Suşları

Tez çalışmasında CRISPR/Cas9 sisteminde kullanılan pYLsgRNA-AtU3d/LacZ, pYLsgRNA-AtU6-1 ve pYLsgRNA/Cas9P plazmitleri GTÜ, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı’ndan temin edilen *E. coli* DH5 α suşundan izole edilmiştir. Yüksek oranda gen ekspresyonu elde etmek için kullanılan *E. coli* DH5 α hücre hattı ve tütün bitkisine transformasyon aşamasında kullanılan *A. tumefaciens* EHA105 hücre hattı GTÜ, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Genetik Laboratuvarı’ndan temin edilmiştir.

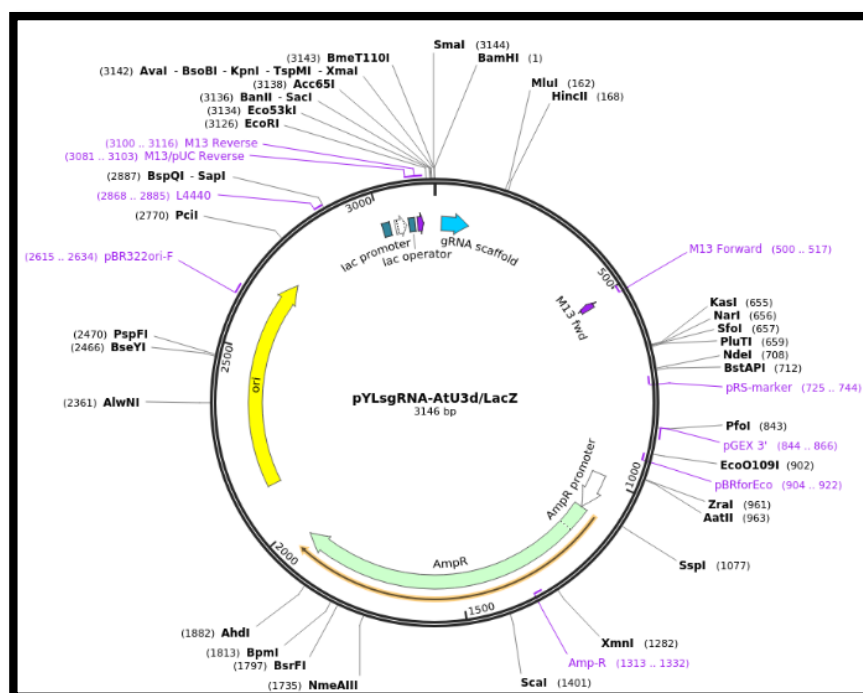
3.1.3. Kullanılan Plazmitler

Tez çalışmasında kullanılan plazmitler Tablo 3.1’de listelenmiştir.

Tablo 3.1: Tez çalışmasında kullanılan plazmitler.

Plazmitler	Dirençlilik Belirteci	Dirençlilik	Boyut	Belirlenen Restriksiyon Enzimleri	Referanslar
pYLsgRNA-AtU3d/LacZ	AmpR	Ampisilin	3146 bç	<i>Bam</i> H1	Ma and Liu, 2016.
pYLsgRNA-AtU6-1	AmpR	Ampisilin	3146 bç	<i>Eco</i> R1	Ma and Liu, 2016.
pYLsgRNA/Cas9P	KanR	Kanamisin	16.211 bç	<i>Bam</i> H1	Ma, and Liu, 2016.

Deneylerde kullanılan Addgene firması tarafından temin edilen erişim numaraları sırasıyla KR029100, KR029101 olan pYLsgRNA-AtU3d/LacZ ve pYLsgRNA-AtU6-1 sgRNA ifade kaset plazmitleri sgRNA ekspresyon kasetlerini taşıyan *Escherichia coli* pozitif CRISPR/Cas9 klonlarının seçimini kolaylaştırmak için AmpR direnç belirteç geni içermektedir (Şekil:3.1-2). SgRNA ekspresyon kasetlerinin Golden gate klonlaması için binary vektör olan pYLsgRNA/Cas9P plazmiti kullanılmıştır. Erişim numarası KR029109 bu plazmit CRISPR / Cas9 ikili vektörünü üretmek için iki BsaI bölgesi ile çevrili modifiye edilmiş bir ccdB bölgesi ve klonlarının seçimini kolaylaştırmak için KanR direnç belirteç geni içermektedir. İçermektedir (Şekil 3.3).



Şekil 3.1: pYLsgRNA-AtU3d/LacZ kaset plazmitinin fiziksel haritası.

3.1.4. Kullanılan Enzimler ve Antibiyotikler

Tez çalışmasında kullanılan *E. coli* ve *A. tumefaciens* suşlarının büyütülmesi ve deneylerde kullanılan bitkilerin büyütülmesi için hazırlanan besiyerlerine gerekli durumlarda çeşitli antibiyotikler eklenmiştir. Uygun çözücüler kullanılarak hazırlanan antibiyotikler filtreden geçirilerek steril hale getirilmiştir. Çalışmada kullanılan antibiyotikler, konsantrasyon değerleri ve çözücüler ile birlikte Tablo 3.2’ de gösterilmiştir.

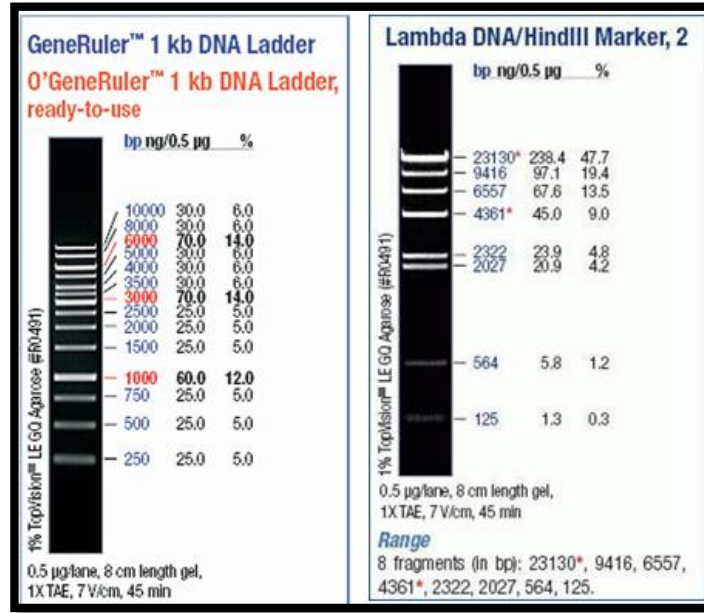
Tablo 3.2 : Kullanılan antibiyotikler.

Antibiyotik	Stok konsantrasyon (mg/ml)	<i>E. coli</i> ’de kullanılan konsantrasyon (µg/ml)	<i>A. tumefaciens</i> ’de kullanılan konsantrasyon (µg/ml)	Bitki Besiyerinde kullanılan konsantrasyon (µg/ml)	Çözücü
Ampisilin	100	100	-	-	dH ₂ O
Kanamisin	50	100	100	100	dH ₂ O
Gentamisin	50	-	30	30	dH ₂ O
Higromisin	500	-	-	30	dH ₂ O
Timentin	250	-	-	250	dH ₂ O

Çalışma boyunca kullanılan enzimler; Lizozim Roche (Mannheim, Almanya) firmasından, RNazA Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından, BamHI-HF EcoR1 Restriksiyon Endonükleazları, 10X Tampon 4 NEB Biolab (Ipswich, ABD) T4 DNA Ligaz, Phusion DNA Polimeraz, Taq DNA polimeraz Thermo Fisher Scientific (Waltham, ABD) firmasından temin edilmiştir.

3.1.5. Kullanılan DNA Moleküler Belirteçleri

Agaroz jel görüntülemeleri için Moleküler DNA Belirteci (MBI Fermantas, O’Gene Ruler™ 1 kb DNA Marker, SM0311 ve Thermo Scientific™ Lambda DNA/HindIII Marker, SM0101) kullanılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: Kullanılan belirteçler.

3.1.6. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler

Tez çalışması kapsamında bakterilerin ve bitkilerin büyümesi için kullanılan besiyerleri Tablo 3.3’de verilmiştir. Deneyler sırasında kullanılan solüsyonlar ve çözeltiler Tablo 3.4’de gösterilmiştir.

Tablo 3.3: Kullanılan besiyerleri ve içerikleri.

BESİYERİ	İÇERİK
Luria Bertani (LB)	10 g NaCl, 10 g tripton ve 5 g maya özütü dH ₂ O ile 1 L’ye tamamlanarak 121°C’da 20 dakika boyunca steril edilir. (pH:7-7.5)
Luria Bertani (LB) Agar	1 L LB besiyeri, 15 g agar bulunan cam şişeye eklenir ve ardından 121°C’da 20 dakika boyunca otoklavlanarak steril edilir. (pH:7-7.5)
Yarı Katı Murashige ve Skoog (MS)	4.405 MS, 20 g sukroz, 3 g gelrite dH ₂ O ile 1 L’ye tamamlanarak 121°C’da 20 dakika boyunca steril edilir. (pH:5.7)
SOB Medyum	Tripton %2, maya özütü %0.5, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl ₂ 10 mM ve MgSO ₄ 10 mM karıştırılarak dH ₂ O ile 1 L’ye tamamlanır ve otoklavlanır.
SOC Medyum	SOB medyuma son konsantrasyon 20 mM olacak şekilde glikoz eklenir ve otoklavlanır.

Tablo 3.4: Kullanılan çözeltiler ve içerikleri.

ÇÖZELTİ	İÇERİK
Solüsyon I	25 mM Tris (pH 8), 10 mM EDTA (pH 8) , 50 mM glikoz
Solüsyon II	0.2 N NaOH , %1 SDS
Solüsyon III	%60 5M Potasyum asetat ,%11.5 Glasiyal asetik asit
TSS Tamponu	PEG (6000 g/mol) %10 DMSO %5 , MgCl ₂ 50 mM (pH 6.5)
İnfiltrasyon Solüsyonu	50 g/L D-glukoz (10 mL), 500 mM MES (10 mL), 20 mM Na ₃ PO ₄ .12H ₂ O (10 mL), 1M Asetosiringon (10 µL) içerecek şekilde dH ₂ O ile 100 mL' e tamamlanır.
CTAB-Ekstrasyon Tamponu	100mM Tris-HCl (pH 8,0], 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, %0.2 (v/v) β-merkaptoetanol ve %2 (w/v) CTAB
Süspansiyon Tamponu	1 mM EDTA ve %2 Polivinilalkol içeren 50 mM Potasyum fosfat tamponu, pH 7.8
Solüsyon A	100 mL solüsyon için 1 g Sodyum bikinkoninik asit (BCA), 2 g Sodyum karbonat, 0.16 g Sodyum tartarat, 0.4 g NaOH, 0.95 g Sodyum bikarbonat pH 11.25'e ayarlanarak dH ₂ O ile tamamlanır.
Solüsyon B	0.4 g Bakır sülfat. 5H ₂ O dH ₂ O ile 10 mL'ye tamamlanır.
BCA Solüsyonu	50 hacim solüsyon A ile 1 hacim solüsyon B karıştırılır.

3.1.7. Kullanılan Kitler

Bu tez çalışmasında klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere izole edilen plazmitlerin temizlenmesinde kullanılan PCR Temizleme (clean-up) Jel Ekstraksiyon kiti (Macherey-Nagel, Almanya), BCA ile protein miktar tayin kiti (Pierce™ BCA Protein Assay Kit) Thermo Fisher Scientific firmasından (Waltham, ABD) temin edilmiştir.

3.1.8. Cihazlar

4 °C ve -20 °C Buzdolabı (Arçelik), -80 °C derin dondurucu (Thermo, Forma 86 °C ULT Freezer), Steril Kabin (Heraeus, HP48), Masa Üstü Santrifüj (VWR, Microsent 17R), Ultrasantrifüj (Beckman Coulter™ Avanti™ J-30I Centrifuge),

Masa Üstü Santrifüj (BACKMAN COULTER, Microfuge 22R), Spektrofotometre (BIORAD, Smartspec 3000), Yatay Elektrophorez Sistemi (BIO-RAD, Mini-Sab Cell CT), Güç kaynağı (BIO-RAD, PowerPac Basic), Otoklav (HIRAYAMA, HİCLA HVE-50), UV Görüntüleme Cihazı (Vilmer Loumart), Dikey Elektrophorez Sistemi (Bio-Rad Mini-Sab Cell CT), UV Görüntüleme Cihazı (Azure Biosystem, c600), BioSpec-nano (UV1800 Shimadzu/Biotech), pH Metre (Hana Instruments, pH 211 Microprocessor pH Meter), Su banyosu (TECHNE, TE-10A Tempette), Buz makinesi (BAR-LİNE BF85), Floresans Spektrofotometre (VARIAN, ECLipse), UV Spektrofotometre (Beckman Coulter DU 530), Mikrodalga Fırın (Samsung), Jel Görüntüleme Cihazı (Biorad) , Gebze Teknik Üniversitesi'nden temin edilmiştir.

3.1.9. Kullanılan Kimyasallar

Agar, NaOH, SDS, Tris, EDTA, D (+) Glukoz, Sükroz, CaCl₂, MgCl₂, Mannitol, β-Merkaptoetanol, hidroklorik asit, fenol, kloroform, izoamilalkol , coomassie brillant blue R250, magnezyum fosfat, lityum klorür Merck, ABD firmasından, Pepton BactoTM, Almanya firmasından, NaCl, %84-88 Gliserol, İzopropanol, Agaroz, Triton X-100 Sigma Aldrich, Almanya firmasından, Gliserol, KCl, Asetik asit, %99.5 Etanol Riedel de Haen, ABD firmasından, MS ve Gelrite Duchefa, Hollanda firmasından, ampicilin, Red Safe, TEMED, akrilamid solüsyonu (%40 elektrophorez) ise Fisher BioReagents, ABD firmasından temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Adaptör Primerlerin Dizaynı ve sgRNA İfade Kasetlerinin pYLCRISPR Vektörüne Klonlanması ve *Agrobacterium*'a Aktarılması

3.2.1.1 Adaptör Primerlerin Dizaynı (U3-U6) ve SgRNA İfade Kasetlerinin pYLCRISPR Vektörüne Klonlanması

Nicotiana tabacum NtCP6 geninin susturulması amacıyla Lee ve arkadaşlarının geliştirdiği (2018) CRISPR/Cas9 yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla transkripsiyon başlangıç nükleotidi farklı olan promotörlere sahip (U3d ve U6-1) iki sgRNA kaseti kullanılmıştır. Bu promotör tiplerine göre Cas9 enziminin kesim yapması için hedef

dizide bulunması gereken 3'NGG PAM dizisinin taranması CRISPR hedef oluşturma yazılımı olan çevrimiçi CRISPOR kullanılarak (<http://crispor.tefor.net/crispor.py>) gerçekleştirilmiştir. Bu programa göre hedef *NtCP6* geninin ilk ekzonunun içinde iki sgRNA (en yüksek GC içeriği içeren ve en düşük hedef dışı bağlanma bölgesi olan) hedef dizileri belirlenmiştir. Her hedef bölge için ileri adaptör primerini (FP) oluşturmak için *NtCP6* geninin 5' ucuna (PAM dizisi dahil değil) U3d promotörü için 5'-GTCA-3' ve U6-1 promotörü için ise 5'-ATTG-3' eklenerek ve geri adaptör primerini (RP) oluşturmak için *NtCP6* geninin tamamlayıcı dizisinin 5' ucuna 5'-AAAC-3' eklenerek adaptör primerlerin dizaynı yapılmıştır (Tablo 3.5).

Tablo 3.5: *NtCP6* geni için tasarlanan adaptör primer setleri.

Promotör	Oligonükleotid dizisi 5' → 3'
NtCP6-U3d	FP: GTCAGAGAGAAAGGTGTTCTTGT RP: AAACACAAGAACACCTTTCTCTC
NtCP6-U6-1	FP: ATTGGAGTACAGGTCCATGTACT RP: AAACAGTACATGGACCTGTACTC

3.2.1.2. *E. coli*'den Plazmit İzolasyonu

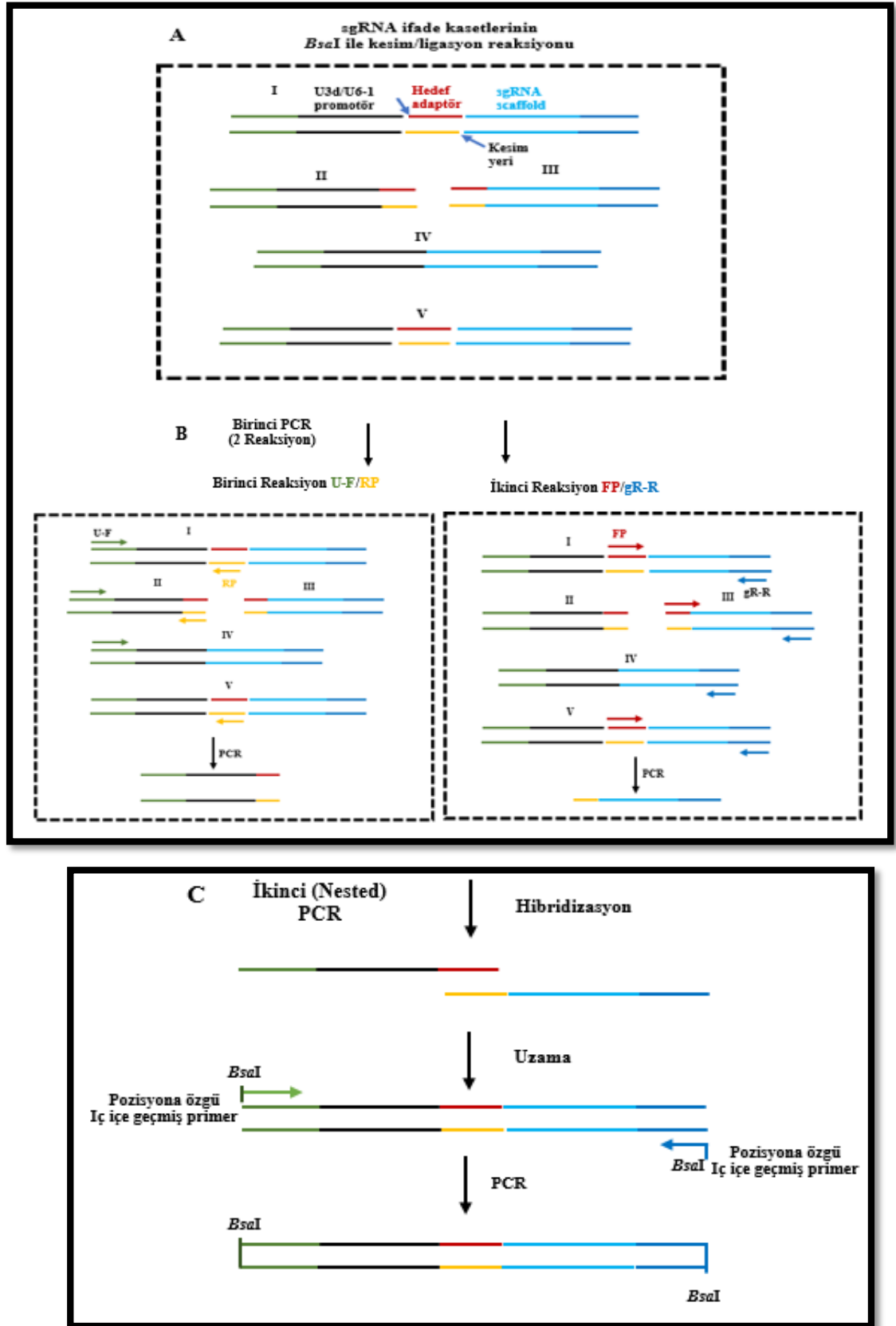
E. coli DH5α hücrelerinden pYLsgRNA-AtU3d/LacZ, pYLsgRNA-AtU6-1 kaset plazmitleri ve pYLsgRNA/Cas9P plazmitinin izolasyonları Sambrook ve arkadaşlarının geliştirdiği yönteme uygun olarak yapılmıştır [Sambrook et al., 1989]. Plazmitleri içeren *E. coli* DH5α hücreleri 100 mL LB besiyerinde 37 °C'da, 200 rpm'de çalkalanarak 12-16 saat büyütülmüştür. Hücre kültürü, oda sıcaklığında 4500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış ve her bir hücre pelleti üzerine 1200 µL solüsyon I eklenerek vortekslenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra her bir eppendorfta 200'er µL olacak şekilde paylaştırılmıştır. Daha sonra her bir eppendorf üzerine 400 µL solüsyonII eklenerek dakikada bir karıştırılarak 5 dakika buzda inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 300 µL solüsyon III ilave edilip 2 dakikada bir karıştırılarak 10 dakika buzda bekletilmiş ve daha sonra 4 °C'da, 14000 rpm'de, 20 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni eppendorflara aktarılmış ve üzerine 0.6 hacim izopropanol ilave edilerek 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve ardından 25 °C'da, 11000 rpm'de

30 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet dH₂O'da çözülmüştür. Çözelti üzerine RNaz (10 mg/mL) eklenerek 37 °C'da 30 dakika inkübe edilmiştir.

Elde edilen plazmit, PCR Temizleme (clean-up) Jel Ekstraksiyon Kiti (MN) kullanılarak saflaştırılmıştır. Plazmit DNA'sının miktarı ve saflığı absorbands 260 nm'de ölçülerek belirlenmiştir. Bununla birlikte elde edilen plazmitler uygun restriksiyon enzimleriyle (pYLsgRNA-AtU3d/LacZ kaset plazmiti *EcoRI* ile pYLsgRNA-AtU6-1 kaset plazmiti ve pYLsgRNA/Cas9P plazmiti ise *BamHI* ile) kesilmiştir ve plazmitlerin varlığı % 0.8 lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenerek doğrulanmıştır.

3.2.1.3. sgRNA İfade Kasetlerinin pYLCRISPR Vektörüne Klonlanması

Seçilen U3d ve U6-1 promotörleri içeren sgRNA plazmit vektörleri *BsaI* ile kesilmiş ve çift zincirli hedef adaptörleri ile ligasyonu sağlanmıştır. Adaptör primerleri bir araya getirerek sgRNA ekspresyon kasetleri elde etmek için bir birini takip eden iki PCR reaksiyonu uygulanmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: sgRNA ekspresyon kasetlerinin hazırlanma stratejisi.

Hedef adaptörleri içeren plazmit vektörünün *BsaI* kesim/ligasyon reaksiyonunda çeşitli tiplerde (I-V) ürünler oluşabilir; hedef sekansı olmayan (IV) veya çift hedef sekansı olan (V) anormal olanlar, muhtemelen aşırı kesim/ ligasyonun neden olduğu cıvalı uç fragmanları arasındaki ligasyonla üretilebilir (Şekil 3.5A).

Her bir kaset için sırasıyla evrensel ileri primer (UF) / adaptöre ait geri primer (RP) ve adaptöre ait ileri primer (FP) / evrensel geri primer (gR-R) setleri kullanılarak birbirini takip eden iki PCR reaksiyonları gerçekleştirilir. Ligasyon şablonunda her iki reaksiyondaki tip IV ürünlerinin amplifikasyonu yapılamazken, sırasıyla doğru tip olan 1. reaksiyonda tip II ve 2. reaksiyonda tip III ürünlerini üretmek için her iki reaksiyondaki tip V ürünlerinin amplifikasyonu yapılabilir (Şekil 3.5B). Tam bir sgRNA ekspresyon kaseti elde etmek için iç içe geçmiş pozisyona özgü primerler kullanılarak ikinci (örtüşen) PCR yapılır (Şekil 3.5C).

Nested PCR sonucunda oluşturulan sgRNA ekspresyon kasetleri, golden gate reaksiyonu ile pYLCRISPR/Cas9P35S-N plazmitinin içine yerleştirilir.

- sgRNA İfade Kasetlerinin Hazırlanması

Hedef dizileri içeren sgRNA ekspresyon kasetlerini oluşturmak için seçilen U3d ve U6-1 promotörleri içeren sgRNA vektörleri (U3d promotörü için pYLsgRNA-AtU3d/LacZ kaset plazmiti ve U6-1 promotörü için pYLsgRNA-AtU6-1 kaset plazmiti) *BsaI* ile kesilmiş ve çift zincirli hedef adaptörleri ile ligasyonu sağlanmıştır. Bu amaçla her bir sgRNA ekspresyon kaseti için enzim kesim/ligasyon reaksiyonu hazırlanmıştır. Reaksiyon toplam hacmi 10 µL olacak şekilde 1 µL 10X CutSmart tamponu, 20 ng pYLsgRNA plazmit DNA, 0.5 µL hedef adaptör primer karışımı (1:1 oranında karıştırılmıştır), 3 U *BsaI*-HF, 20 U T4 DNA ligaz, 0,5 µL 10XNEB T4 DNA ligaz tamponu ve deionize H₂O içermektedir. Daha sonra, enzim kesim/ligasyon reaksiyonu ısıtılmış bir kapak kullanılmadan bir termal döngü cihazında 37°C' da 5 dakika ve 20°C' da 5 dakika 10 döngü olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

- PCR ile Ekspresyon Kasetlerinin Oluşturulması

Golden gate klonlama için oluşturulan sgRNA ekspresyon kasetleri pYLCRISPR/Cas9 aktarılmıştır (Şekil 3.7). Golden gate klonlama, Tip II restriksiyon enzimleri (*BsaI*, *BsmBI* ve *BbsI* gibi) ve T4 DNA ligazı kullanılarak birden fazla insertün bir vektör omurgasına hızlı ve kesintisiz bir şekilde birleştirilmesi için etkili

bir yöntemdir [Werner *et al.*, 2012]. Ayrıca oluşturulan son ürün Tip II restriksiyon enzimi tanıma bölgesine sahip olmadığından, doğru şekilde bağlanan ürün restriksiyon enzimi tarafından tekrar kesilemez, yani reaksiyon geri dönüşümsüzdür [Weber *et al.* 2011].

Bu amaçla hedef genleri içeren adaptörleri bir araya getirerek tam bir sgRNA ekspresyon kasetlerini elde etmek için birbirini takip eden iki PCR reaksiyonu uygulanmıştır.

Birinci PCR reaksiyonunda, her bir sgRNA kaseti için hazırlanan enzim kesim/ligasyon reaksiyon ürünleri kalıp olarak kullanılmıştır ve bölge spesifik primer çiftleri (1. kaset için UF/U3-RP ve U3F/gR-R, 2. kaset için U6-1-FP/gR-R ve UF/U6-1RP primer setleri) (Tablo 3.6) ile çoğaltılmıştır. Toplam reaksiyon hacmi 12.5 µL olacak şekilde reaksiyon, 5X Füzyon tampon, 2.5 mM dNTP karışımı, 2.5 µM UF/FP, 2.5 µM RP/gR-R primer, 5X Füzyon polimeraz enzimi, 1/10 oranında seyreltilmiş enzim kesim/ ligasyon reaksiyonu ürünleri kullanılarak 28 döngüde gerçekleştirilen PCR reaksiyonunun aşamaları şöyledir: sırasıyla 95 °C’ da 10 saniye, 60 °C’da 15 saniye ve 68 °C’da 20 saniye.

Her iki plazmit için kullanılan bölge spesifik primerler ve bundan sonraki basamakta tam sgRNA ekspresyon kasetleri elde etmek için kullanılan iç içe geçmiş pozisyona uygun primerler Tablo 3.6’da gösterilmiştir.

Tablo 3.6: sgRNA ifade kasetlerinin pYLCRISPR vektörüne klonlanmasında kullanılan primer setleri.

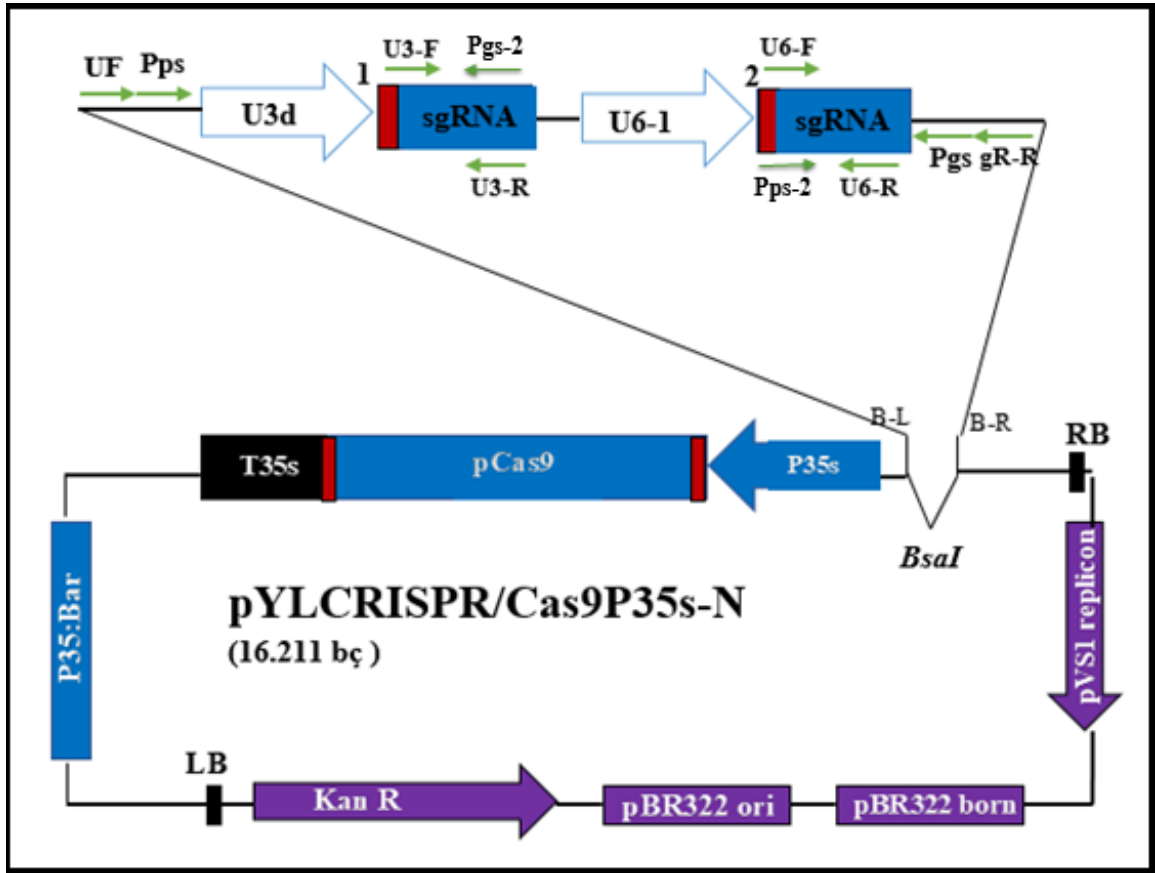
Gen	Oligonükleotid dizisi 5' → 3'
Bölge spesifik primerler	
U-F	CTCCGTTTTACCTGTGGAATCG-3
gR-R	CGGAGGAAAATTCCATCCAC
İç içe geçmiş pozisyona uygun primerler	
Pps	TTCAGAGGTCTCTACCGACTAGTATGGAATCGGCAGCAAAGG
Pgs	AGCGTGGGTCTCGCTCGACGCGTATCCATCCACTCCAAGCTC
Pps-2	TTCAGAGGTCTCTCTGACACTGGAATCGGCAGCAAAGG
Pgs-2	AGCGTGGGTCTCGTCAGGGTCCATCCACTCCAAGCTC

Nested PCR olarak da adlandırılan 2. PCR reaksiyonu tam sgRNA ekspresyon kasetleri elde etmek için iç içe geçmiş pozisyona özgü primerler kullanılarak

gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, toplam reaksiyon hacmi 50 µL olacak şekilde reaksiyon 10 µL Füzyon Polimeraz tamponu, her bir kaset için hazırlanan 1. PCR reaksiyon ürününden 1'er µL, evrensel her bir iç içe geçmiş primerler için 2 µM, 1 µL Füzyon Polimeraz enzimi, 2.5 mM dNTP karışımı ve deonize H₂O içermektedir. Reaksiyon ısıtılmış bir kapak kullanılmadan bir termal döngü cihazında 95 °C' da 10 saniye, 58 °C' da 15 saniye, 68 °C' da 20 saniye olacak şekilde 22 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezi kullanılarak görüntülenmiş ve PCR ürünleri saflaştırma kiti kullanılarak saflaştırılmıştır.

- Golden Gate Klonlama

Nested PCR sonucunda ayrı ayrı oluşturulan sgRNA ekspresyon kasetleri, golden gate reaksiyonu ile pYLCRISPR/Cas9P35S-N plazmitinin içine yerleştirilmiştir (Şekil 3.6). Bu amaçla; toplam reaksiyon hacmi 15 µL olacak şekilde, 10 × CutSmart tamponu, 100 ng pYLCRISPR/Cas9P35S-N plazmit DNAsı, 20 ng sgRNA kasetleri karışımı (2. PCR ürünleri), 10 U *BsaI*-HF, 40 U T4 DNA ligaz, 10 × NEB T4 DNA ligaz tamponu and deionize H₂O içeren bir enzim kesim/ligasyon reaksiyonu hazırlanmıştır. Enzim kesim/ligasyon reaksiyonu ısıtılmış bir kapak kullanılmadan bir termal döngü cihazında 37 °C' da 10 dakika, 10 °C' da 5 dakika, 20 °C' da 5 dakika olacak şekilde 3 döngü ve 37 °C' da 3 dakika ve 10 °C' da 5 dakika, 20 °C' da 5 dakika olacak şekilde 3 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. Çoklu sgRNA ekspresyon kaseti içeren ligasyon ürünü direk olarak *E. coli* DH5α kompeten hücrelerine transforme etmek için kullanılmıştır.



Şekil 3.6: Golden gate klonlama.

3.2.1.4. pYLCRISPR Vektörünün *E. coli DH5α* Hücrelerine Transformasyonu

E. coli DH5α hücrelerin kompetan hale getirilmesi ve transformasyonu için Chung ve arkadaşları (1989) tarafından geliştirilen yöntem kullanılmıştır. *E. coli* DH5α hücreleri 5 mL LB'de 37 °C, 200 rpm'de gece boyunca büyütülmüştür. Ertesi gün bu kültürden alınan 100 µL'lik hücreler 10 mL'lik taze LB'ye aktarılmış ve 37 °C, 200 rpm'de optik yoğunluğu 600 nm dalga boyunda 0.4'e gelene kadar inkübe edilmiştir. Kültür istenilen OD'ye gelince +4 °C' da 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür. Elde edilen pellet hacminin %10'u kadar TSS eklenerek pellet buz içinde nazikçe çözüldükten sonra hücreler kullanılmak üzere -80 °C' da saklanmıştır.

Transformasyon için hazırlanan 100 µL *E. coli* DH5α kompetan hücrelerine 4 µL ligasyon reaksiyonu ilave edilmiştir. Pozitif kontrol olarak halkasal plazmit, negatif kontrol için de restriksiyon enzimleri ile kesilmiş doğrusal plazmit kompetan hücrelere

eklenmiştir. Karışım buzda 30 dakika inkübe edildikten sonra 42 °C' da 45 saniye ısı şoku uygulanmış, hemen ardından buzda 2 dakika bekletilmiştir. 900 µL SOC medyum eklendikten sonra hücreler 37 °C' da, 200 rpm'de 1,5 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda hücreler 100 µg/mL kanamisin içeren LB-agar besiyerine yayılmış ve 37 °C' da gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün olası rekombinant kolonilerden alınan örnekler numaralandırılarak, 100 µg/mL kanamisin LB katı besiyerine ekilmiştir.

Transformasyon sonucunda oluşan olası rekombinant hücrelerin doğruluğu koloni PCR ile ispatlanmıştır. Seçilen her bir koloniden steril kürdan yardımıyla alınan örnekler toplam reaksiyon hacmi 10 µL olacak şekilde; 5X Taq polimeraz tamponu, 0.4U Taq polimeraz enzimi, 2 Mm dNTP karışımı, 0.15 µM primer içeren PCR karışımına katılarak kalıp DNA olarak kullanılmıştır. Primer olarak birleştirilmiş tam sgRNA kasetinin varlığını belirleyen primer çiftleri kullanılmıştır (Pps FP ve U3 RP, U3 FP ve U6 RP, U6 FP ve U6 RP) (Şekil 4.3). PCR reaksiyonu, denatürasyon için 98 °C'da 10 saniye, primer bağlanması için 55 °C' da 30 saniye ve polimerasyon için 72 °C' da 2 dakika olacak şekilde 30 döngüde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon, başlangıçta 98 °C' da 2 dakika denatürasyon ile başlatılmış ve 72 °C' da 5 dakika ek bir polimerasyon ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonucu elde edilen PCR ürünleri % 0.8'lik agaroz jele yüklenmiş moleküler DNA belirteci ile karşılaştırılarak görüntülenmiştir.

Rekombinant koloniler ortamında geliştirildikten sonra her birinden Sambrook ve arkadaşlarının (1989) geliştirdiği yöntem uygun olarak plazmit izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen rekombinant plazmitlerin analizi, uygun restriksiyon endonükleazlar ile kesilerek yapılmıştır. Kesim reaksiyonları sona erdikten sonra reaksiyon karışımı % 0.8' lik agaroz jele moleküler DNA belirteci varlığında yüklenip kesinleştirilmiştir.

3.2.1.5. *Agrobacterium EHA105* Hücrelerine Transformasyonu

Hedef dizileri içeren pYLCRISPR/Cas9 plazmitleri, Lee ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem kullanılarak (2018) *A. tumefaciens EHA105* kompetan hücrelerine transforme edilmiştir. *A. tumefaciens EHA105* kompetan hücreleri öncesinde Chung ve arkadaşları (1989) tarafından önerilen yöntem uygun olarak hazırlanmıştır.

Transformasyon için buzda soğutulmuş 1.5 mL'lik ependorf tüplere yeni hazırlanan 100 µL *A. tumefaciens EHA105* kompetan hücreleri konulmuş ve kompetan hücrelere 0.5-1.0 µg plazmid DNA eklenip tüpe hafifçe karıştırılmıştır. Tüpler sıvı nitrojen içinde dondurulup daha sonra 37 °C su banyosunda 5 dk inkübe edilmiştir. Her tüpe 1 mL LB eklenip ve 30 °C' da 200 rpm'de yaklaşık 2 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra tüpler 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip ve 1 mL LB süpernatant atılarak elde edilen pelet kalan 100 µL LB ile süspanse edilmiştir. Çözülmüş her bir örnekteki hücrelerin tamamı plazmite ait seçici antibiyotik (100 mg/L kanamisin) ve *EHA105* suşuna ait seçici antibiyotik (30 mg/L gentamisin) ilave edilmiş LB agar petrilere yayılmış ve iki gün 30°C' da inkübe edilmiştir.

Daha sonra pozitif koloniler gen spesifik U3F ve U6R (Şekil 4.3) kullanılarak koloni PCR ile seçilmiştir. Seçilen her bir koloniden steril kürdan yardımıyla alınan örnekler, toplam reaksiyon hacmi 20 µL olacak şekilde; 10 X Taq polimeraz tamponu, 2.5 U Taq polimeraz enzimi, 2 Mm dNTP karışımı, 25 mM MgCl₂, 10 µM ileri ve geri primer içeren PCR karışımına katılarak kalıp DNA olarak kullanılmıştır. PCR reaksiyonu, denatürasyon için 94°C' da 30 saniye, primer bağlanması için 50°C' da 30 saniye ve polimerasyon için 72 °C'da 1 dakika olacak şekilde 25 döngüde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon, başlangıçta 95 °C' da 3 dakika. denatürasyon ile başlatılmış ve 72 °C' da 5 dakika ek bir polimerasyon ile gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen PCR ürünleri % 0.8'lik agaroz jel elektroforezi kullanılarak görüntülenmiştir. Genin varlığı doğrulanan kolonilere ait gliserol stoklar hazırlanmış ve bütün transformasyonunda kullanılmak üzere -80 °C'da saklanmıştır.

3.2.2. Bakteriyel Nitroredüktaz Geni Aktarılmış Transgenik Tütün Bitkilerinin Eldesi ve Transformasyonu

Transgenik olduğu saptanan tütün (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) tohumlarının (TR3-4) yüzey sterilizasyonu yapılarak çimlenme için yarı katı Murashige ve Skoog (MS, 1962) besi ortamına aktarılmıştır. Tohumların yüzey sterilizasyonu, 20 dakika boyunca %30 sodyum hipoklorit uygulanarak yapılmıştır. Üç kez steril dH₂O ile durulanan steril tohumlar, 1 gece karanlıkta 4 °C' da tutulduktan sonra çimlenme için yarı katı MS besi ortamına aktarılmıştır. Çalışma boyunca bitkiler, 24±2 °C' da 300 µmol/m²s floresan ışığında, ve 16/8 sa (aydınlık/karanlık)

foto periyodu koşullarına sahip bitki büyütme odasında kültürlenmiştir. Transformasyon denemelerinde eksplant kaynağı olarak, nitroredüktaz geni (*Ssnp-NtrB*) aktarılmış transgenik T2 TR3-4 tohumlarından gelişen ve MS besisi ortamında düzenli olarak 3 haftada bir alt kültürlenerek mikroçoğaltımı yapılan tütünlerin yaprakları kullanılmıştır.

İnfiltrasyon bazlı bir yöntemden [Sparkes *et al.*, 2019] uyarlanan yaprak diski transformasyon metoduna uygun olarak transgenik olduğu bilinen tütün bitkilerine *Agrobacterium* aracılığıyla aktarım gerçekleştirilmiştir.

pYLCRISPR/Cas9 plazmidini taşıyan *Agrobacterium* gece boyu kanamisin (100 mg/L) ve gentamisin (30 mg/L) içeren LB sıvı besiyerinde 28 °C’ da 240 rpm’ de çalkalanarak inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin büyüme miktarları spektrofotometre ile 600 nm’de ölçümü yapılarak takip edilmiştir. Kültürün OD600 değeri 0.6’ ya ulaştığında bakteriler oda sıcaklığında 3000 g’de 10 dakika santrifüj uygulanarak çöktürülmüştür. Santrifüj sonrası örneklerin süpernatantları uzaklaştırılıp kalan bakteri peleti 25 mL infiltrasyon ortamı ile çözülmüştür. Orta damarları ve kenarları MS içinde kesilen yaprakların yüzeyindeki mumsu tabaka bir bistüri ucu ile hafifçe uzaklaştırıldıktan sonra yapraklar 1-2 cm²’lik parçalara (yaprak diski) bölünmüştür.

Kontrol grubu eksplantlar bakteri içermeyen infiltrasyon ortamı ile; transforme edilen eksplantlar ise *Agrobacterium* içeren infiltrasyon ortamı ile hafifçe çalkalanarak, 20 dakika oda sıcaklığında muamele edilmiştir. Steril filtre kâğıdı ile sıvı fazlası alınan eksplantlar, yüzeyleri besiyerine degecek şekilde 1 mg/L BAP (benzilaminopürin), 0.1 mg/L NAA (naftelenasetik asit) içeren yarı katı MS ortamına aktarılıp 3 gün karanlıkta tutulmuştur. Üç gün sonrasında yaprak diskleri, *Agrobacterium* eliminasyonunu ve dolaylı organogenezi sağlayacak olan seçici yarı-katı MS besiyerine (1 mg/L BAP, 0.1 mg/L NAA ve 100 mg/L kanamisin) alınmıştır.

Belirlenen kanamisin konsantrasyonu, Bakhsh ve arkadaşlarının yaptığı çalışma (2018) referans alınarak, mutant bitkilerin yaşayabileceği ancak kontrol tütün bitkileri için toksik olan 100 µg/ml kanamisin konsantrasyonu olarak belirlenmiştir [Bakhsh *et al.*, 2018].

Transformasyon sonrası seçici MS besiyerinde kültürlenmiş yaprak disklerinden elde edilen mikrogövdeler, kalluslara tutunma bölgelerinden kesilerek, köklendirilmek üzere bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen, seçici MS besiyerine (100 mg/L kanamisin) aktarılmıştır. Büyüyen ve köklenen mutant aday gövdeler 2 kez daha

seçici MS besiyerinde alt kültürlendikten sonra, moleküler analizler için kesilen yaprak rnekleri -80 °C’ da muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Transgenik Mutant Adayı Tütün Bitkilerinin Moleküler Analizi

Aday bitkilerde *NtCP6* geninin mutasyona uğradığını doğrulamak amacıyla -80 °C’da korunan yapraklardan izole edilen genomik DNA (gDNA) kullanılarak toplam reaksiyon hacmi 40 µL olacak şekilde; 10X Taq polimeraz tamponu, 0.4U Taq polimeraz enzimi, 2 Mm dNTP karışımı, 2.5Mm Mg⁺², 10 µM primer ve ddH₂O içermektedir. Primer olarak hedef sgRNA ları içerecek şekilde tasarlanan sistein proteaz gen spesifik NtCP-F (5’ TCTCCACCTTATCTTCCGCTTC 3’)ve NtCP-R (5’CCCCACACTATTGACATGAGAGT 3’) primer çiftleri kullanılmıştır. PCR reaksiyonu, denatürasyon için 94 °C’da 30 saniye, primer bağlanması için 55 °C’ da 30 saniye ve polimerasyon için 72 °C’ da 1 dakika olacak şekilde 30 döngüde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon, başlangıçta 98 °C’ da 2 dakika denatürasyon ile başlatılmış ve 72 °C’ da 5 dakika ek bir polimerasyon ile gerçekleştirilmiştir. Yapraklardan DNA izole etmek üzere kullanılan tüm solüsyonlar, cam ve plastik malzemeler DNaz’ların etkisini uzaklaştırmak amacıyla 121 °C’ da 20 dakika otoklavlanmıştır.

Transgenik mutant adayı bitki yapraklarından gDNA izolasyonu, optimize edilmiş Dooley ve Dooley in setil trimetil-amonyum bromid (CTAB) protokolü (1987) kullanılarak yapılmıştır. Bu protokol doğrultusunda öncelikle -80 °C’ dan alınan 50 mg yapraklar homojenize edilmiş ve örnekler önceden soğutulmuş ependorf tüplerde toplanmıştır. Örneklerin zerine 600’ er µL önceden ısıtılmış ekstraksiyon tamponu [100mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, %0.2 (v/v) β-merkaptetanol ve %2 (w/v) CTAB] ve 5 mg PVP eklenip hafifçe karıştırılmıştır. Daha sonra karışım 60°C’da sirkülasyonlu su banyosunda 20 dakika inkübe edilip 5 dakika da oda sıcaklığında bekletilmiştir. Karışımlara 600 µL kloroform/oktanol (24:1, v/v) eklenmiş, 20-25 defa hızlı bir şekilde karıştırılmıştır ve sonrasında 13000 rpm’de 5 dakika santrifüj uygulanmıştır. En stteki DNA fazı yeni bir tüpe alınıp üzerine 1/2 hacimde 5 M NaCl ilave edilip iyice karışması sağlanmıştır. Akabinde eşit hacimde önceden soğutulmuş EtOH eklenmiştir. Tüpler birkaç kez nazikçe alt üst edildikten sonra -20°C’ da 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Dondurucudan alınan örnekler

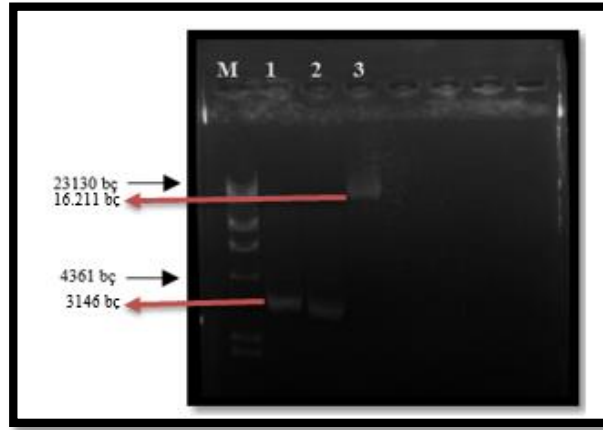
4°C, 3000 rpm’ de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantlar uzaklaştırılmış ve DNA peletleri, 1 mL %76 (v/v) etanol ile yıkanmıştır. DNA peletleri kurutulmak üzere oda sıcaklığında bir süre inkübasyona bırakıldıktan sonra steril su ile çözülmüştür. DNA’nın saflaştırılması için DNA üzerine son derişimi 0.1 µg/mL olan Rnase A eklenip 37°C’ da 45 dakika inkübe edilmiştir. Ardından son derişimi 0.01 mg/mL Proteinaz K ilave edilip 37°C’da 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından, eşit hacimde kloroform/oktanol ilave edilip 20-25 defa hızlıca çalkalanmış ve 13000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan üst faz yeni bir tüpe aktarılmış ve üzerine 1/2 hacimde 5 M NaCl ilave edilip karıştırıldıktan sonra eşit hacimde soğuk %95 lik EtOH eklenmiştir. DNA iplikçikleri belirlenene kadar +4 °C’da inkübasyona bırakılmıştır. Örnekler 13000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra ve süpernatant uzaklaştırılıp ve DNA peletleri %76 (v/v) etanol ile yıkanmıştır. Etanol uzaklaştırıldıktan, peletin kuruması ve fazla olan etanolün uzaklaştırılması için tüpler 37 °C de inkübe edilmiştir. Elde edilen DNA peletleri 50 µL steril suda çözüldükten sonra kullanılmak üzere -20°C’ da saklanmıştır.

Mutant aday transgenik bitkilerden izole edilen gDNA’ların derişimi Nanodrop cihazı ile ölçülmüş ve DNA’ların kalitesi agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir. Aday bitkilerde *NtCP6* geninin mutasyona uğradığını doğrulamak amacıyla yukarıda belirtilen reaksiyon karışım ve koşullarda PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen PCR ürünü dizileme yapılmak üzere BMLabosis firmasına gönderilecektir.

4. SONUÇLAR

4.1. *E. coli*'den Plazmit İzolasyonu

Klonlama deneylerinde kullanılacak olan pYLsgRNA-AtU3d/LacZ kaset plazmiti, pYLsgRNA-AtU6-1 kaset plazmiti ve pYLsgRNA/Cas9P plazmiti bu plazmitleri içeren *E. coli DH5α* hücrelerinden izole edilmiştir. Elde edilen plazmitler uygun restriksiyon endonükleazlar ile kesilerek doğrusal hale getirilmiş ve agaroz jel elektroforezde görüntülenmiştir. Elde edilen görüntülere göre plazmitler beklenen boyutlarda gözlemlenmiştir; pYLsgRNA-AtU3d/LacZ ve pYLsgRNA-AtU6-1 kaset plazmitleri 3146 bp uzunluğunda, pYLsgRNA/Cas9P plazmiti 16.211 bp uzunluğundadır.



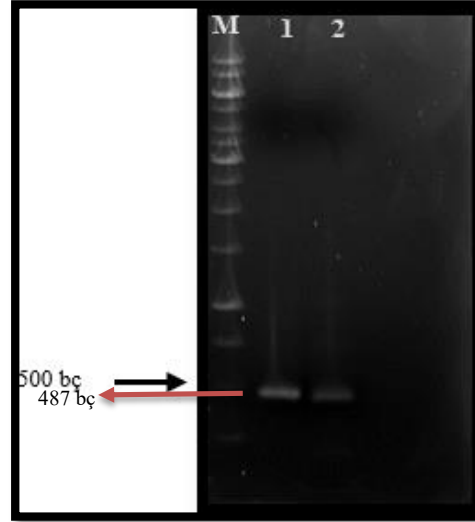
Şekil 4.1: İzole edilen plazmitlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü. **M** Lamda DNA/Hind3 DNA belirteci. **1** *Eco*R1 ile kesilen pYLsgRNA-AtU3d/LacZ kaset plazmiti, **2**. *Bam*H1 ile kesilen pYLsgRNA-AtU6-1 kaset plazmiti, **3**. *Bam*H1 ile kesilen pYLsgRNA/Cas9P plazmiti.

4.2. SgRNA İfade Kasetlerinin pYLCRISPR Vektörüne Klonlanması

Hedef sekansları içeren sgRNA ekspresyon kasetleri oluşturmak amacıyla seçilen U3d ve/veya U6-1 promotörleri sgRNA plazmit vektörleri *Bsa*I ile kesilmiş ve çift zincirli hedef adaptörleri ile birleştirilmiştir. Ayrı ayrı oluşturulan sgRNA ekspresyon kasetleri birbirini takip eden iki PCR reaksiyonu ile elde edilmiştir. Birinci PCR'da hedef-sgRNA ekspresyon kasetleri kalıp olarak kullanılarak sırasıyla 1.kaset

için pYLsgRNA-AtU3d/LacZ kaset plazmitine özgü evrensel U-F ileri primer ve hedefe özgü U3-R geri primerler ve U3-F ileri primer ile gR-R geri primer çiftleri, 2. kaset için hedef özgü U6-F ileri ve pYLsgRNA-AtU6-1 kaset plazmitine özgü evrensel gR-R geri primerler ve UF ileri primer ile U6-1R geri primer çiftleri kullanılarak hedef içeren kasetler çoğaltılmıştır.

Ayrı ayrı elde edilen 1. PCR ürünleri iç içe geçmiş pozisyona özgü primerler (Pps/Pgs-2 ve Pps-2/Pgs) kullanılarak sgRNA ekspresyon kaseti oluşturmak için kullanılmıştır. Elde edilen nested PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir. Elde edilen jel görüntüsüne göre hedef bölge içeren sgRNA plasmid kasetleri beklenen büyüklükte, AtU3d-sgRNA için ~486 bp uzunluğunda ve AtU6-1-sgRNA için ~487 bp uzunluğunda gözlemlenmiştir (Şekil 4.3).



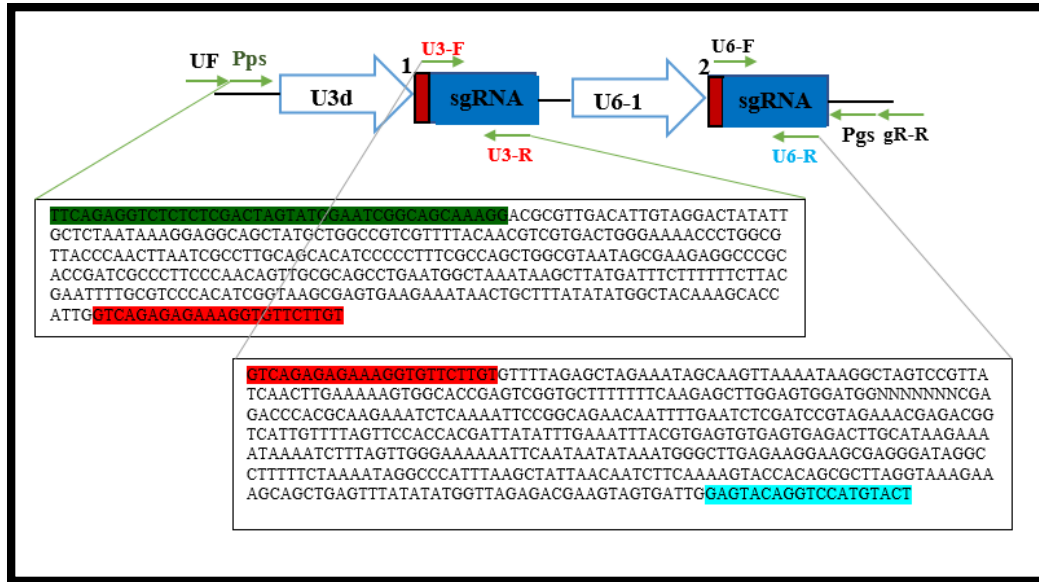
Şekil 4.2: Nested PCR sonucu.

1. PCR ürünleri **M.** 1 kb moleküler DNA belirteci,
1. pYLsgRNA-AtU3d/LacZ kaseti, 2. pYLsgRNA-AtU6-1kaseti.

Doğrulan PCR ürünleri saflaştırma kiti kullanılarak saflaştırılmış ve golden gate klonlama için kullanılmıştır. Bu amaçla 2. PCR ile elde edilen sgRNA ekspresyon kasetleri *Bsa*I-kesim/ligasyon reaksiyonu ile pYLCRISPR/Cas9P35S-N plazmitinin içine yerleştirilmiştir. Elde edilen ligasyon ürünü çoğaltılmak üzere *E. Coli* DH5α hücrelerine trasforme edilmiştir.

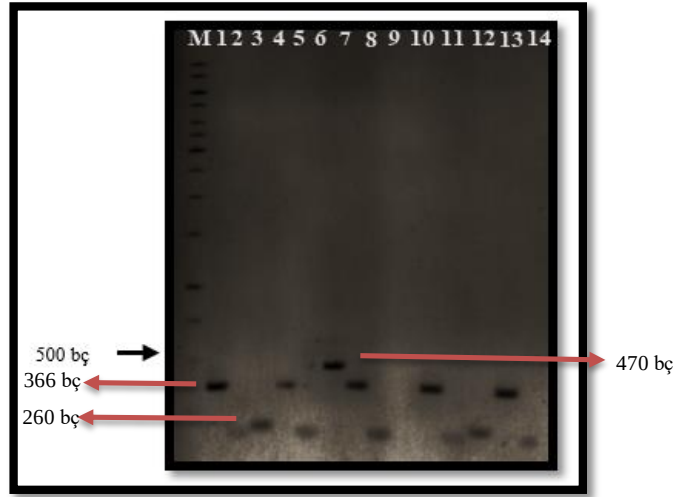
4.3. pYLCRISPR Vektörünün *E. Coli* DH5α Hücrelerine Transformasyonu

Transformasyon sonucunda olası 30 koloni gözlemlenmiştir. Olası rekombinant kolonilerden 5 tanesi seçilerek doğruluğu koloni PCR ile ispatlanmıştır. Bu amaçla her bir koloni için iki ayrı kasetin golden gate klonlama plazmitinin içindeki kasetlerin varlığını belirleyecek primer çiftleri seçilmiştir. Bu primer çiftlerinden Pps F ve U3-R primer çifti 366 bp uzunluğunda olması beklenen 1. Kaset, U6-F ve U6-R primer çifti 260 bp uzunluğunda olması beklenen 2. Kaset ve U3-F ve U6-R primer çifti 470 bp uzunluğunda olması beklenen 1. Ve 2. Kaseti içeren tam kasetin varlığını belirlemek için kullanılmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Ekspresyon kasetleri koloni PCR primer haritası.

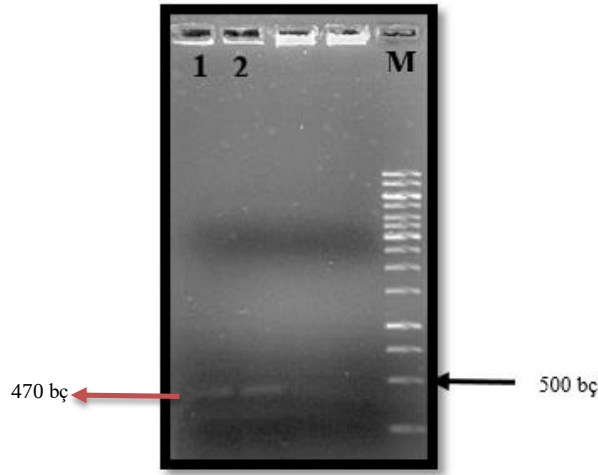
Elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir (Şekil 4.4). Elde edilen jel görüntülerine göre seçilen 5 koloniden (Şekil 4.4 kuyu no 1-3 1. Koloni, kuyu no 4-5 2. Koloni, kuyu no 6-8 3. Koloni, kuyu no 9-11 4. Koloni ve kuyu no 12-14 5. Koloni) 3 farklı primer çifti ile yapılan koloni PCR sonucuna göre rekombinant olduğu belirlenen 3.koloni (Şekil 4.4 kuyu no 6 (~470 bp uzunluğunda) kuyu no 7 (~366 bp uzunluğunda) kuyu no 8 (~260 bp uzunluğunda)) pozitif sonuç vermiştir. Bundan sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere bu rekombinant koloniden plazmit izolasyonu yapılmıştır.



Şekil 4.4: *E. Coli* DH5 α transformantlarının koloni PCR sonucu. **M.** 1 kb moleküler DNA belirteci **2., 6., 9. Ve 14.** U3-F/U6-R primer çifti ile, **1.,4.,7.,10. Ve 13.** Pps/ U3-R primer çifti ile, **3.,5.,8.,11. Ve 12.** U6-F/ U6-R primer çifti ile.

4.4. *Agrobacterium EHA105* Hücrelerine Transformasyonu

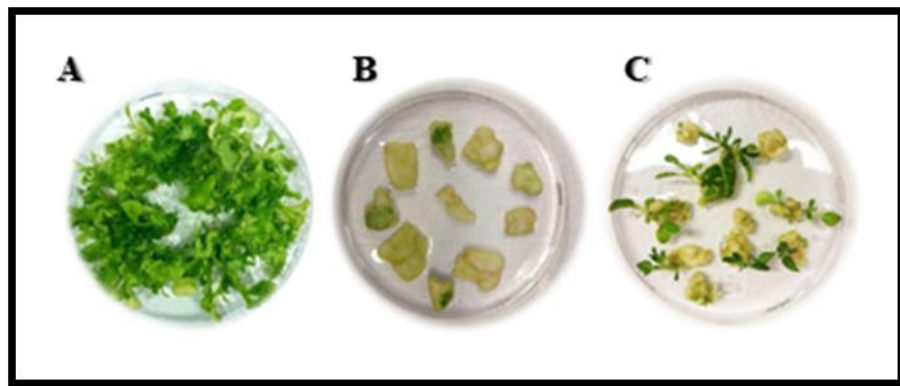
E. coli'den elde edilen rekombinant plazmit, tütün bitkisine aktarılmak üzere *Agrobacterium EHA105* hücrelerine transforme edilmiştir. Transformasyon sonrası inkübasyona bırakılan Petrilerde gözlenen olası rekombinant kolonilerden 2 tanesi seçilerek, tam sgRNA kasetini içeren plazmitin varlığını belirlemek amacıyla U3-F ve U6-R kullanılarak koloni PCR yapılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir (Şekil 4.5). Jel görüntüsüne göre seçilen her iki koloni PCR ürününün tam kasetin varlığını gösteren ~470 bp uzunluğunda olduğu belirlenmiştir. Rekombinant olduğu doğrulanan koloniler büyütülerek tütün bitkisine aktarılmak üzere saklanmıştır.



Şekil 4.5: *Agrobacterium* EHA105 transformatlarının koloni PCR sonucu. **M.** 1 Kb moleküler DNA belirteci, **1.** Birinci koloni ve U3FP/U6RP ile yapılan PCR ve **2.** İkinci koloni ve U3FP/U6RP ile yapılan PCR.

4.5. Bakteriyel Nitroredüktaz Geni Aktarılmış Transgenik Tütün Bitkilerinin Rekombinant *Agrobacterium* ile Transformasyonu

Tam sgRNA casetini içeren pYLCRISPR/Cas9 plazmiti taşıyan *Agrobacterium* EHA105 infiltrasyon bazlı transformasyon ile nitroredüktaz geni aktarılmış transgenik tütün yapraklarına aktarılmıştır. Transforme edilen bitki yaprakları seçici yarı katı MS besiyerinde *in vitro* koşullarda 4 hafta kültürlenmiş ve transgenik tütün yaprak disklerinde mikro gövde oluşumları gözlenmiştir (Şekil 4.6).

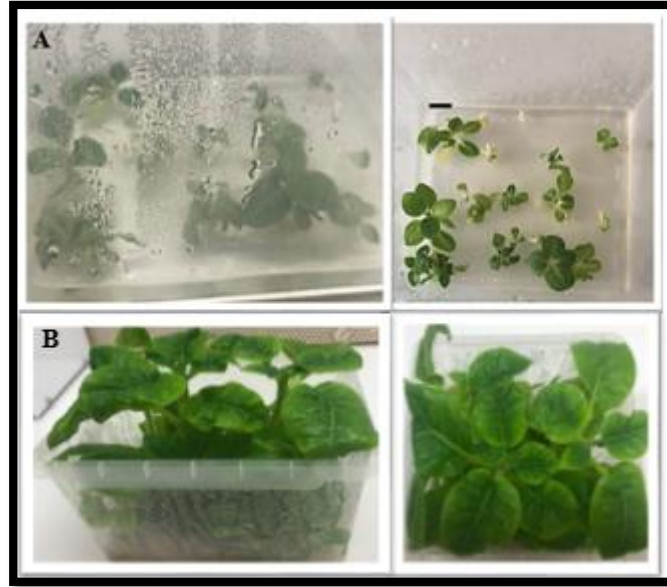


Şekil 4.6: Transgenik tütün yaprak disklerinin transformasyon sonrası *in vitro* koşullarda 4 hafta kültürlenmesi sonucunda oluşan rejenerasyon. A) Pozitif kontrol. *Agrobacterium* ile muamele edilmemiş yarı katı MS besiyerinde kültürlenmiş transgenik tütün yaprakları. B) Negatif kontrol. *Agrobacterium* ile muamele edilmemiş seçici yarı katı MS besiyerinde kültürlenmiş transgenik tütün yaprakları. C)

Agrobacterium ile muamele edilmiş seçici yarı katı MS besiyerinde kültürlenен transgenik tütün yaprakları.

Oluşan mikrogövdeler, kalluslara tutunma bölgelerinden kesilerek, köklendirilmek üzere bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen, seçici MS besiyerine (100 mg/L kanamisin) aktarılmış ve *in vitro* koşullarda 60 gün boyunca kültürlenmiştir. Bu süre sonunda gelişen bitkiler fotoğraflanıp fizyolojik ölçümleri yapılmıştır (Şekil 4.7).

Ölçümler sonucu *NtCP6* geni susturulmuş mutant tütün bitkilerinin kontrol ile karşılaştırıldığında gövde oluşumu gözlenirken kök gelişimi gözlenmemiştir. Bununla birlikte mutant bitkilerde gövde gelişiminin yaklaşık 7 kat daha az olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.1).



Şekil 4.7: Transgenik tütün mikro gövdelerinin *in vitro* koşullarda 60 gün kültürü sonrası elde edilen proliferasyon. A) *NtCP6* geni susturulmuş mutant tütün bitkisi. B) Kontrol. *NtCP6* geni susturulmamış transgenik tütün bitkisi. Bar:1 cm

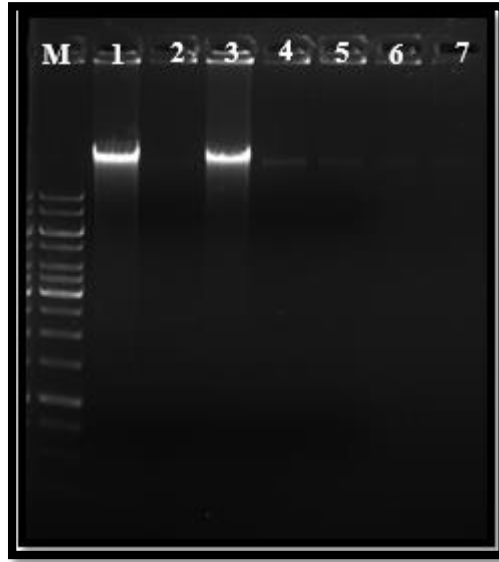
Tablo 4.1: Transgenik tütün mikro gövdelerinin *in vitro* koşullarda 60 gün kültürü sonrası elde edilen proliferasyon.

	*Kök Uzunluğu (cm)	*Gövde Uzunluğu (cm)	Kök/Gövde
Kontrol	5.4±	11.8±	0.46±
Mutant tütün bitkisi	0	1.7±	0

*15 adet tütün bitkisinin ortalama değerleri alınmıştır.

4.6 Transgenik Mutant Adayı Tütün Bitkilerinin Moleküler Analizi

Büyüyen ve köklenen mutant adayı gövdelerden elde edilen yapraklardan genomik DNA (gDNA) izolasyonu CTAB metodu ile yapılmıştır. Elde edilen gDNA'ların derişimi Nanodrop cihazı ile ölçülmüş ve DNA'ların kalitesi agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir (Şekil 4.8).

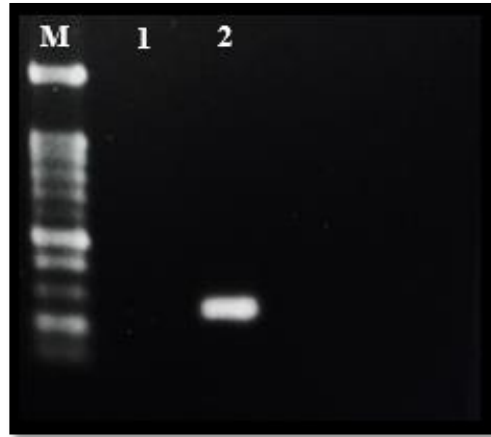


Şekil 4.8: gDNA izolasyonu.

M. 1 Kb moleküler DNA belirteci, **1., 2., 3., 4., 5., 6.** Ve **7.** Mutant adayı bitkilerden elde edilen gDNA örnekleri.

7 ayrı aday bitkiden elde edilen gDNA dan kalitesi yüksek olan 2 tanesi seçilmiş ve moleküler analizler için kullanılmak üzere -20 °C'da saklanmıştır. Aday bitkilerde

NtCP6 geninin mutasyona uğradığını doğrulamak amacıyla yapraklardan izole edilen gDNA kalıp olarak kullanılmış ve hedef sgRNA ları içerecek şekilde tasarlanan sistein proteaz gen spesifik NtCP-F/NtCP-R primer çiftleri kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmalarına rağmen PCR reaksiyonu başarılı olamamıştır. Çok kez yapılan denemelerin ardından daha önce transgenik tütün bitkilerinin moleküler analizi çalışmalarında kullanılan primer çiftleri kontrol grubu olarak kullanılıp yapılan son PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir (Şekil 4.9). Sonuçlar karşılaştırıldığında NtCP-F/NtCP-R primer çiftlerinin sentezlenme aşamasında hatalı olduğunu göstermektedir. Primer çiftlerinin yeniden sipariş verilmesi ve deneylerin tekrarlanması gerekmektedir. Covid-19 pandemi süreci her şeyde olduğu gibi laboratuvar çalışmalarını da olumsuz etkilemiştir. Bu nedenle daha ileri ki çalışmalarda devam etmek üzere yüksek lisans tezi bu aşamada bitirilmiştir.



Şekil 4.9: PCR sonucu.

M. 1 Kb moleküler DNA belirteci, **1.** NtCP-F/NtCP-R primer çiftleri ile **2.** Kontrol primer çiftleri ile.

5. TARTIŞMA

Endüstriyel ve askeri faaliyetler sonucu çevreye yayılan nitroaromatik kirleticiler, doğayı ve birçok canlıyı tehdit etmektedir. Özellikle, plastikler, çözücüler ve ilaçların sentezinde nitroaromatik kirleticiler yan ürün ve/veya artık olarak üretilmektedir. İlaveten, askeri amaçlı kullanılan 2,4,6-trinitrotoluen (TNT) gibi çeşitli nitroaromatiklerin bileşenleri, kullanıldıkları alanlardaki topraktan kanalizasyona karışarak yüzey ve yeraltı sularına geçebilmektedir. Patlayıcıların temizlenmesinde kullanılan fiziksel ve kimyasal yöntemler masraflı olup, kirleticinin ortadan tamamen kaldırılması açısından yetersiz kalmaktadır. Son yıllarda, mikroorganizmaların dönüştürücü (biyotransformasyon) yeteneklerinin kullanılmaktadır. Bu mikroorganizmalar, sahip oldukları nitroredüktaz enzimleri ile nitroaromatik bileşenleri sınırlı miktarda indirgeyebilmekte ve oluşan ürünleri azot kaynağı olarak kullanmaktadır. Bu şekilde *in situ* biyoremediasyon, kirli toprağın *ex situ* yöntemlerde olduğu gibi toplanıp taşınmasını gerektirmediği için masrafı göreceli olarak düşük, daha hızlı ve kolay bir yöntemdir. Ancak, çevresel etkenlerle sürekli ve doğrudan ilişkili olması bu yöntemi iklimsel yönden sınırlamaktadır.

Günümüzde diğer bir yöntem olarak bitkilerin kullanıldığı fitoremediasyon, yüksek konsantrasyonlarda ve geniş alanlardaki kirleticinin temizlenmesi ve toplum tarafından kabul görmesi ile öne çıkmaktadır. Fakat, tek başına bitkilerin kullanımı, bitkilerin nitroaromatikleri bünyelerine aldığı ve bu kirleticilerin toksik etkilerini tolere edemediği durumlarda süreklilik gösterememektedir. Ayrıca nitroaromatiklerin ayrışmadan ya da kısmi ayrışarak bitki dokularında birikmesi, kirleticilerin yeniden besin zincirine karışma riskini doğurmaktadır. Bu durum, bakterilerin biyodegradasyon özelliğini taşıyan transgenik bitkilerin geliştirilmesi fikrini doğurmuştur. Bakteriyel genleri eksprese eden bitkilerin fitoremediasyon kapasitesi, yaban tipi bitkilerden daha yüksektir. Çünkü transgenik hatlar, nitroaromatiklerin toksik etkilerine karşı daha dirençlidirler, daha yüksek miktarda patlayıcıyı bünyelerine alabilir ve daha etkin şekilde degrade edebilirler. Rekombinant protein üretimi için başta tütün olmak üzere bitkiler ekonomik bir alternatif olarak ortaya çıkmasına rağmen, düşük rekombinant protein birikimi bitkilerin ticari bir protein üretim platformu olarak kullanımını sınırlamaktadır. Düşük üretimin sebeplerin en başında, proteazlar tarafından yabancı olarak algılanan rekombinant proteinlerin yıkımı gelmektedir.

Diğer tüm organizmalarda olduğu gibi, bitkiler de fonksiyonel olmayan proteinleri amino asitlere indirgemek için proteazlar kullanır. Ancak proteazlar bu temizlik fonksiyonundan daha fazlasına sahiptir. Proteazlar aynı zamanda kilit düzenleyicilerdir. Diğer proteinlerin kaderini geri dönüşümsüz bir şekilde belirleyerek, gelişimsel ve çevresel ipuçlarına yanıt olarak farklı süreçleri düzenlerler. Bu uygulama, protein spesifikliğini korur ve aktivitelerini hem zaman hem de mekanda sıkı bir şekilde düzenler [van der Horn, 2008]. Bitkilerde gerçekleşen proteoliz, çeşitli hücresel bölmelerde birçok enzimi ve çok yönlü proteolitik yolları içeren karmaşık bir süreçtir. Bir enzim grubu olan sistein proteazları da bu süreçte önemli bir rol oynamaktadır.

Papain benzeri sistein proteazları virüs [Rawlings et al., 1992], bakteriler [Kantyka et al., 2011], maya [Enkel and Wolf, 1993], protozoa, bitkiler ve hayvanlar (Rawlings et al., 2010; Novinec and Lenarcic, 2013] dahil olmak üzere birçok organizmada bulunur. Sırasıyla Arabidopsis, kauçuk, manyok, hint, kavak ve asmada tanımlanmış olan papain benzeri sistein proteaz genleri 31, 43, 40, 26, 40 ve 24 multigenik büyük bir familyaya aittir [Martinez and Diaz, 2008; Zou et al., 2017b]. Birçok proste yer alan bitki papain benzeri sistein proteazlarının büyük çoğunluğu son yıllarda, karakterize edilmiştir. Bu enzim grubunun büyüme ve gelişme, tohum çimlenmesi, anter gelişimi, yaşlanma, bağışıklık ve stres yanıtlarında ve programlanmış hücre ölümünde yer aldığı gösterilmiştir [Liu et al., 2018].

Literatürde farklı bitkilerde sistein proteazların tanımlanması ve karakterizasyonuna yönelik çalışmalar bulunmakla birlikte [Outchkourov et al., 2003, Kim et al., 2008, Duwadi et al., 2015] yabancı proteinlerin tütün bitkisinde üretilmesi ve biriktirilmesi hakkında bu proteazların özellikle güncel CRISPR/Cas9 tekniği kullanılarak susturulmasına yönelik çalışmalar bulunmamaktadır. Bu bağlamda bu tez kapsamında, transgenik tütünde nitroredüktaz proteinin birikimine engel olduğu düşünülen *NtCP6* geninin (GeneID:107781604) güncel gen düzeltme tekniklerinden CRISPR/Cas9 yönetimi kullanılarak susturulması amaçlanmıştır.

Tez kapsamında nitroredüktaz geni (*Ssap-NtrB*) aktarılmış tütün bitki tohumları (T2 TR3-4) kullanılmıştır. Tütün bitkisinde *NtCP6* geninin ilk ekzonunda iki bölgeyi hedef alan sgRNA kasetleri oluşturulmuştur. Oluşturulan bu kasetlerle enzim kesim/ligasyon reaksiyonu ile ekspresyon kasetleri elde edilmiş ve golden gate klonlama ile pYLCRISPR/Cas9 plazmitine aktarılmıştır. pYLCRISPR/Cas9 plazmiti

aktarılan *Agrobacterium* transgenik tütün bitkilerine infiltrasyon yöntemiyle transforme edilmiştir.

Transformasyon denemelerinde eksplant kaynağı olarak, nitroredüktaz geni (*Ssnp-NtrB*) aktarılmış transgenik T2 TR3-4 tohumlarından gelişen ve MS besisi ortamında düzenli olarak 3 haftada bir alt kültürlenerek mikroçoğaltımı yapılan tütün yaprakları kullanılmıştır. Transforme edilen tütün yaprakları seçici yarı katı MS besiyerinde *in vitro* koşullarda 4 hafta kültürlenmiş ve transgenik tütün yaprak disklerinde mikro gövde oluşumları gözlenmiştir.

Rejenerasyonu gerçekleştiren *NtCP6* gen ekspresyonu susturulması hedeflenen aday mutant tütün bitkilerde kök gelişimi gerçekleşmemiş ve gövde gelişiminin kontrole kıyasla yaklaşık 7 kat daha az olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6). Bitki papain benzeri sistein proteazların bitki büyüme ve gelişmesinde önemli bir rol aldığı göz önünde bulundurulursa transgenik tütünde *NtCP6* gen ekspresyon susturulmasının gerçekleşmiş olma ihtimali baskın gelmektedir.

2020 yılının başlarında yayılmaya başlayan ve yılın ikinci çeyreğinde ciddi bir şekilde kayıpların yaşanmasına neden olan Covid-19 virüs salgını, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de bilimsel çalışmaların aksamasına sebebiyet vermiştir. Oluşan mutant adayı transgenik mikro gövdelerin ve kontrol transgenik tütün bitkilerinin çoğaltılması için düzenli olarak yapılması gereken alt kültürme işlemi pandemi sürecinde yapılamamıştır. Bu nedenle kısıtlı sayıda bitki materyali sonraki çalışmalarda kullanılabilmek üzere saklanabilmektedir.

Transgenik mutant adayı bitki yapraklarından gDNA izolasyonu, optimize edilmiş Dooley ve Dooley in setil trimetil-amonyum bromid (CTAB) protokolü (1987) kullanılarak yapılmıştır. Aday bitkilerde *NtCP6* geninin mutasyona uğradığını doğrulamak amacıyla izole edilen genomik DNA (gDNA) kullanılarak PCR yapılmıştır. Şekil 4.9'daki PCR sonucu dikkate alındığında; hedef sgRNA ları içerecek şekilde tasarlanan sistein proteaz gen spesifik NtCP-F/NtCP-R primer çiftlerinin sentezinde sorun olduğu gözlenmektedir. PCR optimizasyonu için çok kez yapılan deneylerde izole edilen gDNA tüketilmiştir. Pandemi sürecinden dolayı kısıtlı miktarda saklanabilen bitki materyalleri, deneylerde kullanılmış ve bu nedenle moleküler analiz aşaması tamamlanamamıştır. Covid-19 pandemi sürecinin bitmesinin ardından çalışmalara devam edilip, moleküler analiz kısımlarının tamamlanması sağlanacaktır.

CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak *NtCP6* gen ekspresyonu susturulmasında hedef dışı mutasyonun oluşması ve bu mutasyonun da bitki proliferasyonunu ciddi oranda etkilemiş olması da muhtemeldir. Bu nedenle aday mutant bitkilerden *NtCP6* gen bölgesi PCR ile çoğaltılarak T7 endonükleaz kesimi ile mutasyon varlığı tespit edilmeli ve olası mutasyon içeren gen fragmentleri dizilenerek gen dizisinde değişiklik olup olmadığı saptanacaktır.

Gözlenen fizyolojik farklılıklar sistein proteazın bitki büyüme ve gelişiminde son derece önemli bir rol aldığını ve özellikle kök gelişiminde etkin olduğunu ispatlamaktadır.

Bu sonuçlardan yola çıkılarak daha ileri çalışmalarla *NtCP6* ortolog genlerinin bitkilerde rejenerasyon ve proliferasyon esnasında kök oluşumu, yaprak ve gövde gelişimi üzerinde etkisinin moleküler analizleri ve papain benzeri sistein proteazların bitkilerde rol aldığı biyolojik süreçlerin daha iyi aydınlatılması sağlanabilir.

KAYNAKLAR

- Alagoz Y., Gurkok T., Zhang B., Unver, T., (2016), “Manipulating The Biosynthesis Of Bioactive Compound Alkaloids For Next-Generation Metabolic Engineering In Opium Poppy Using Crispr-Cas 9 Genome Editing Technology”, *Scientific Reports*, 6, 30910.
- Alvarez M.L., Topal, E., Martin F., Cardineau G.A., (2010), “Higher Accumulation Of F1-V Fusion Recombinant Protein In Plants After Induction Of Protein Body Formation”, *Plant Mol. Biol.* 72, 75–89.
- Anlezark G.M., Melton R.G., Sherwood R.F., Coles B., Friedlos F., Knox R.J., (1992). “The bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2, 4-dinitrobenzamide (CB1954)—I purification and properties of a nitroreductase enzyme from *Escherichia coli*—a potential enzyme for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT)”, *Biochemical pharmacology*, 44(12), 2289-2295.
- Bakhsh A., Tolga D., Hussain T., Demirel U., Aasim M., Çalışkan M. E., (2018), “Development of transgenic tobacco lines with pyramided insect resistant genes”, *Turkish Journal of Biology*, 42-2, 174.
- Baltes N. J., Gil-Humanes J., Cermak T., Atkins P. A., Voytas D. F., (2014), “Dna Replicons For Plant Genome Engineering”, *The Plant Cell*, 26-1, 151-163.
- Bao A., Chen H., Chen L., Chen S., Hao Q., Guo W., et al., (2019), “CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of GmSPL9 genes alters plant architecture in soybean.”, *BMC plant biology*, 19(1), 1-12.
- Barany I., Berenguer E., Solis M. T., Perez-Perez Y., Santamaria M. E., Crespo J. L., et al., (2018), “Autophagy Is Activated And Involved In Cell Death With Participation Of Cathepsins During Stress-Induced Microspore Embryo Genesis In Barley”, *J.Exp.Bot.* 69, 1387–1402.
- Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D. A., Horvath P., (2007), “Crispr Provides Acquired Resistance Against Viruses In Prokaryotes”, *Science*, 315(5819), 1709-1712.
- Barta A., Sommergruber K., Thompson D., Hartmuth K., Matzke M.A., Matzke A.J., (1986), “The Expression Of An Opalinesynthase—Human Growth Hormone Chimaeric Gene In Transformed Tobacco And Sunflower Callus Tissue”, *Plant Mol Biol* 6-347–357.
- Baur A., Resk, R., Gorr G., (2005), “Enhanced Recovery Of A Secreted Recombinant Human Growth Factor Using Stabilizing Additives And By Coexpression Of Human Serum Albumin In The Moss *Physcomitrella Patens*”, *Plant Biotechnol. J.* 3, 331–340.

Beers E.P, Jones A.M, Dickerman A.W., (2004), “The S8 Serine, C1A Cysteine And A1aspartic Protease Families In Arabidopsis”, *Phytochemistry* 65-43–58.

Belhaj K., Chaparro-Garcia A., Kamoun S., Andnekraso V., (2013), “Plant Genome Editing Made Easy: Targeted Mutagenesis In Model And Crop Plants Using The CRISPR/Cas System”, *Plant Methods*, 9, 39.

Bernoux M., Timmers T., Jauneau A., Briere C. de Wit P. J., Marco Y., et al., (2008), “RD19, An Arabidopsis Cysteine Protease Required For RRS1-R-Mediated Resistance, Is Relocalized To The Nucleus By The Ralstonia Solanacearum Popp2 Effector”, *Plantcell*20,2252–2264.

Beyene G., Foyer C.H., Kunert K.J., (2006), “Two New Cysteine Proteinases With Specific Expression Patterns In Mature And Senescent Tobacco (*Nicotiana Tabacum* L.) Leaves”, *J. Exp. Bot.* 57 1431–1443.

Bhalerao R., Keskitalo J., Sterky F., Erlandsson R., Bjorkbacka H., Birve S. J., et al., (2003), “Gene Expression In Autumn Leaves”, *Plant Physiol.* 131, 430–442.

Brouns S.J., Jore M.M., Lundgren M., Westra E.R., Slijkhuis R.J., Snijders A.P., Dickman, M. J., Cao, H. X., Wang, W., Le, H. T. & Vu, G. T., (2016), “The Power Of Crispr-Cas9-Induced Genome Editing To Speed Up Plant Breeding”, *International Journal Of Genomics*.

Bryant C., Deluca M., (1991), "Purification And Characterization Of An Oxygen-Insensitive NAD(P)H Nitroreductase From *Enterobacter Cloacae*", *J. Biol. Chem.*, 266, 4119–25.

Bryant D., Mccalla D., Leeksmma M., Laneuville P., (1981), “Type I Nitroreductases Of *Escherichia Coli*”, *Canadian Journal Of Microbiology*, 27, 81-86.

Cai Y. M., Yu J., Ge Y., Mironov A., Gallois P., (2018), “Two Proteases With Caspase-3-Like Activity, Cathepsin B And Proteasome, Antagonistically Control ER-Stress-Induced Programmed Cell Death In Arabidopsis”, *New Phytol.* 218, 1143–1155.

Cambra I., Martinez M., Dader B., Gonzalez-Melendi P., Gandullo J., Santamaria M.E.,et al., (2012), “A Cathepsinf-Like Peptidase Involved In Barley Grain Protein Mobilization, Hvpap-1, Is Modulated By Its Own Propeptide and By cystatins”, *J.Exp.Bot.*63,4615–4629.

Chandrasekaran J., Brumin M., Wolf D., Leibman D., Klap C., Pearlsman M., Sherman A., Arazi T., Agal-On A., (2016), “Development Of Broad Virus Resistance In Non-Transgenic Cucumber Using Crispr/Cas9 Technology”, *Molecular Plant Pathology*, 17(7), 1140-1153.

Chang Y. M., Luthe D. S., Davis F. M., Williams W. P., (2000), “Influence Of Whorl Region From Resistant And Susceptible Corn Genotypes On Fall Armyworm (*Lepidoptera: Noctuidae*) Growth And Development”, *J. Econ. Entomol.* 93, 477–483.

Chen H.J., Tsai Y.J., Shen C.Y., Tsai T.N., Huang G.J., Lin, Y.H., (2013), “Ectopic Expression Of Sweet Potato Cysteine Protease SPCP3 Alters Phenotypic Traits And Enhances Drought Stress Sensitivity In Transgenic Arabidopsis Plants”, *J.Plantgrowthregul.*32,108–121.

Chen G. H., Huang L. T., Yap M. N., Lee R. H., Huang Y. J., Cheng, M. C., et al., (2002), “Molecular Characterization Of A Senescence-Associated Gene Encoding Cysteine Proteinase And Its Gene Expression During Leaf Senescence In Sweet Potato”, *Plant Cell Physiol.* 43.

Chen H.J., Su C.T., Lin C.H., Huang G.J., Lin Y.H., (2010), “Expression Of Sweet Potato Cysteine Protease SPCP2 Altered Developmental Characteristics And Stress Responses In Transgenic Arabidopsis Plants”, *J.Plantphysiol.*167,838–847.

Clark B., Boopathy R., (2007), “Evaluation Of Bioremediation Methods For The Treatment Of Soil Contaminated With Explosives In Louisiana Army Ammunition Plant, Minden, Louisiana”, *Journal Of Hazardous Materials*, 143, 643-8.

Collonnier C., Epert A., Mara K., Maclot F., Guyon-Debast A., Charlot F., White C., Schaefer D.G., Nogué F., (2017), “Crispr-Cas9-Mediated Efficient Directed Mutagenesis And Rad51-Dependent And Rad51-Independent Gene Targeting In The Moss *Physcomitrella Patens*”, *Plant Biotechnology Journal*, 15(1), 122-131.

Cong L., Ran F. A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P. D., Wu X., Jiang W., Marraffini L., Zhang F., (2013), “Multiplex Genome Engineering Using Crispr/Cas Systems”, *Science*, 1231143.

Conley A.J., Zhu H., Lel C., Jevnikar A.M., Lee B.H., Brandle J.E., (2011), “Recombinant Protein Production In A Variety Of *Nicotiana* Hosts:A Comparative Analysis”, *Plant Biotechnology Journal* 9:434–444.

Conrad U., Fiedler U., (1998), “Compartment-Specific Accumulation Of Recombinant Immunoglobulins In Plant Cells: An Essential Tool For Antibody Production And Immuno Modulation Of Physiological Functions And Pathogen Activity”, *Plant Mol. Biol.* 38, 101–109.

Coulombe R., Grochulski P., Sivaraman J., Menard R., Mort J.S., Cygler M., (1996), “Structure Of Human Procathepsin L Reveals The Molecular Basis Of Inhibition By The Prosegment.”, *EMBO J.* 15, 5492–5503.

Curtin S. J., Voytas D.F., Stupar, R.M., (2012), “Genome Engineering Of Crops With Designer Nucleases”, *Plant Genome*, 5, 42–50.

Çelik A., ve Yetiş G., (2012), “An Unusually Cold Active Nitroreductase For Prodrug Activations”, *Bioorganic And Medicinal Chemistry*, 20, 3540-50.

Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert, M. R., Vogel J., Charpentier E., (2011), “Crisprna Maturation By Trans-Encoded Small Rna And Host Factor Rnase”, *Nature*, 471(7340), 602.

Diaz-Mendoza M., Velasco-Arroyo B., Gonzalez-Melendi P., Martinez M., Diaz I., (2014), “C1A Cysteine Protease-Cystatin Interactions In Leaf Senescence”, *J.Exp.Bot.* 65,3825–3833.

Ding Y.L., Lyu Y.C., Leong M.K., (2017), “In Silico Prediction Of The Mutagenicity Of Nitroaromatic Compounds Using A Novel Two-Qsar Approach”, *Toxicology In Vitro*, 40, 102-114.

Dixon M.S., Golstein C., Thomas C.M., van der Biezen E.A., Jones J. D., (2000), “Genetic Complexity Of Pathogen Perception By Plants: The Example Of Rcr3, A Tomato Gene Required Specifically By Cf-2”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97,8807–8814.

Doty S.L., Shang Q.T., Wilson, A.M., Tangen, J., Westergreen, A., Newman, L. A., Strand, S.E., Gordon, M.P., (2000), “Enhanced Metabolism Of Halogenated Hydrocarbons In Transgenic Plants Containing Mammalian P450 2E1”, *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 97, 6287-91.

Duwadi K., Chen L., Menassa R., Dhaubhadel S., (2015), “Identification, Characterization And Down-Regulation Of Cysteine Protease Genes In Tobacco For Use In Recombinant Protein Production”, *Plos One* 10 E0130556.

Dyck M.K., Lacroix D., Pothier F., Sirard M.A., (2003), “Making Recombinant Proteins In Animals – Different Systems, Different Applications”, *Trends Biotechnol.* 21, 394–399.

Enenkel C., Wolf D.H., (1993), “BLH1 Codes For A Yeast Thiolamino peptidase, The Equivalent Of Mammalian Bleomycin Hydrolase”, *J. Biol. Chem.* 268, 7036– 7043.

EPA, (1995), “Contaminants And Remedial Options At Select Metals-Contaminated Sites”, EPA/540/R-95/512.

Fan D., Liu T., Li C., Jiao B., Li S., Hou Y., Luo K., (2015), “Efficient Crispr/Cas9-Mediated Targeted Mutagenesis In Populus In The First Generation”, *Scientific Reports*, 5, 12217.

Feng Z., Zhang B., Ding W., Liu X., Yang D.L., Wei P., Cao F., Zhu S., Zhang F., Mao, Y. & Zhu, J. K., (2013), “Efficient Genome Editing In Plants Using A CRISPR/Cas System”, *Cell Research*, 23(10), 1229.

Fichtner F., Urrea Castellanos R., Ülker B., (2014), “Precision Genetic Modifications: A New Era In Molecular Biology And Crop Improvement”, *Planta* 239, 921–939.

Fischer R., Schillberg S., Hellwig S., Twyman R.M., Drossard J., (2012), “GMP Issues For Recombinant Plant Derived Pharmaceutical Proteins”, *Biotechnology Advances* 30:434–439.

Fischer J., Becker C., Hillmer S., Horstmann C., Neubohn B., Schlereth A., et al., (2000), "The Families Of Papain- And Legumain-Like Cysteine Proteinases From Embryonic Axes And Cotyledons Of Vicia Seeds: Developmental Patterns, Intracellular Localization And Functions In Globulin Proteolysis", *Plant Mol. Biol.* 43,83–101.

Gao X., Li F., Li M., Kianinejad A.S., Dever J.K., Wheeler T.A., Li Z., He P., Shan, L., (2013), "Cotton Ghbkl Mediates Verticillium Wilt Resistance And Cell Death", *Journal Of Integrative Plant Biology*, 55(7), 586-596.

Garneau J. E., Dupuis M. È., Villion M., Romero D. A., Barrangou R., Boyaval P., Fremaux C., Horvath P., Magadán A.H., Moineau S., (2010), "The Crispr/Cas Bacterial Immune System Cleaves Bacteriophage And Plasmid Dna", *Nature*, 468(7320), 67.

Ge Y., Cai Y.M., Bonneau L., Rotari V., Danon A., Mckenzie E.A., Et al., (2016), "Inhibition Of Cathepsinb By Caspase-3 Inhibitors Blocks Programmed Cell Death In Arabidopsis", *Celldeath.Differ.* 23,1493–1501.

Gepstein S., Sabehi G., Carp M. J., Hajouj T., Nesher M. F., Yariv I., et al., (2003), "Large-Scale Identification Of Leaf Senescence-Associated Genes", *Plant J.* 36,629–642.

Gerngross T.U., (2004), "Advances In The Production Of Human Therapeutic Proteins In Yeasts And Filamentous Fungi", *Nat. Biotechnol.* 22, 1409–1414.

Gietl C., Schmid M., (2001), "Ricosomes: An Organelle For Developmentally Regulated Programmed Cell Death In Senescing Plant Tissues", *Naturwissenschaften* 88:49–58.

Gombert J., Etienne P., Ourry A., Le Dily F., (2006), "The Expression Patterns Of SAG12/Cab Genes Reveal The Spatial And Temporal Progression Of Leaf Senescence In Brassicanapasl. With sensitivity to the environment", *J.Exp. Bot.* 57,1949–1956.

Goulet C., Benchabane M., Anguenot R., Brunelle F., Khalf M., Michaud, D., (2010b), "A Companion Protease Inhibitor For The Protection Of Cytosol targeted Recombinant Proteins In Plants", *Plant Biotechnol. J.* 8, 142–154.

Goulet C., Khalf M., Sainsbury F., D'Aoust M.A., Michaud D., (2012), "A Protease Activity-Depleted Environment For Heterologous Proteins Migrating Towards the leaf cell apoplast", *Plantbiotechnol.J.* 10,83–94.

Grudkowska, M., Zagdanska, B., (2004), "Multifunctional Role Of Plant Cysteine Proteinases", *Actabiochim.Pol.* 51,609–624.

Guo Y.,Gan S.S., (2014), "Translational Researches On Leaf Senescence For Enhancing Plant Productivity And Quality", *J. Exp. Bot.* 65, 3901–3913.

Guo,Y., Cai, Z.S., (2004), “Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence”, *Plant Cell Environ.* 27,521–549.

Gutiérrez S.P., Saberianfar R., Kohalmi S.E., Menassa R., (2013), “Protein Bodyformation Instabletransgenic tobaccoexpressingelastin-Likepolypeptide And Hydrophobin Fusion Proteins”, *BMC Biotechnol.* 13-40.

Haft D.H., Selengut J., Mongodin E.F., Nelson K.E., (2005), “A Guild Of 45 Crispr-associated (Cas) Protein Families And Multiple Crispr/Cas Subtypes Exist In Prokaryotic Genomes”, *Plos Computational Biology*, 1(6), E60.

Häkkinen S.T., Raven N., Henquet M., Laukkanen M.L., Anderlei T., Pitkänen J.P., (2014), “Molecular Farming In Tobacco Hairy Roots By Triggering The Secretion Of A Pharmaceutical Antibody”, *Biotechnol. Bioeng.* 111, 336–346.

Hannink N., Rosser S.J., French C.E., Basran A., Murray J.A. H., Nicklin S., Bruce N.C., (2001), “Phytodetoxification Of TNT By Transgenic Plants Expressing A Bacterial Nitroreductase”, *Nature Biotechnology*, 19, 1168-72.

Hannink N., Subramanian N., Rosser S.J., Basran A., Murray J.A.H., Shanks J.V., (2000), “Enhanced Transformation Of TNT By Tobacco Plants Expressing A Bacterial Nitroreductase”, *International Journal Of Phytoremediation*, 9, 385-401.

Hehle V.K., Lombardi R., van Dolleweerd C.J., Paul M.J., Di Micco P., Morea V., Benvenuto E., Donini M., Ma J.K., (2015), “Site-Specific Proteolytic Degradation Of IgG Monoclonal Antibodies Expressed In Tobacco Plants”, *Plant Biotechnol. J.* 13

Hehle V.K., Paul M.J., Drake P.M., Ma J.K., van Dolleweerd C.J., (2011), “Antibody Degradation In Tobacco Plants: A Predominantly Apoplastic Process”, *BMC Biotechnol.* 11 128.

Horger A.C., van Der Hoorn R.A., (2013), “The Structural Basis Of Specific Protease-Inhibitor Interactions At The Plant-Pathogen Interface”, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23 842–850.

Hwang W. ., Fu Y., Reyon D., Maeder M.L., Kaini P., Sander J.D., Joung J.K., Peterson R.T., Yeh, J.R.J., (2013), “Heritable And Precise Zebrafish Genome Editing Using A Crispr-Cas System”, *Plos One*, 8(7), E68708.

Ilyas M., Horger A.C., Bozkurt T.O., van Den Burg H.A., Kaschani F., Kaiser M., et al., (2015), “Functional Divergence Of Two Secreted Immune Proteases Of Tomato”, *Curr. Biol.* 25, 2300–2306.

Jacobs T.B., Lafayette P.R., Schmitz R.J., Parrott W.A., (2015), “Targeted Genome Modifications In Soybean With Crispr/Cas9”, *Bmc Biotechnology*, 15(1), 16.

James E.A., Wang C., Wang Z., Reeves R., Shin J.H., Magnuson N. S., (2000), “Production And Characterization Of Biologically Active Human GM-CSF Secreted By Genetically Modified Plant Cells”, *Protein Expr. Purif.* 19, 131–138.

Jansen R., Embden J., Gaastra W., Schouls L., (2002), "Identification Of Genes That Are Associated With Dnarepeats In Prokaryotes", *Molecular Microbiology*, 43(6), 1565-1575.

Jiang G.L., (2013), "Molecular Markers And Marker-Assisted Breeding In Plants. In: Plant Breeding From Laboratories To Fields", Intech.

Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E., (2012), "A Programmable Dual-Rna-Guided Dna Endonuclease In Adaptive Bacterial Immunity", *Science*, 1225829.

Joensuu J.J., Conley A.J., Lienemann M., Brandle J.E., Linder M. B., Menassa R., (2010), "Hydrophobin Fusions For High-Level Transient Protein Expression And Purification In *Nicotiana Benthamiana*", *Plant Physiol.* 152, 622–633.

Kantyka T., Shaw L. N., Potempa J., (2011), "Papain-Like Proteases Of *Staphylococcus Aureus*", *Adv. Exp. Med. Biol.* 712, 1–14.

Kaschani F., Shabab M., Bozkurt T., Shindo T., Schornack S., Gu C., et al., (2010), "An Effector-Targeted Protease Contributes To Defense Against *Phytophthora Infestans* And Is Under Diversifying Selection In Natural Hosts", *Plantphysiol.* 154, 1794–1804.

Kempema L.A., Cui X., Holzer F.M., Walling L.L., (2007), "Arabidopsis Transcriptome Changes In Response To Phloem-Feeding Silver Leaf White fly Nymphs, Similarities And Distinctions In Responses To Aphids", *Plantphysiol.* 143, 849–865.

Kim N.S., Kim T.G., Kim O.H., Ko E.M., Jang Y.S., Jung E.S., et al., (2008a), "Improvement of recombinant hgm-Csf production by suppression of cysteine Proteinase Gene Expression Using RNA Interference In A Transgenic Rice Culture", *Plant Mol. Biol.* 68, 263–275.

Kim T. G., Lee H. J., Jang Y. S., Shin Y. J., Kwon T. H., Yang, M. S., (2008b), "Co-Expression Of Proteinase Inhibitor Enhances Recombinant Human Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor Production In Transgenic Rice Cell Suspension Culture", *Protein Expr. Purif.* 61, 117–121.

Kirk D.D., Webb S.R., (2005), "The Next 15 Years: Taking Plant-Made Vaccines Beyond Proof Of Concept", *Immunol. Cell Biol.* 83, 248–256.

Kobori T., Sasaki H., Lee W. C., Zenno S., Saigo K., Murphy M. E., Tanokura, M., (2001), "Structure And Site-Directed Mutagenesis Of A Flavoprotein From *Escherichia Coli* That Reduces Nitrocompounds Alteration Of Pyridine Nucleotide Binding By A Single Amino Acid Substitution", *Journal Of Biological Chemistry*, 276(4), 2816-2823.

Koehler S. M., Ho T. H., (1990), "Hormonal Regulation, Processing, And Secretion Of Cysteine Proteinases In Barley Aleurone Layers", *Plantcell* 2, 769–783.

Koizumi M., Yamaguchi-Shinozaki K., Tsuji H., Shinozaki K., (1993), “Structure And Expression Of Two Genes That Encode Distinct Drought-Inducible Cysteine Proteinases In *Arabidopsis Thaliana*”, *Gene* 129, 175–182.

Kolotilin I., Topp E., Cox E., Devriendt B., Conrad U., Joensuu J., (2014), “Plant-Based Solutions For Veterinary Immuno Therapeutics And Prophylactics”, *Vetres* 45-375.

Komarnytsky S., Borisjuk N., Yakoby N., Garvey A., Raskin, I., (2006), “Cosecretion Of Protease Inhibitor Stabilizes Antibodies Produced By Plant Roots”, *Plant Physiol.* 141, 1185–1193.

Kruger J., Thomas C.M., Golstein C., Dixon M.S., Smoker M., Tang S., et al., (2002), “A Tomato Cysteine Protease Required For Cf-2-Dependent Disease Resistance And Suppression Of Autone Crosis”, *Science* 296, 744–747.

Kunert K. J., van Wyk S.G., Cullis C.A., Vorster B.J., Foyer C.H., (2015), “Potential Use Of Phytocystatins In Crop Improvement, With A Particular Focus On Legumes”, *J.Exp.Bot.* 66, 3559–3570.

Kurumata M., Takahashi M., Sakamoto A., Ramos J.L., Nepovim A., Vanek T., (2005), “Tolerance To, And Uptake And Degradation Of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) Are Enhanced By The Expression Of A Bacterial Nitroreductase Gene In *Arabidopsis Thaliana*”, *Zeitschrift Für Naturforschung*, 50, 272-8.

Lacount W., An G.H., Lee J.M., (1997), “The Effect Of Polyvinylpyrrolidone (PVP) On The Heavy Chain Monoclonal Antibody Production From Plant Suspension Cultures”, *Biotechnol. Lett.* 19, 93–96.

Larson M.H., Gilbert L.A., Wang X., Lim W.A., Weissman J.S., Qi L.S., (2013), “Crispr Interference (Crispri) For Sequence-Specific Control Of Gene Expression”, *Nature Protocols*, 8(11), 2180.

Lawrenson T., Shorinola O., Stacey N., Li C., Østergaard L., Patron N., Uauy, C., Harwood W., (2015), “Induction Of Targeted, Heritable Mutations In Barley And Brassica Oleracea Using Rna-Guided Cas9 Nuclease”, *Genome Biology*, 16(1), 258.

Lee S., Jung K.H., An G., Chung Y.Y., (2004), “Isolation And Characterization Of A Rice Cysteine Protease Gene, *Oscp1*, Using t-Dna gene-Trap system”, *Plant molecularbiology* 54-755–765.

Lewis T.A., Newcombe D.A., Crawford R.L., (2004), “Bioremediation of soils contaminated with explosives”, *Journal of Environmental Management*, 70(4), 291-307.

Li J., Norville J., Aach J., McCormack M., Zhang D., Bush J., Church G., Sheen J., (2013), “Multiplex And Homologous Recombination-Mediated Genome Editing In *Arabidopsis* And *Nicotiana Benthamiana* Using Guide Rna And Cas9”, *Nat Biotechnol.* 31-688–91.

Li C., Unver T., Zhang, B., (2017), “A High-Efficiency Crispr/Cas9 System For Targeted Mutagenesis In Cotton (*Gossypium Hirsutum* L.)”, *Scientific Reports*, 7, 43902.

Liang Z., Zhang K., Chen K., Gao C., (2014), “Targeted Mutagenesis In *Zea Mays* Using Talens And The Crispr/Cas System”, *Journal Of Genetics And Genomics*, 41(2), 63-68.

Lienard D., Tran Dinh O., Van Oort E., Van Overtvelt L., Bonneau C., Wambre E., Bardor M., Cosette P., Didier-Laurent A., De Borne F.D., Delon R., Van Ree R., Moingeon P., Faye L. And Gomord V., (2007), “Suspension-Cultured BY-2 Tobacco Cells Produce And Mature Immunologically Active House Dust Mite Allergens”, *Plant Biotechnol. J.* 5, 93–108.

Linthorst H.M., Van der Does C., Brederode F., Bol J., (1993). “Circadian Expression And Induction By Wounding Of Tobacco Genes For Cysteine Proteinase”, *Plant molecularbiology* 21-685–694.

Liu H., Hu M., Wang Q., Cheng L., Zhang Z., (2018), “Role of papain-like cysteine proteases in plant development”, *Frontiers in plant science*, 9, 1717.

Liu L., Zhou Y., Szczerba M.W., Li X., Lin Y., (2010), “Identification and application of a rice senescence-associated promoter”, *Plant Physiology*, 153(3), 1239-1249.

Louis J., Basu S., Varsani S., Castano-Duque L., Jiang V., Williams W.P., et al., (2015), “Ethylene Contributes To Maize Insect Resistance1-Mediated Maize Defense Against The Phloem Sap-Sucking Corn Leaf Aphid. *Plant Physiol.* 169, 313–324.

Lozano-Torres J.L., Wilbers R.H., Gawronski P., Boshoven J.C., Finkersstomczak A., Cordewener J.H., et al., (2012), “Dual Disease Resistance Mediated By The Immune Receptor Cf-2 In Tomato Requires A Common Virulence Target Of A Fungus And A Nematode”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 10119–10124.

Lu H., Chandrasekar B., Oeljeklaus J., Misas-Villamil J.C., Wang Z., Shindo T., Bogyo M., Kaiser M., . Van Der Hoorn R.A., (2015), “Subfamily-Specific Fluorescent Probes For Cysteine Proteases Display Dynamic Protease Activities During Seed Germination”, *Plant Physiol.* 168 1462–1475.

Ma J.K., Drake P.M., Christou P., (2003), “The Production Of Recombinant Pharmaceutical Proteins In Plants”, *Nat. Rev. Genet.* 4, 794–805.

Ma J.K.C., Barros E., Bock R., Christou P., Dale P.J., Dix P.J., Fischer R., Irwin J., Mahoney R., Pezzotti M., Schillberg S., Sparrow P., Stoger E., Twyman R.M. And Pharma E.U.F., (2005a), “Molecular Farming For New Drugs And Vaccines – Current Perspectives On The Production Of Pharmaceuticals In Transgenic Plants.”, *EMBO Rep.* 6, 593–599.

Ma J.K.C., Hiatt A., Hain M., Vine N.D., Wang F., Stabila P., Van Dolleweerd C., Mostov K., Lherner T., (1995), “Generation And Assembly Of Secretory Antibodies In Plants”, *Science*, 268, 716– 719.

Makarova K. S., Wolf Y. I., Alkhnbashi O. S., Costa F., Shah S. A., Saunders S. J., et al., (2015), “An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems”, *Nature Reviews Microbiology*, 13(11), 722-736.

Malabadi R.B., Chalannavar R.K., Meti N.T., Gani R.S., Vijayakumar S., Mulgund S.S., Masti S., Chougale R., Odhav B., Sowmyashree K., Supriya S., Nityasree B.R., Divakar M.S., (2016), “Insulin Plant, *Costus Speciosus*: Ethnobotany And Pharmacological Updates”, *Int J Curr Res Biosci Plant Biol* 3-151–161.

Mandal M. K., Ahvari H., Schillberg S., Schiermeyer A., (2016), “Tackling unwanted proteolysis in plant production hosts used for molecular farming”, *Frontiers in plant science*, 7, 267.

Mandal M. K., Fischer R., Schillberg S., Schiermeyer A., (2014), “Inhibition Of Protease Activity By Antisense RNA Improves Recombinant Protein Production In *Nicotiana Tabacum* Cv Bright Yellow 2 (BY-2) Suspension Cells”, *Biotechnol. J.* 9, 1065–1073.

Marraffini L. A., Sontheimer E. J., (2008), “CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA”, *Science*, 322(5909), 1843-1845.

Martinez M., Diaz I., (2008), “The Origin And Evolution Of Plant Cystatins And Their Target Cysteine Proteinases Indicate A Complex Functional Relationship”, *Bmcevol.Biol.* 8-198.

McCalla D.R., Kaiser C., Green M.H.L., (1978), “Genetics of nitrofurazone resistance in *Escherichia coli*”, *Journal of Bacteriology*, 133(1), 10-16.

Michno J. M., Wang X., Liu J., Curtin S. J., Kono T. J., Stupar R. M., (2015), “CRISPR/Cas Mutagenesis Of Soybean And *Medicago Truncatula* Using A New Web-Tool And A Modified Cas9 Enzyme”, *Gm Crops & Food*, 6(4), 43-252.

Miki D., Zhang W., Zeng W., Feng Z., Zhu J. K., (2018), “CRISPR/Cas9-mediated gene targeting in *Arabidopsis* using sequential transformation”, *Nature communications*, 9(1), 1-9.

Mikkonen A., Porali I., Cercos M., Ho T.H., (1996), “A Major Cysteine Proteinase, EPB, In Germinating Barley Seeds: Structure Of Two Intronless Genes And Regulation Of Expression”, *Plant Mol. Biol.* 31, 239–254.

Misas-Villamil J. C., van Der Hoorn R. A., Doehlemann G., (2016), “Papain like Cysteine Proteases As Hubs In Plant Immunity”, *New Phytol.* 212, 902–907.

Mojica F. J., Montoliu L., (2016), “On The Origin Of Crispr-Cas Technology: From Prokaryotes To Mammals”, *Trends In Microbiology*, 24(10), 811-820.

Mojica, F.J., García-Martínez, J., Soria, E., (2005), “Intervening Sequences Of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive From Foreign Genetic Elements”, *Journal Of Molecular Evolution*, 60(2), 174-182.

Moon H. S., Nifong J. M., Nicholson J. S., Heineman A., Lion K., Van Der Hoeven R., Hayes A. J., Lewis R. S., (2009), “Microsatellite-Based Analysis Of Tobacco (*Nicotiana Tabacum* L.) Genetic Resources”, *Crop Sci.*, 49, 2149–2159.

Muynck B., De Navarre C., Nizet Y., Stadlmann J., Boutry M., (2009), “Different Subcellular Localization And Glycosylation For A Functional Antibody Expressed in *Nicotiana Tabacum* Plants and suspension cells”, *Transgenic Res.* 18, 467–482.

Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones Jdg, Kamoun S., (2013), “Targeted Mutagenesis In The Model Plant *Nicotiana Benthiana* Using Cas9 Rnaguided Endonuclease”, *Nat Biotechnol.* 31-691–3.

Niemer M., Mehofer U., Verdianz M., Porodko A., Schahs P., Kracher D., Lenarcic B., Novinec M., Mach L., (2016), “*Nicotiana Benthiana* Cathepsin B Displays Distinct Enzymatic Features Which Differ From Its Human Relative And Aleurain-Like Protease”, *Biochimie* 122 119–125.

Nishino S.F., Paoli G. C., Spain, J. C., (2000), “Aerobic degradation of dinitrotoluenes and pathway for bacterial degradation of 2, 6-dinitrotoluene”, *Applied and environmental microbiology*, 66(5), 2139-2147.

Nishino S.F., Jim C., (2004), “Catabolism of nitroaromatic compounds *Pseudomonas*”, *Springer*, 575-608.

Nivinskas H., Koder R. L., Anusevicius Z., Sarlauskas J., Miller A. F., Cenas, N., (2000), “Two-Electron Reduction Of Nitroaromatic Compounds By *Enterobacter Cloacae* NAD(P)H Nitroreductase: Description Of Quantitative Structure-Activity Relationships”, *Acta Biochimica Polonica*, 47(4), 941-9.

Novinec M., And Lenarcic B., (2013), “Papain-Like Peptidases: Structure, Function, And Evolution”, *Biomol. Concepts* 4, 287–308.

Outchkourov N. S., Rogelj B., Strukelj B., Jongsma M. A., (2003), “Expression Of Sea Anemone Equistatin In Potato. Effects Of Plant Proteases On Heterologous Protein Production”, *Plant Physiol.* 133, 379–390.

Padda R.S., Wang C., Hughes J.B., Kutty R., Bennett G.N., (2003), “Mutagenicity of nitroaromatic degradation compounds”, *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 22(10), 2293-2297.

Paireder M., Mehofer U., Tholen S., Porodko A., Schahs P., Maresch D., Biniossek M.L., Van Der Hoorn R.A., Lenarcic B., Novinec M., Schilling O., Mach L., (2016),

“The Death Enzyme CP14 Is A Unique Papain-Like Cysteine Proteinase With A Pronounced S2 Subsite Selectivity”, *Arch. Biochem. Biophys.* 603 110–117.

Panz K., Miksch K., (2012), “Phytoremediation Of Explosives (TNT, RDX, HMX) By Wild-Type And Transgenic Plants”, *Journal Of Environmental Management*, 113, 85-92.

Pechan T., Cohen A., Williams W.P., Luthe, D.S., (2002), “Insect Feeding Mobilizes A Unique Plant Defense Protease That Disrupts The Peritrophic Matrix Of caterpillars”, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 99,13319–13323.

Pechan T., Ye L., Chang Y., Mitra A., Lin L., Davis F.M., et al., (2000), “A unique 33-Kd Cysteine Proteinase Accumulates In Response To Larval Feeding In Maize Genotypes Resistant To Fall Armyworm And Other Lepidoptera”, *Plant Cell* 12, 1031–1040.

Pennington J.C., Brannon J.M., (2002), "Environmental Fate Of Explosives", *Thermochimica Acta*, 384 (1-2), 163-172.

Peres C.M., Agathos S.N., (2000) “Biodegradation Of Nitroaromatic Pollutants: From Pathways To Remediation”, *Biotechnology Annual Review*, 197-220.

Pillay P., Kibido T., Plessis M., Vyver C., Beyene G., Vorster B.J., (2012), “Use Of Transgenic Oryzacystatin-I-Expressing Plants Enhances Recombinant Protein Production”, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168, 1608–1620.

Pillay P., Kunert K.J., Van Wyk S., Makgopa M.E., Cullis C.A., Vorster B.J., (2016), “Agroinfiltration Contributes To VP1 Recombinant Protein Degradation”, *Bioengineering* 7 459–477.

Purohit V., Basu A.K., (2000), “Mutagenicity Of Nitroaromatic Compounds”, *Chem Res Toxicol*, 13, 673-92.

Rabbani M. A., Maruyama K., Abe H., Khan M. A., Katsura K., Ito Y., et Al., (2003), “Monitoring Expression Profiles Of Rice Genes Under Cold, Drought, And High-Salinity Stresses And Absciscic Acid Application Using Cdna Microarray And rnagel-Blotanalyses”, *Plantphysiol.* 133,1755–1767.

Raskin I., Smith, R.D., Salt, D.E., (1997), “Phytoremediation Of Metals Using Plants To Remove Pollutants From The Environment”, *Current Opinion In Biotechnology*, 8, 221-226.

Rawlings N.D, Morton F.R, Barrett A.J., (2006), “MEROPS: The Peptidase Database. *Nucleic Acidsres*”, 34:D270–72

Rawlings N.D., Barrett A.J., Bateman A., (2010), “MEROPS: The Peptidase Database” *Nucleic Acids Res.* 38 D227–D233.

Rawlings N.D., Pearl L.H., Buttle D.J., (1992), "The Baculovirus *Autographa Californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Genome Includes A Papain-Like sequence", *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 373, 1211–1215.

Richau K. H., Kaschani F., Verdoes M., Pansuriya T. C., Niessen S., Stuber K., et al., (2012), "Subclassification And Biochemical Analysis Of Plant Papain-Like Cysteine Proteases Displays Subfamily-Specific Characteristics", *Plantphysiol.*158, 1583–1599.

Rieger P.G., Meier H.M., Gerle M., Vogt U., Groth T., Knackmuss H.J., (2002), "Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence", *Journal of Biotechnology*, 94(1), 101-123.

Robert S., Khalf M., Goulet M.C., D'Aoust M.A., Sainsbury F., Michaud D., (2013), "Protection Of Recombinant Mammalian Antibodies From Development-Dependent Proteolysis In Leaves Of *Nicotiana Benthamiana*", *Plos ONE* 8-E70203.

Roberts I. N., Caputo C., Criado M. V., Funk C., (2012), "Senescence Associated Proteases In Plants", *Physiol. Plant.* 145,130139.

Rodgers J.D., Bunce N.J., (2001), "Treatment Methods For The Remediation Of Nitroaromatic Explosives", *Water Research*, 35, 2101-2111.

Ruggiero F., Exposito J.-Y., Bournat P., Gruber V., Perret S., Comte J., Olaghier B., Garrone R., Theisen M., (2000), "Triple Helix Assembly And Processing Of Human Collagen Produced In Transgenic Tobacco Plants", *FEBS Lett.* 469, 132–136.

Rylott E. L., Bruce N. C., (2008), "Plants Disarm Soil: Engineering Plants For The Phytoremediation Of Explosives", *Trends In Biotechnology*, 27, 73-81.

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., (1989), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sapranaukas R., Gasiunas G., Fremaux C., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V., (2011), "The *Streptococcus Thermophilus* CRISPR/Cas System Provides Immunity In *Escherichia Coli*", *Nucleic Acids Research*, 39(21), 9275-9282.

Schiermeyer A., Schinkel H., Apel S., Fischer R., Schillberg S., (2005), "Production Of *Desmodus Rotundus* Salivary Plasminogen Activator A1 (*Dspaa1*) In Tobacco Is Hampered By Proteolysis", *Biotechnol. Bioeng.* 89, 848–858.

Schlereth A., Becker C., Horstmann C., Tiedemann J., Muntz, K., (2000), "Comparison Of Globulin Mobilization And Cysteine Proteinases In Embryonic Axes And Cotyledons During Germination And Seedling Growth Of Vetch (*Vicia Satival.*)", *J.Exp.Bot.*51,1423–1433.

Schlereth A., Standhardt D., Mock H. P., Muntz K., (2001), “Stored Cysteine Proteinases Start Globulin Mobilization In Protein Bodies Of Embryonic Axes And Cotyledons During vetch (*Vicia sativa* L.) Seed Germination”, *Planta* 212, 718–727.

Sens C., Scheidemann P., Werner D., (1999), “The Distribution Of ¹⁴C-TNT In Different Biochemical Compartments Of The Monocotyledonous *Triticum aestivum*”, *Environmental Pollution*, 104, 113–119.

Sharp J.M., Doran, P.M., (2001), “Characterization Of Monoclonal Antibody Fragments Produced By Plant Cells”, *Biotechnol. Bioeng.* 73, 338–346.

Shindo T., Misas-Villamil J.C., Horger A.C., Song J., van der Hoorn R.A., (2012), “A Role In Immunity for Arabidopsis Cysteine Protease Rd21, The Ortholog Of The Tomato Immune Protease Cr3”, *PloS one* 7-E29317.

Sierro N., Battey J. N. D., Ouadi S., Bakaher N., Bovet L., Willig A., Goepfert S., Peitsch MC., Ivanov N. V., (2014), “The Tobacco Genome Sequence And Its Comparison With Those Of Tomato And Potato”, *Nat. Commun.*, 5, 1–9.

Sirko A., Vanek T., Gora-Sochacka A., Redkiewicz P., (2011), “Recombinant Cytokines From Plants”, *Int. J. Mol. Sci.* 12, 3536–3552.

Song J., Win J., Tian M., Schornack S., Kaschani F., Ilyas M., et al., (2009), “A Poplactin Effectors Secreted By Two Unrelated Eukaryotic Plant Pathogens Target The Tomato Defense Protease Cr3”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 1654–1659.

Spain J.C., (1995a), “Biodegradation Of Nitroaromatic Compounds”, *Annu Rev Microbiol.* 49, 523–55.

Spain J.C., (1995b), “Bacterial Biodegradation Of Nitroaromatic Compounds Under Aerobic Conditions”, *Biodegradation Of Nitroaromatic Compounds*, Springer, 19–35.

Sparkes I. A., Runions J., Kearns A., Hawes C., (2006), “Rapid, Transient Expression Of Fluorescent Fusion Proteins In Tobacco Plants And Generation Of Stably Transformed Plants”, *Nature Protocols*, 1 (4), 2019.

Sprink T., Metje J., Hartung F., (2015), “Plant Genome Editing By Novel Tools: Talen And Other Sequence Specific Nucleases”, *Current Opinion In Biotechnology*, 32, 47–53.

Stevens L.H., Stoop G.M., Elbers I.J.W., Molthoff J.W., Bakker H.A.C., Lommen A., (2000), “Effect of climate conditions and plant developmental stage on the stability of antibodies expressed in transgenic tobacco”, *Plant Physiol.* 124, 173–182.

Stoger E., Fischer R., Moloney M., Ma J.K.C., (2014), “Plant Molecular Farming For The treatment Of Chronic And Infectious Diseases”, *Annual Review Of Plant Biology* 65:743–768.

Strand S.E., Doty S.L., Bruce N., (2009), “Engineering Transgenic Plants For The Sustained Containment And In Situ Treatment Of Energetic Materials”, SERDP Project ER-1318, Final Report.

Subburaj S., Chung S. J., Lee C., Ryu S. M., Kim D. H., Kim J. S., Bae S., Lee, G. J., (2016), “Site-Directed Mutagenesis In *Petunia*× *Hybrida* Protoplast System Using Direct Delivery Of Purified Recombinant Cas9 Ribonucleoproteins”, *Plant Cell Reports*, 35(7), 1535-1544.

Subburaj S., Zhu D., Li, X., Hu Y., Yan Y., (2017), “Molecular Characterization And Expression Profiling Of *Brachypodium distachyon* L. Cystatin Genes Reveal High Evolutionary Conservation And Functional Divergence In Response To Abiotic Stress”, *Front. Plant Sci.* 8-743.

Sugano S. S., Shirakawa M., Takagi J., Matsuda Y., Shimada T., Hara-Nishimura I., Kohchi, T., (2014), “Crispr/Cas9-Mediated Targeted Mutagenesis In The Liverwort *Marchantia polymorpha* L”, *Plant And Cell Physiology*, 55(3), 475-481.

Sun Q.Y., Ding L.W., Lomonossoff G.P., Sun Y.B., Luo M., Li C.Q., (2011), “Improved Expression And Purification Of Recombinant Human Serum Albumin From Transgenic Tobacco Suspension Culture”, *J. Biotechnol.* 155, 164–172.

Sunahara G.I., Lotufo G., Kuperman, R.G., Hawari J., (2009), “Ecotoxicology of explosives”, CRC Press.

Symons Z.C., Bruce N.C., (2006), “Bacterial Pathways For Degradation Of Nitroaromatics”, *Natural Product Reports*, 23, 845-50.

Szewinska J., Siminska J., Bielawski, W., (2016), “The Roles Of Cysteine Proteases And Phytocystatins In Development And Germination Of Cereal Seeds”, *J. Plant Physiol.* 207, 10–21.

Tan Y., Li M., Yang Y., Sun X., Wang N., Liang B., et al., (2017a), “Overexpression Of *Mpcys4*, A Phytocystatin Gene From *Malus Prunifolia* (Willd.) Borkh., Enhances Stomatal Closure To Confer Drought Tolerance In Transgenic *Arabidopsis* and Apple”, *Front. Plant Sci.* 8-33.

Tan Y., Yang Y., Li, C., Liang B., Li M., Ma F., (2017b), “Overexpression Of *Mpcys4*, A Phytocystatin Gene From *Malus Prunifolia* (Willd.) Borkh., Delays Natural And Stress-Induced Leaf Senescence In Apple”, *Plantphysiol.Biochem.* 115, 219–228.

Taylor M.A.J., Baker K.C., Briggs G.S., Connerton I.F., Cummings N.J., Et al., (1995), “Recombinant Proregions From Papain And Papaya Proteinase IV Are Selective High Affinity Inhibitors Of The Mature Papaya Enzymes”, *Proteineng.* 8-59–62.

Tian M., Win J., Song J., Van der Hoorn R., Van der Knaap E., And Kamoun S., (2007), “A *Phytophthora infestans* Cystatin-Like Protein Targets A Novel Tomato Papain-Like Apoplastic Protease”, *Plant Physiol.* 143, 364–377.

Travis E.R., Hannink N.K., Van der Gast C.J., Thompson I.P., Rosser S.J., Bruce N. C., (2007), "Impact Of Transgenic Tobacco On Trinitrotoluene (TNT) Contaminated Soil Community", *Environmental Science And Technology*, 41, 5854-61.

Twyman R.M., Schillberg S., Fischer R., (2005), "Transgenic Plants In The Biopharmaceutical Market", *Expert Opin. Emerg. Drugs*, 10, 185–218.

Ueda T., Seo S., Ohashi Y., Hashimoto J., (2000), "Circadian And Senescence-Enhanced Expression Of A Tobacco Cysteine Protease Gene", *Plant molecular biology* 44-649–657.

van Der Hoorn R.A., (2008), "Plant Proteases: From Phenotypes To Molecular Mechanisms", *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 191–223.

van Der Hoorn R.A., Leeuwenburgh M.A., Bogyo M., Joosten M.H., Peck S.C., (2004), "Activity Profiling Of Papain-Like Cysteine Proteases In Plants", *Plant Physiol.* 135 1170–1178.

van Der Linde K., Hemetsberger C., Kastner C., Kaschani F., van Der Hoorn R.A., Kumlehn, J., Etal., (2012), "A Maize Cystatin Suppresses Host Immunity By Inhibiting Apoplastic Cysteine Proteases", *Plantcell*24,1285–1300.

van Dillewijn P., Couselo J L., Corredoira E., Delgado A., Wittich R.M., Ballester A., Ramos J.L., (2008), "Bioremediation Of 2,4,6-Trinitrotoluene By Bacterial Nitroreductase Expressing Transgenic Aspen", *Environmental Science And Technology*, 42, 7405-10.

Velasco-Arroyo B., Diaz-Mendoza M., Gandullo J., Gonzalez-Melendi P., Santamaria M. E., Dominguez-Figueroa J. D., et al., (2016), "Hvpap-1 C1A Protease Actively Participates In Barley Proteolysis Mediated By A Bioticstresses", *J.Exp.Bot.*67,4297–4310.

Vierstra R.D., (2003), "The Ubiquitin/26S Proteasome Pathway, The Complex Last Chapter In The Life Of Many Plant Proteins", *Trends Plant Sci.*; 8: 135–42.

Vila M., Lorber-Pascal, S., Laurent, F., (2008), "Phytotoxicity To And Uptake Of TNT By Rice", *Environmental Geochemistry And Health*, 30, 199-203.

Wang S., Zhang S., Wang W., Xiong X., Meng F., Cui X., (2015), "Efficient Targeted Mutagenesis In Potato By The Crispr/Cas9 System", *Plant Cell Reports*, 34(9), 1473-1476.

Watanabe M., Nishino T., Takio K., Sofuni T., Nohmi T., (1998), "Purification And Characterization Of Wild-Type And Mutant "Classical" Nitroreductases Of *Salmonella Typhimurium*", *The Journal Of Biological Chemistry*, 273(37), 23922-8.

Weber E., Engler C., Gruetzner R., Werner S., Marillonnet S., (2011), “A Modular Cloning System For Standardized Assembly Of Multigene Constructs”, Plos One, 6 (2).

Werner S., Engler C., Weber E., Gruetzner R., Marillonnet S., (2012), “Fast Track Assembly Of Multigene Constructs Using Golden Gate Cloning And The Moclo System”, Bioengineered, 3 (1), 38-43.

Whiteway J., Koziarz P., Veall J., Sandhu N., Kumar P., Hoecher B., Lambert I.B., (1998), “Oxygen-insensitive nitroreductases: Analysis of the roles of *nfsA* and *nfsB* in development of resistance to 5-Nitrofur derivatives in *Escherichia coli*”, Journal of bacteriology, 180(21), 5529-5539.

Wiśniewski K., Zagdańska B., (2001), “Genotype-Dependent Proteolytic Response Of Spring Wheat To Water Deficiency”, J Exp Bot.; 52-1455–63.

Wongsamuth R., Doran P.M., (1997), “Production Of Monoclonal Antibodies By Tobacco Hairy Roots”, Biotechnol. Bioeng. 54, 141–150. 401–415.

Woo J. W., Kim J., Kwon S.I., Corvalán C., Cho S.W., Kim H., Kim S.G., Kim S.T., Choe, S., Kim J.S., (2015), “Dna-Free Genome Editing In Plants With Preassembled Crispr-Cas9 Ribonucleoproteins”, Nature Biotechnology, 33(11), 1162.

Wurm F.M., (2004), “Production Of Recombinant Protein Therapeutics In Cultivated Mammalian Cells”, Nat. Biotechnol. 22, 1393– 1398.

Xiao H. J., Yin Y. X., Chai W. G., Gong Z. H., (2014), “Silencing Of The *Cacp* Gene Delays Salt- And Osmotic-Induced Leaf Senescence In *Capsicum Annuum* L.”, Int. J. Mol. Sci. 15, 8316–8334.

Xu W., Zhao Q., Li Z., Lu X., Han S., Ye Z., (2019) "Biodegradation Of Dinitrotoluene Sulfonates And Other Nitro-Aromatic Compounds By *Pseudomonas* Sp. X5 Isolated From TNT Red Water Contaminated Soil", Journal of Cleaner Production 214, 782-790.

Zang Q. W., Wang C. X., Li X. Y., Guo Z. A., Jing R. L., Zhao J., et al., (2010), “Isolation And Characterization Of A Gene Encoding A Polyethylene Glycol-Induced Cysteine Protease in Common Wheat”, J.Biosci.35,379–388.

Zenno S., Saigo K., Kanoh H., Inouye S., (1994), “Identification Of The Gene Encoding The Major NAD(P)H-Flavin Oxidoreductase Of The Bioluminescent Bacterium *Vibrio Fischeri* ATCC 7744”, Journal Of Bacteriology, 176,3536–43.

Zhang X.M., Wangy L., Et al., (2009), “Ntcp56, A New Cysteine Protease In *Nicotiana Tabacum* L., Involved In Pollen Grain Development”, Journal of experimental botany 60-1569–1577.

Zhang D., Liu D., Lv X., Wang Y., Xun Z., Liu, Z., Et Al., (2014), “The Cysteine Protease CEP1, A Key Executor Involved In Tapetal Programmed Cell Death, Regulates Pollen Development In *Arabidopsis*”, Plant Cell 26, 2939–2961.

Zhang N.Y., Jones B.L., (1995), “Characterization Of Germinated Barley Endoproteolytic Enzymes By Two-Dimensional Gel Electrophoresis”, *J. Cereal Sci.* 21,4499–4503.

Zhao P., Zhou X.M., Zhang L.Y., Wang W., Ma L.G., Yang L.B., Et al., (2013), “A Bipartite Molecular Module Controls Cell Death Activation In The Basal Cell Lineage Of Plant Embryos”, *Plos Biol.* 11-E1001655.

Zhao C., Johnson B.J., Kositsup B., Andbeers E.P., (2000), “Exploiting secondary Growth In Arabidopsis. Construction Of Xylem And Bark Cdna Libraries And Cloning Of Three Xylem Endopeptidases”, *Plant Physiol.* 123, 1185–1196.

Zhou X., Jacobs T. B., Xue L. J., Harding S. A., Tsai C. J., (2015), “Exploiting Snps For Biallelic Crispr Mutations In The Outcrossing Woody Perennial Populus Reveals 4-Coumarate: Coa Ligase Specificity And Redundancy”, *New Phytologist*, 208(2), 298-301.

Ziemann S., van der Linde K., Lahrmann U., Acar B., Kaschani F., Colby T., et al., (2018), “An Apoplastic Peptide Activates Salicylic Acid Signalling In Maize”, *Natplants*4,172–180.

Zou Z., Liu J., Yang L., Xie G., (2017a), “Survey Of The Rubber Tree Genome Reveals A High Number Of Cysteine Protease-Encoding Genes Homologous To Arabidopsis SAG12”, *Plos One* 12-E0171725.

Zou Z., Xie G., Yang, L., (2017b), “Papain-Like Cysteine Protease Encoding Genes In Rubber (*Hevea Brasiliensis*): Comparative Genomics, Phylogenetic, And Transcriptional Profiling Analysis”, *Planta* 246, 999–1018.

ÖZGEÇMİŞ

Çiğdem BOZKURT, 10 Kasım 1995'te Elazığ'da doğdu. 2013 yılında Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 2017 yılında tamamladıktan sonra 2018 yılında Gebze Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen Yüksek Lisans eğitimine devam etmektedir.