

**T.C**  
**GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**CRISPR/CAS9 SİSTEMİ KULLANILARAK DOMATES**  
**(Solanum lycopersium) BİTKİSİNDE CCDC124 GENİNİN**  
**SUSTURULMASI**

**HİLAL CİVELEK**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GEBZE**  
**2022**

**T.C**  
**GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**CRISPR/cas9 SİSTEMİ KULLANILARAK**  
**DOMATES (*Solanum lycopersicum*) BİTKİSİNDE**  
**CCDC124 GENİNİN SUSTURULMASI**

**HİRAL CİVELEK**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMANI**  
**PROF. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY**  
**II. DANIŞMANI**  
**PROF. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ**

**GEBZE**  
**2022**

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

**UTILIZING THE CRISPR/CAS9 SYSTEM TO  
SILENCE THE CCDC124 GENE IN TOMATO**  
***(Solanum lycopersium)***

**HİLAL CİVELEK**  
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF**  
**MASTER OF SCIENCE**  
**DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS**

**THESIS SUPERVISOR**  
**PROF. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY**  
**II. SUPERVISOR**  
**PROF. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ**

**GEBZE**

**2022**



## YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 07/07/2022 tarih ve 2022/34 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 18/07/2022 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Hilal CİVELEK'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

### JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI)

: Prof.Dr. Uygur Halis TAZEBAZ

ÜYE

: Prof. Dr. Nuri ÖZTÜRK

ÜYE

: Doç. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU

### ONAY

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

İMZA/MÜHÜR

## ÖZET

Mayalardan insana kadar tüm ökaryotlarda korunmuş olarak bulunan Ccdc124 (Coiled-coil domain containing 124) proteini, RNA-bağlayıcı bir proteindir ve hücre içerisinde ribozomda ve sentrozomda bulunduğu gösterilmiştir. Daha önceki çalışmalarda Ccdc124 proteinini kodlayan genin memeli hücre hatlarında susturulması ve aşırı ifade edilmesi durumlarında sitokinezde bozulmaların meydana geldiği ve çok çekirdekli hücrelerin oluştuğu tespit edilmiştir. Fakat hücre bölünmesi ve hücre içindeki diğer fizyolojik olaylarda nasıl bir rol oynadığı hala bilinmemektedir. CCDC124 geninin domates bitkisindeki homoloğu üzerinde, CRISPR/cas9 sistemi kullanılarak yapılan bu çalışma ile CCDC124 geni susturulmasıyla bitkilerde ne gibi morfolojik farklılıkların olduğu tespit edilerek genin fonksiyonunun araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca bu çalışma, CCDC124 geninin bitkilerdeki homoloğu üzerinde yapılan ilk çalışma olmakla birlikte, bitkilerde CCDC124 ifadesi olmadığında organizma boyutunda ne gibi fenotipik etkilerin olduğunu gösteren ilk çalışmadır. Bu tez çalışmasının ilk basamağında, kılavuz RNA'lar (gRNA'lar) CCDC124 geninin birinci ekzonunu hedef alacak şekilde tasarlanmış, ardından Golden Gate klonlama ile pYLCRISPR/Cas9P35S-N vektörüne klonlanmıştır. Daha sonra, domates bitkisine *Agrobacterium* aracılı kararlı transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Transgenik bitki hatlarının PZR tabanlı belirlenmesinden sonra hedeflenen bölgede oluşan mutasyonlar dizi analizleri ile doğrulanmıştır. Çalışmamızın sonucunda, SICCDC124 mutantlarında farklı uzunlukta delesyonların ve baz değişimlerinin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, SICCDC124 mutantlarının, yabnacı tip bitkilerle karşılaştırıldığında belirgin morfolojik farklılıklara sahip olduğunu ve mutant bitki hatlarında erken yaşlanma gerçekleştiği gözlemlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Coiled-Coil Domain İçeren 124 (Ccdc124), CRISPR/cas9, *Solanum lycopersicum*.

## SUMMARY

Ccdc124 (Coiled-coil domain containing 124) protein, which is conserved in all eukaryotes from yeast to human, is an RNA-binding protein and has been shown to be found in the ribosome and centrosome in the cell. Previous investigations have shown that overexpression and silencing of the CCDC124 gene in mammalian cell lines lead to cytokinesis being disrupted and the formation of multinucleated cells. However, it is still unclear how it affects cell division and other physiological processes taking place inside the cell. The aim of this study, which was carried out on the homolog of the CCDC124 gene in tomato plants, using the CRISPR/cas9, was to determine the morphological differences in plants by silencing the CCDC124 gene and to investigate its function. Additionally, this study is the first to examine the CCDC124 gene's plant homolog and indicate the phenotypic impacts of organism size in the absence of CCDC124 expression in plants. In the first step of this thesis, guide RNAs were designed to target the first exon of the CCDC124 gene, then cloned into the pYLCRISPR/Cas9P35S-N vector by Golden Gate cloning. Subsequently, *Agrobacterium-mediated* stable transformation of tomato plant was carried out. Sequence analysis was used to confirm mutations in the targeted region after PCR-based transgenic plant line identification. As a consequence of our research, it was determined that SICDC124 mutants had deletions of various lengths and base changes. Additionally, it was observed that SICDC124 mutants have significant morphological differences compared to wild-type plants and premature senescence occurs in mutant plant lines.

**Key Words:** Coiled-Coil Domain İçeren 124 (Ccdc124), CRISPR/cas9, *Solanum lycopersicum*.

## TEŞEKKÜRLER

Öncelikle yüksek lisans hayatım boyunca, her türlü yardımını eksik etmeyen, elinden gelen tüm olanakları bizlere sağlayan, değerli danışmanım Prof. Dr. Uygur Halis Tazebay’a teşekkür ederim.

Çalışmalarımızda laboratuvarının tüm olanaklarını sağladığı ve her türlü desteği için sevgili eş danışmanım Prof. Dr. Yelda Özden Çiftçi’ye teşekkür ederim.

Yüksek lisans hayatım boyunca desteğini eksik etmeyen değerli Prof. Dr. Nuri Öztürk’e teşekkürü borç bilirim.

Tanıştığımız andan beri her türlü desteğini esirgemeyen, bilgisi ve karakteri ile bizlere örnek olan sevgili Dr. Merve Tuzlakoğlu Öztürk ve sevgili ailesine sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca bilgisi ve tecrübesini benimle paylaşan, birlikte çalışmaktan en keyif aldığım, sohbeti, dostluğu ile bana katkısı büyük olan sevgili dostum Nicat Cebraioğlu’na sonsuz teşekkür ederim. Aynı laboratuvarı paylaşmaktan mutluluk duyduğum; Kübra Hacıbeyoğlu, Açelya Avcı, Büşra Çelik, Ahmet Kalaycı, Baki Kılıç, Emrah Özçelik, Burak Akgül, Nida Arslan’a teşekkür ederim.

Enerjisi ve yardım severliğe ile gönüllerde yer etmiş Leyla Dikmetaş’a ve Melik Bahçekapılı’ya desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Geçirilen sürenin uzunluğundan ziyade hissedilen dostluğun, güvenin, sevginin daha önemli olduğunu bir kez daha hissettiren, hayatımda oldukları için kendimi şanslı hissettiğim; İlkay Ünal, Agit Çetinkaya, Erva Bacacı, Yağmur Gültekin, Nesli El, Ali Burak Yıldız, Taha Karaman, Gizem Kuğu, Ayşenur Bayrak, Sena Acet’e dostlukları ve yardımları için teşekkürü borç bilirim.

Hayatımda olmalarından mutluluk duyduğum, dostluktan kardeşliğe dönen bağımız ile Hilal Genç, Dilara Özge Çöl ve Hilal Gödek’e her koşulda yanımda olup beni sevgileri ve güvenleri ile sardıkları için sonsuz teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca desteklerini eksik etmeyen ve bana her koşulda güvenen, en değerlim, sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

|                                                                                   | <b><u>Sayfa</u></b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| ÖZET                                                                              | v                   |
| SUMMARY                                                                           | vi                  |
| TEŞEKKÜR                                                                          | vii                 |
| İÇİNDEKİLER                                                                       | viii                |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ                                                    | x                   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ                                                                   | xi                  |
| TABLolar DİZİNİ                                                                   | xiii                |
| <br>                                                                              |                     |
| 1. GİRİŞ                                                                          | 1                   |
| 1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği                                              | 1                   |
| 2. LİTERATÜR ÖZETİ                                                                | 3                   |
| 2.1 Domates ( <i>Solanum lycopersicum</i> )                                       | 3                   |
| 2.2. Genom Düzenleme Yöntemleri                                                   | 5                   |
| 2.2.1. Çinko Parmak Nükleazlar (Zing Finger Nuclease: ZFN)                        | 7                   |
| 2.2.2. Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Efektör Nükleazlar (TALEN)                | 8                   |
| 2.2.3. CRISPR/cas9 (Clustered regulatory interspaced short<br>palindromic repeat) | 9                   |
| 2.3. <i>Agrobacterium</i> Aracılı Bitki Transformasyonu                           | 15                  |
| 2.4. Coiled-Coil Domain İçeren 124 (Ccdd124) Proteinini                           | 16                  |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM                                                             | 19                  |
| 3.1. Materyal                                                                     | 19                  |
| 3.1.1. Bitki Materyali ve Kullanılan Hücreler                                     | 19                  |
| 3.1.2. Kullanılan Stok Solüsyonlar ve Antibiyotikler                              | 19                  |
| 3.1.3. Kültür Ortamları                                                           | 20                  |
| 3.1.4. Kullanılan Cihazlar ve Kitler                                              | 24                  |
| 3.1.5. Kullanılan Kimyasallar                                                     | 25                  |
| 3.1.6. Kullanılan Vektörler ve Primerler                                          | 25                  |
| 3.2. Yöntem                                                                       | 26                  |

|                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.1. sgRNA Tasarımı                                                                                                                 | 26 |
| 3.2.2. sgRNA Ekspresyon Kasetlerinin Oluşturulması                                                                                    | 27 |
| 3.2.3. Golden Gate Klonlama                                                                                                           | 30 |
| 3.2.4. <i>E. Coli</i> ve <i>Agrobacterium</i> Kompetant Hücre Hazırlama ve Transformasyon                                             | 31 |
| 3.2.5. Bitki Doku Kültürü                                                                                                             | 33 |
| 3.2.6. Transgenik Bitki Hatlarının Belirlenmesi                                                                                       | 35 |
| 3.2.7. Mutant Bitkilerin Doğrulanması                                                                                                 | 37 |
| 4.SONUÇ                                                                                                                               | 39 |
| 4.1. Domates ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) CCDC124 genini susturmak için sgRNA Tasarlanması                                         | 39 |
| 4.2. pYLsgRNA Ekspresyon Kaset Vektörlerinin Oluşturulması                                                                            | 40 |
| 4.3. pYLCRISPR/Cas9P35S-N Vektörünün Golden Gate Klonlama Tekniği Kullanılarak Oluşturulması ve Klonlanan Bölgelerin Kontrol Edilmesi | 41 |
| 4.4. Domates Kotiledonlarından Transgenik Domates Hatlarının Oluşturulması                                                            | 43 |
| 4.5. Transgenik Bitki Hatlarının PZR Tabanlı Belirlenmesi                                                                             | 49 |
| 4.6. Sanger Dizileme İle Mutant Hatların Belirlenmesi                                                                                 | 50 |
| 5.TARTIŞMA                                                                                                                            | 53 |
| KAYNAKLAR                                                                                                                             | 56 |
| ÖZGEÇMİŞ                                                                                                                              | 66 |
| EKLER                                                                                                                                 | 67 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| <u>Simgeler ve</u><br><u>Kısaltmalar</u> | <u>Açıklamalar</u>                                          |
|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| C                                        | : Derece Celcius                                            |
| µg                                       | : Mikrogram                                                 |
| µl                                       | : Mikrolitre                                                |
| µM                                       | : Mikromolar                                                |
| mg                                       | : Miligram                                                  |
| g                                        | : Gram                                                      |
| ml                                       | : Mililitre                                                 |
| mM                                       | : Mikromolar                                                |
| L                                        | : Litre                                                     |
| Rpm                                      | : Rotorun dakikadaki dönme hızı                             |
| Ccdc124                                  | : Coiled-coil domain-containing 124                         |
| Mb                                       | : Mega baz                                                  |
| bp                                       | : Baz çifti                                                 |
| ZFN                                      | : Zing Finger Nuclease                                      |
| TALEN                                    | : Transcription activator-like effector nuclease            |
| CRISPR                                   | : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats |
| DSB                                      | : Double streak break                                       |
| NHEJ                                     | : Non homologous end joining                                |
| HDR                                      | : Homology directed repair                                  |
| PAM                                      | : Protospacer adjacent motif                                |
| PZR                                      | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu                               |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| <b><u>Şekil No:</u></b>                                                                                                             | <b><u>Sayfa</u></b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 2.1: Domates bitkisinde CRISPR/Cas9 teknolojisi uygulanma basamakları.                                                              | 5                   |
| 2.2: Bölgeye özgü nükleazlar ile NHEJ veya HR aracılı genom düzenleme.                                                              | 6                   |
| 2.3: Çinko Parmak Nükleazlar (ZFN) mekanizması.                                                                                     | 7                   |
| 2.4: Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Efektör Nükleazların (TALEN) mekanizması.                                                     | 9                   |
| 2.5: CRISPR/cas immün sisteminin biyolojisi.                                                                                        | 10                  |
| 2.6: CRISPR/cas9 sisteminin tarihsel gelişimi.                                                                                      | 12                  |
| 2.7: CRISPR/Cas bağışıklık sisteminin sınıflandırılması.                                                                            | 13                  |
| 2.8: sgRNA-Cas9 kompleksi.                                                                                                          | 14                  |
| 2.9: CRISPR–Cas 9 sistem moleküler mekanizmasının şematik diyagramı.                                                                | 14                  |
| 2.10: Ti plazmiti fiziksel haritası.                                                                                                | 16                  |
| 2.11: Türler arasında Ccdc124 homologlarının çoklu dizi hizalaması.                                                                 | 17                  |
| 2.12: Bitkiler alemindeki farklı türler arasında Ccdc124 homologlarının çoklu dizi hizalaması.                                      | 18                  |
| 3.1: pYLsgRNA-AtU3d/LacZ kaset vektörünün fiziksel haritası.                                                                        | 28                  |
| 3.2: pYLsgRNA-AtU6-1/LacZ kaset vektörünün fiziksel haritası.                                                                       | 28                  |
| 3.3: pYLCRISPR/Cas9P35S-N plazmiti fiziksel haritası.                                                                               | 30                  |
| 3.4: Tohumların çimlenmesi.                                                                                                         | 35                  |
| 3.5: Transgenik bitkilerin belirlenmesi için tasarlanan primerler.                                                                  | 36                  |
| 4.1: CRISPOR-Tefor programı kullanılarak tasarlanan sgRNA tasarımı için özgüllük puanlarına göre sıralanan tahmini kılavuz RNA'lar. | 39                  |
| 4.2: sgRNA ekspresyon kasetlerinin oluşturulma basamakları.                                                                         | 40                  |
| 4.3: Birinci PZR agaroz jel görüntüsü.                                                                                              | 41                  |
| 4.4: İkinci PZR agaroz jel görüntüsü.                                                                                               | 41                  |
| 4.5: Golden Gate klonlama ile vektörün oluşturulma basamakları.                                                                     | 42                  |

|       |                                                                                                                      |    |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.6:  | Transformasyondan sonra seçici besiyerinde büyüyen <i>E.coli</i> (A) ve <i>Agrobacterium tumafeciens EHA105</i> (B). | 43 |
| 4.7:  | Koloni PZR'la seçici besiyerinde büyüyen bakterilerde vektör varlığının tespit.                                      | 43 |
| 4.8:  | Genç domates kotiledonlarından transgenik domates hatlarının oluşturulması.                                          | 44 |
| 4.9:  | Seçici besiyerlerine aktarılan eksplantların 1. Haftası.                                                             | 44 |
| 4.10: | Seçici besiyerinde 2.hafta.                                                                                          | 45 |
| 4.11: | Seçici besiyerinde 4.hafta.                                                                                          | 45 |
| 4.12: | SICCDC124-11 bitkisinde gözlemlenen morfolojik değişiklikler.                                                        | 46 |
| 4.13: | Aday mutant bitkilerde gözlemlenen morfolojik değişiklikler.                                                         | 47 |
| 4.14: | SICCDC124-26 ve SICCDC124-21 bitkilerde gözlemlenen morfolojik değişiklikler.                                        | 47 |
| 4.15: | SICCDC124-21 bitkisinde gözlemlenen morfolojik değişiklikler.                                                        | 48 |
| 4.16: | SICCDC124-32 bitkisinde gözlemlenen morfolojik değişiklikler.                                                        | 49 |
| 4.17: | SICCDC124-4 bitkisinde gözlemlenen morfolojik değişiklikler.                                                         | 49 |
| 4.18: | SICCDC124-3 bitkisinin gövdesinden ayrılan yapraklar.                                                                | 50 |
| 4.19: | Transgenik bitkilerin PZR tabanlı belirlenmesi.                                                                      | 51 |
| 4.20: | SICCDC124-3 mutantı için gönderilen PZR ürününün dizileme sonucu ve kromatogramları.                                 | 52 |
| 4.21: | SICCDC124-3 mutantı içi gönderilen PZR ürünü, 1.koloni ve 2.koloni dizileme sonucunun karşılaştırılması.             | 52 |
| 4.22: | SICCDC124-11 mutantı için gönderilen PZR ürününün dizileme sonucu ve kromatogramları.                                | 53 |

## TABLÖLER DİZİNİ

| <b><u>Tablo No:</u></b>                                                  | <b><u>Sayfa</u></b> |
|--------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 2.1: Domatesin bitkisinde CRISPR/Cas teknolojisinin mevcut uygulamaları. | 4                   |
| 3.1: Stok solüsyon ve antibiyotiklerin hazırlanışı.                      | 19                  |
| 3.2: Luria Broth besiyeri içeriği.                                       | 21                  |
| 3.3: Tohum çimlenme besiyeri içeriği (½ MSO).                            | 21                  |
| 3.4: Co-kültür sıvı besiyeri ortamı (%2 MS).                             | 22                  |
| 3.5: Ön Kültür Besiyeri / Co-Kültür Besiyeri (2Z).                       | 22                  |
| 3.6: Birincil rejenerasyon ortamı (2Z).                                  | 23                  |
| 3.7: Köklendirme ortamı.                                                 | 23                  |
| 3.8: Kullanılan cihazlar.                                                | 24                  |
| 3.9: Kullanılan kitler.                                                  | 24                  |
| 3.10: Kullanılan kimyasalların listesi.                                  | 25                  |
| 3.11: Kullanılan vektörler ve kullanım amaçları.                         | 25                  |
| 3.12: Kullanılan vektörler ve nükleotit dizileri                         | 26                  |
| 3.13: Kesim/ligasyon reaksiyonu için kullanılan bileşenler.              | 27                  |
| 3.14: Nested PZR için birinci PZR bileşenleri.                           | 29                  |
| 3.15: Nested PZR için program koşulları.                                 | 29                  |
| 3.16: İkinci PZR için kullanılan bileşenleri.                            | 30                  |
| 3.17: Golden Gate klonlama için kullanılan reaksiyon bileşenleri.        | 31                  |
| 3.18: Koloni PZR koşulları.                                              | 32                  |
| 3.19: Koloni PZR program koşulları.                                      | 33                  |
| 3.20: Transgenik bitkilerin belirlenmesi için PZR bileşenleri.           | 36                  |
| 3.21: Transgenik bitkilerin belirlenmesi için PZR koşulları.             | 37                  |
| 3.22: Mutant bitkilerin doğrulanması için PZR bileşenleri.               | 37                  |
| 3.23: Mutant bitkilerin doğrulanması için PZR koşulları.                 | 38                  |
| 4.1: Domates Ccdc124 geni için tasarlanan adaptör primerler.             | 40                  |

# 1.GİRİŞ

Domates (*Solanum lycopersicum*) kökeni Güney Amerika olan, yüksek besin değeri içeriği ile ekonomik değeri yüksek bir bitkidir. Hem önemli bir gıda kaynağıdır hem de hem de diğer klasik model bitkilerin aksine meyve biyolojisi için iyi bir modeldir. Diploit genom yapısı, genetik transformasyon için yöntemlerin mevcudiyeti gibi nedenlerden dolayı özellikle gen fonksiyonlarının araştırılmasında yaygın olarak kullanılan bir model bitki türü haline gelmiştir [1].

Tüm ökaryotlarda korunmuş olarak bulunan Ccdc124 (Coiled-coil domain-containing 124) proteini, karakterizasyon çalışmaları devam eden ribozom bağlayıcı bir proteindir. Memeli hücre hatlarında yapılan çalışmalarda hücre içi lokalizasyonu interfaz evresinde sentrozomda; mitozun post-anafaz, telofaz ve sitokinez evrelerinde ise orta cisimcikte olduğu bildirilmiştir. Ccdc124 proteinini kodlayan genin memeli hücre hatlarında susturulması ve aşırı ifade edilmesi durumlarında sitokinezde bozulmaların meydana geldiği ve çok çekirdekli hücrelerin oluştuğu tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan in siliko karakterizasyon çalışmalarında CCDC124'ün N-terminalindeki LC (low complexity) bölgelerinin agrega ve dimerik/oligometik durumların oluşumunu düzenleyebildiği gösterilmiştir. Fakat günümüze kadar yapılan çalışmalarda Ccdc124 proteinin hücre içerisindeki görevi hala belirlenememiştir [2]–[4].

## 1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Düşük ökaryot canlılardan (askomisetler, basidiyomisetler) insana kadar tüm ökaryotlarda korunmuş olarak bulunan Ccdc124 proteini, RNA bağlayıcı bir protein olmakla birlikte ribozom, sentrozom ve bölünen hücrelerin ayrılmasını regüle eden biyomoleküler bir kompleks olan orta cisimcikte (midbody) yer aldığı bilinmektedir. Daha önceki çalışmalarda Ccdc124 proteinini kodlayan genin memeli hücre hatlarında susturulması ve aşırı ifade edilmesi durumlarında sitokinezde bozulmaların meydana geldiği ve çok çekirdekli hücrelerin oluştuğu tespit edilmiştir. Fakat hücre bölünmesi ve hücre içindeki diğer fizyolojik olaylarda nasıl bir moleküler rol oynadığı hala

bilinmemektedir. Ccdc124 geninin domates bitkisindeki homoloğu üzerinde, CRISPR/cas9 sistemi kullanılarak yapılan bu çalışma ile Ccdc124 geni susturulmasıyla ortaya çıkan morfolojik farklılıkların tespit edilerek, genin işlevlerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca bu çalışma Ccdc124 geninin bitkilerdeki homoloğu üzerinde yapılan ilk çalışma olmakla birlikte Ccdc124 geninin susturulmasıyla bitkilerde organizma boyutunda ne gibi fenotipik etkilerin olduğunu gösteren ilk çalışmadır.

Bu tez çalışması kapsamında, domates (*Solanum lycopersicum*) bitkisinde CRISPR\Cas9 sistemi kullanılarak Ccdc124 geni susturulmuştur. Başlangıçta, kılavuz RNA'lar (gRNA'lar) Ccdc124 genini hedef alacak şekilde tasarlanmış, ardından Golden Gate Klonlama ile pYLCRISPR/Cas9P35S-N vektörüne klonlanmıştır. Daha sonra domates bitkisine *Agrobacterium* aracılı stabil transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Hedeflenen bölgedeki mutasyonlar DNA sekanslama ile belirlenmiştir. Sonuçlar, SICCDC124 mutantlarının, vahşi tip bitkilerle karşılaştırıldığında belirgin morfolojik farklılıklara sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca mutant bitkilerde erken yaşlanmanın gerçekleştiği gözlemlenmiştir.

## 2.LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1. Domates (*Solanum lycopersicum*)

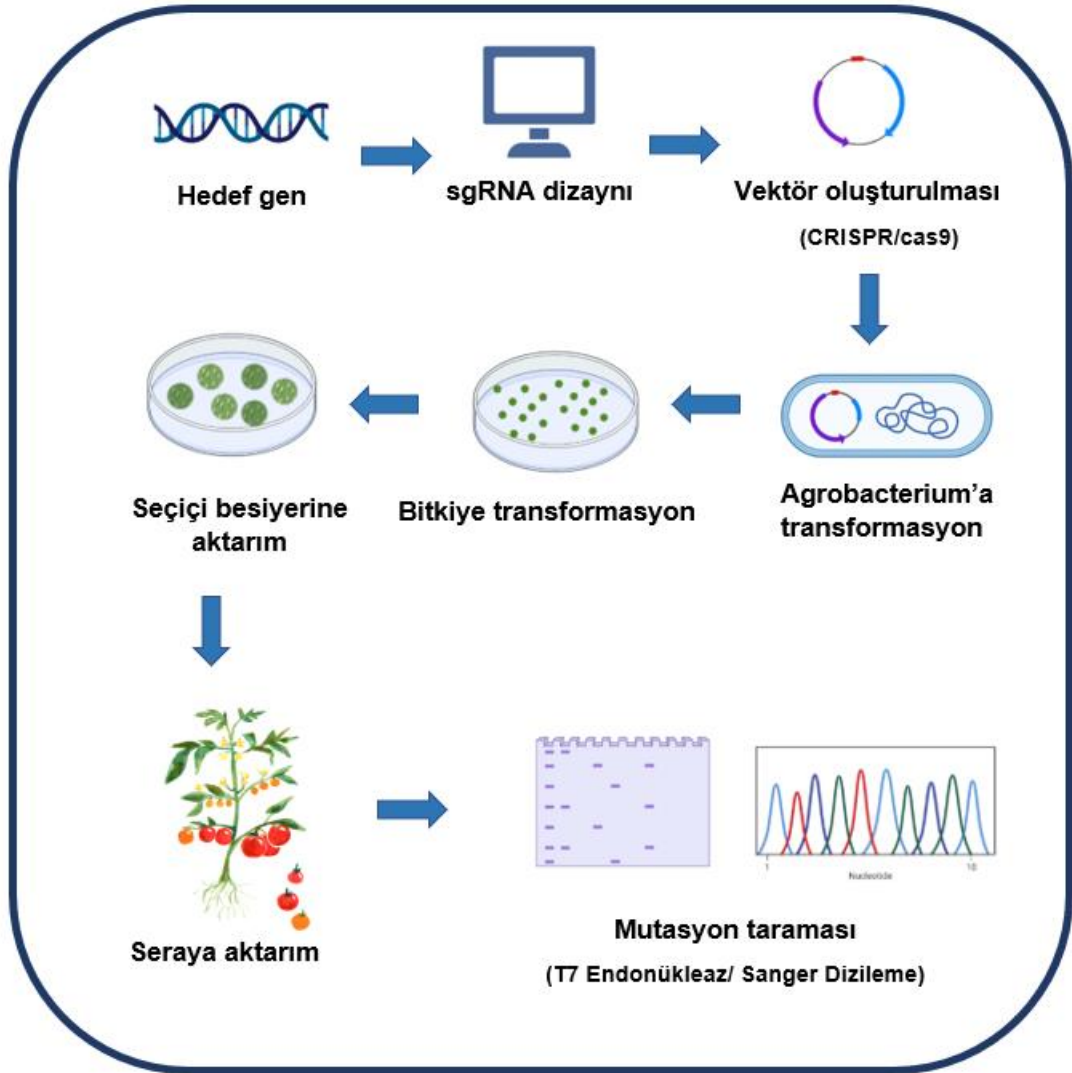
Domates (*Solanum lycopersicum* L.) Güney Amerika kökenli patlıcangiller (Solanaceae) familyasına ait diploit bir bitkidir [5]. Genom boyutu yaklaşık 900 Mb olmakla birlikte  $2n=24$  kromozona sahiptir [6] ,[7]. Likopen, flavonoidler,  $\beta$ -karoten, çeşitli vitamin ve fenolik bileşikleri içeren yüksek besin değerine sahip olduğu için dünya genelinde yüksek ekonomik değere sahip bir bitki haline gelmiştir [8] - [10]. Geçmişten günümüze kadar domates ıslah çalışmaları, strese karşı direnç, meyve kalitesini iyileştirilmesi ve birçok genin fonksiyonun anlaşılması gibi amaçlarla çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır. Domates bitkisinin diploit bitki yapısı, yüksek kaliteli genom dizisi, kısa üretim süresi ve verimli transformasyon yöntemlerinin bulunması bu çalışmalarda sıklıkla kullanılmasının nedenleri arasındadır [11]-[13]. Çeşitli domates türlerine *Agrobacterium* aracılı gen transformasyonunu ilk defa McCormick ve arkadaşları gerçekleştirmiştir [14]. O çalışmadan günümüze kadar kotiledonlar, hipokotiller ve yapraklar gibi çeşitli eksplantlar kullanılarak farklı domates çeşitlerinde çeşitli transformasyon protokolleri geliştirilmiştir [15] -[18]. Bitkiye yüksek verimde transformasyon süreci farklı faktörlere bağlıdır. Kültür veya ön-kültür besi ortamı (kullanılan fitohormonların türü ve konsantrasyonu, antibiyotiklerin türü ve konsantrasyonu), kullanılan *Agrobacterium* suşu ve eksplant türü transformasyon yüzdesini etkilemektedir [19],[20].

*Solanum lycopersicum*'da ilk CRISPR uygulaması 2014 yılında ARGONAUTE 7 geni üzerinde gerçekleştirilmiştir. ARGONAUTE 7 geni nakavt edilmiş ve mutant bitkilerde fenotipik etki gözlemlenmiştir [21]. Günümüze kadar abiyotik ve biyotik streslere karşı direnç, meyve olgunlaşması, uzun raf ömrü, partenokarpik meyve üretimi gibi farklı amaçlarla CRISPR/cas9 sistemi domateste kullanılmıştır (Tablo 2.1). Şekil 2.1'de görüldüğü gibi domateste CRISPR/Cas9 uygulamaları, sgRNA tasarımı, mutasyon taramasına kadar olan farklı basamakları içerir. Kullanılacak olan bitki ve eksplant çeşidine göre farklılıklar olmakla birlikte temelde bu basamakları içermektedir. İlk olarak hedeflenen gen dizisine spesifik sgRNA tasarlanır. Daha sonra kullanılacak olan

vektör oluşturulur ve *Agrobacterium*'a transformasyonun ardından da bitkiye transformasyonu gerçekleştirilir. Ardından eksplantlar seçici besiyerine aktarılır ve rejenere olan bitkiler seraya aktarılır. Büyüyen bitkilerden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra dizileme ile mutasyon taraması gerçekleştirilir.

Tablo 2.1: Domates bitkisinde CRISPR/Cas teknolojisinin mevcut uygulamaları.

| Hedeflenin Gen          | Hedeflenen Özellik                                 | Refs. |
|-------------------------|----------------------------------------------------|-------|
| <b>CP</b>               | Domates sarı yaprak kıvrılma virüsüne karşı direnç | [22]  |
| <b>MLO1</b>             | Külleme hastalığına karşı direnç                   | [23]  |
| <b>MAPK3</b>            | Gri küf hastalığına yatkınlık                      | [24]  |
| <b>JAZ2</b>             | Bakteriyel leke hastalığına karşı direnç           | [25]  |
| <b>BZR1</b>             | Domateste sıcaklık stresi toleransı                | [26]  |
| <b>PSY1</b>             | Sarı renkli domates                                | [27]  |
| <b>MYB12</b>            | Pembe renkli domates üretimi                       | [28]  |
| <b>ANT2</b>             | Mor renkli domates                                 | [29]  |
| <b>ALC</b>              | Uzun raf ömrü                                      | [30]  |
| <b>AGL6</b>             | Partenokarpik meyve üretimi                        | [31]  |
| <b>GAI</b>              | Cüce domates bitkilerinin üretimi                  | [32]  |
| <b>BOP1,BOP2</b>        | Erken çiçeklenme                                   | [33]  |
| <b>SP, OVATE,</b>       | Morfoloji, domates büyüklüğü ve likopen sentezi    | [34]  |
| <b>RIN locus</b>        | Meyve olgunlaşması                                 | [35]  |
| <b>SIHyPRP1</b>         | Abiyotik stres toleransı                           | [36]  |
| <b>Slddm1a</b>          | DNA metilasyonu                                    | [37]  |
| <b>SIGAD2 ve SIGAD3</b> | $\gamma$ -Aminobütirik asit (GABA)                 | [38]  |



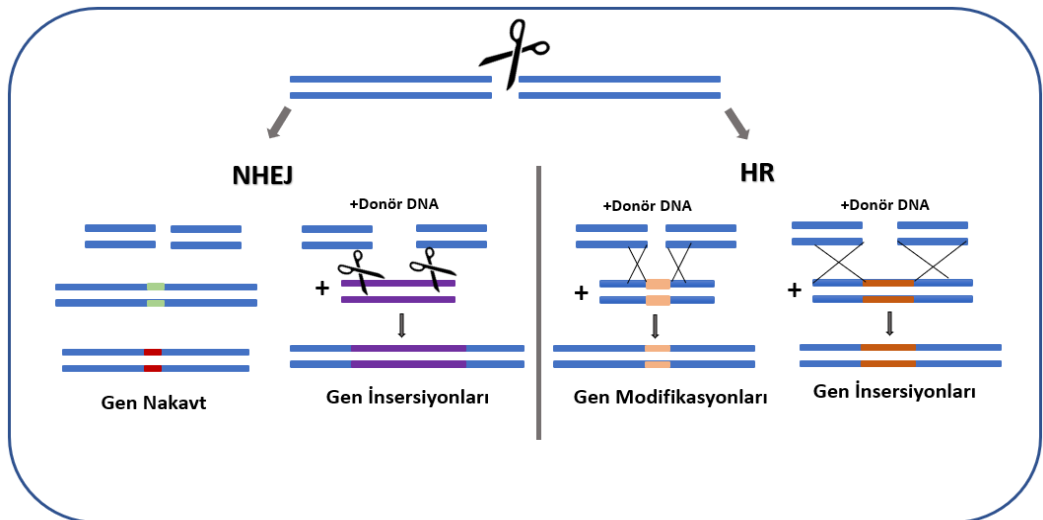
Şekil 2.4: Domates bitkisinde CRISPR/Cas9 teknolojisi uygulanma basamakları.

## 2.2. Genom Düzenleme Yöntemleri

Genom düzenleme ya da gen düzenleme yöntemleri, genetik materyaller üzerinde değişiklik yapabilmek için kullanılan teknolojilerdir. Günümüze kadar genom düzenlemeye yönelik çok farklı yaklaşımlar geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntemler genom üzerinde belirli genlerin çıkarılması, eklenmesi veya genom üzerindeki diğer değişiklikleri kapsamaktadır [39], [40]. Bu kapsamda ilk genetik çalışmalar spontan mutasyonların keşfine dayanmaktadır. Daha sonra yapılan çalışmalarla radyasyon ve

kimyasal maddeler ile genomda rastgele oluşan mutagenез oranının artırabileceği gösterilmiştir [41], [42]. Ayrıca bazı organizmalarda indüklenen transpozon insersiyonları üzerine çalışmalar yapılmıştır. 1970'lere kadar yapılan çalışmalar genom üzerinde yapılan rastgele mutasyonlara dayanmaktaydı. 1970 ve 1980'lerde ilk hedefli genomik değişiklikler mayalarda ve farelerde gerçekleştirilmiştir [43], [44]. Günümüze kadar istenen herhangi bir hedefte çift zincirli kırık (DSB) oluşturmak üzere programlanabilen üç nükleaz sınıfı geliştirilmiştir: çinko parmak nükleazları (ZFN'ler), transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleazlar (TALEN'ler) ve CRISPR-Cas.

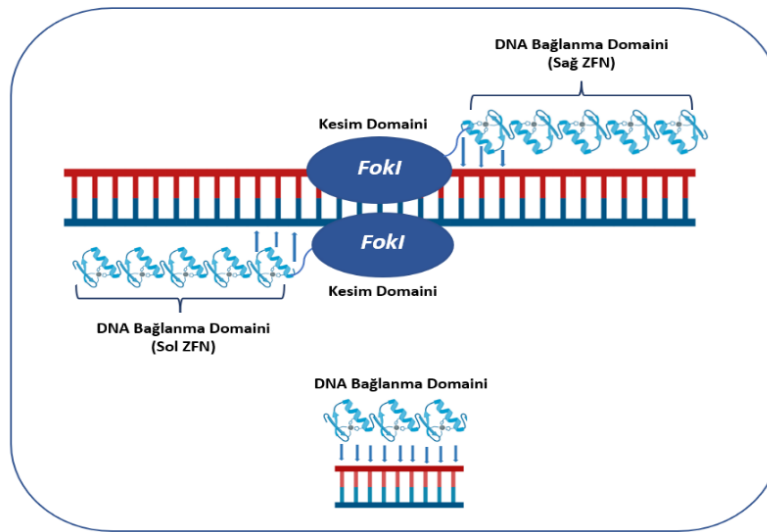
Genom düzenleme iki temel DNA onarımına dayanmaktadır: homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) ve homolog rekombinasyon ile tamir (HDR). Genellikle NHEJ genetik nakavtlar oluşturan çerçeve kayması mutasyonlarına sebep olurken, HDR ise gen değiştirme, ekleme ve çeşitli füzyon proteinleri oluşturmak için kullanacağımız yöntemlere sahiptir (Şekil 2.2). NHEJ hataya meyilli bir onarım olmakla birlikte genellikle rastgele baz çiftlerinin eklenmesi veya silinmesi ile gen nakavtına neden olur. Aynı zamanda NHEJ ile eş zamanlı olarak nükleaz ile kesilen bir donör DNA ile gen eklenmesi de sağlanabilir. HR aracılı onarım ile hem bir gen modifiye edilebilir hem de gen eklenmesi sağlanabilir [45], [46].



Şekil 2.2: Bölgeye özgü nükleazlar ile NHEJ veya HR aracılı genom düzenleme.

### 2.2.1. Çinko Parmak Nükleazlar (Zing Finger Nuclease: ZFN)

Yüksek verimde genom düzenleme için muhtemel ilk teknik olan çinko parmak nükleazlar (ZFN) 1985 yılında keşfedilmiştir [47]. ZFN'ler iki bölgeden oluşur: DNA bağlanma bölgesi (DNA binding domain) ve kesim domaini (nükleaz domaini). DNA'ya bağlanan kısım olan çinko parmak (ZF), korunmuş bir  $\beta\beta\alpha$  konfigürasyonunda yaklaşık 30 amino asitten oluşur [48].  $\alpha$ -sarmalının yüzeyindeki birkaç amino asit, DNA'nın ana oluğundaki (major groove) 3 bp ile temas edip 9-18 bp'lik DNA dizilerini tanır [49]. ZFN'lerin kesim bölgesi FokI endonükleazdan oluşur ve dimerizasyon yoluyla çift zincirli DNA'yı kesebilir (Şekil 2.3) [50]. Oluşan çift zincir kırıkları (DSB) NHEJ (Non-Homolog Uç Birleşmesi) ve HR (Homolog Rekombinasyon) DNA tamir mekanizmasıyla tamir edilebilir. DSB oluşumu ve ardından NHEJ onarımı nükleotit baz çifti eklemeleri veya silmeleri yoluyla gene özgü mutasyonlara neden olabilir. Aynı şekilde HDR (homolojiye yönelik onarım) yoluyla kesim bölgesini çevreleyen dizilere homolog olan donör DNA şablonları ile spesifik DNA dizisi modifikasyonları yapılabilir [51]. ZFN teknolojisi kullanarak gerçekleştirilen ilk mutagenез *Drosophila melanogaster*' in somatik eşey hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Günümüze kadar *Drosophila melanogaster*, *C. elegans*, zebra balığı olmak üzere Arabidopsis, domates, tütün, mısır gibi birçok bitkide mutasyonlar oluşturulmuştur [51]–[54].



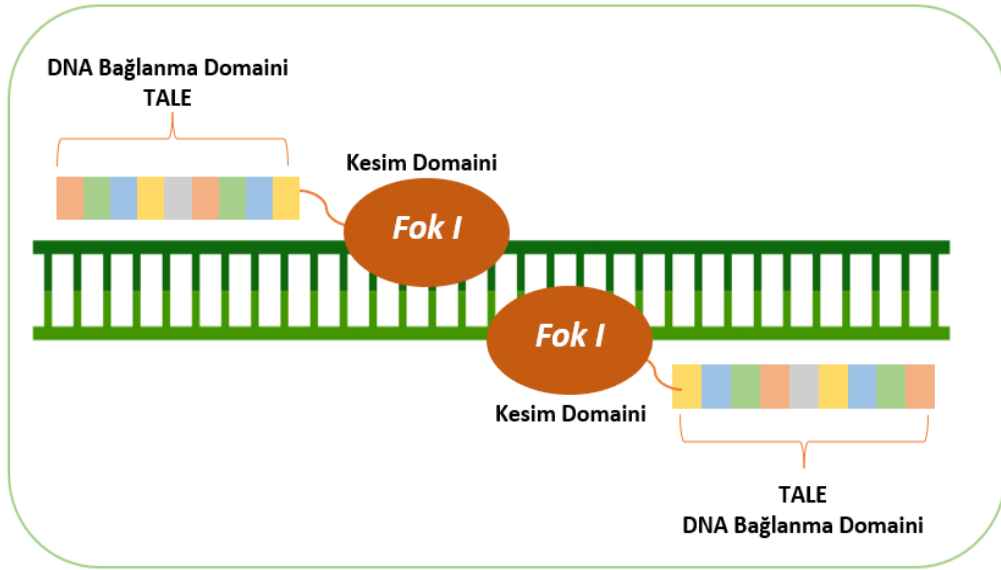
Şekil 2.3: Çinko Parmak Nükleazlar (ZFN) mekanizması.

### 2.2.2. Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Efektör Nükleazlar (TALEN)

TALEN'ler (Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Efektör Nükleazlar) de ZFN'ler gibi iki bölgeden oluşur: DNA bağlanma bölgesi ve *FokI* nükleaz bölgesi. Transkripsiyon aktivatörü benzeri efektörler (TALE'ler) olarak bilinen bu DNA bağlanma alanı, bir bitki patojeni olan *Xanthomonas* bakterisinden türetilmiş olup DNA'nın tek bir baz çiftini tanıyan 33-35 amino asit tekrar alanı içerir [55], [56]. TALE özgünlüğünü "repeat variable di-residue (RVDs)" olarak adlandırılan 12. ve 13. pozisyonlarda bulunan amino asitler belirler. Hedeflenen DNA bölgesinde kesim yapmak için TALEN'lerin dimerize olması gerekir. Dimerizasyondan sonra FokI endonükleaz DNA'nın çift ipliğinde kırıklar oluşturur [57]. Oluşan DSB'ler ZFN'lerde olduğu gibi NHEJ ya da HR tamiri ile çeşitli organizmalarda genler üzerinde değişiklikler yapılabileceği gösterilmiştir (Şekil 2.4) [58], [59].

Transkripsiyon aktivatör benzeri (TAL) efektörleri keşfi 2009 yılında gerçekleşmiştir [60]. 2010 yılında, bir transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör (TALE) ve restriksiyon endonükleaz FokI'nin katalitik alanının füzyonları olan TALEN geliştirildi. Günümüze kadar birçok organizmada TALEN'ler ile genom düzenleme çalışmaları yapılmıştır. 2015 yılında kanseri tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılan genom düzenleme aracı oldu. Bitkiler üzerinde ise TALEN teknolojisi kullanılarak yüksek verimde ürün elde edilmesi, özellikle yüksek ekonomik değere sahip bitkilere hastalık direnci kazandırılması gibi farklı amaçlarla çalışmalar yapılmıştır. 2019 yılında TALEN ile genomu düzenlenmiş ilk ürün soya fasulyesi pazara sunulmuştur [61], [62] [63].

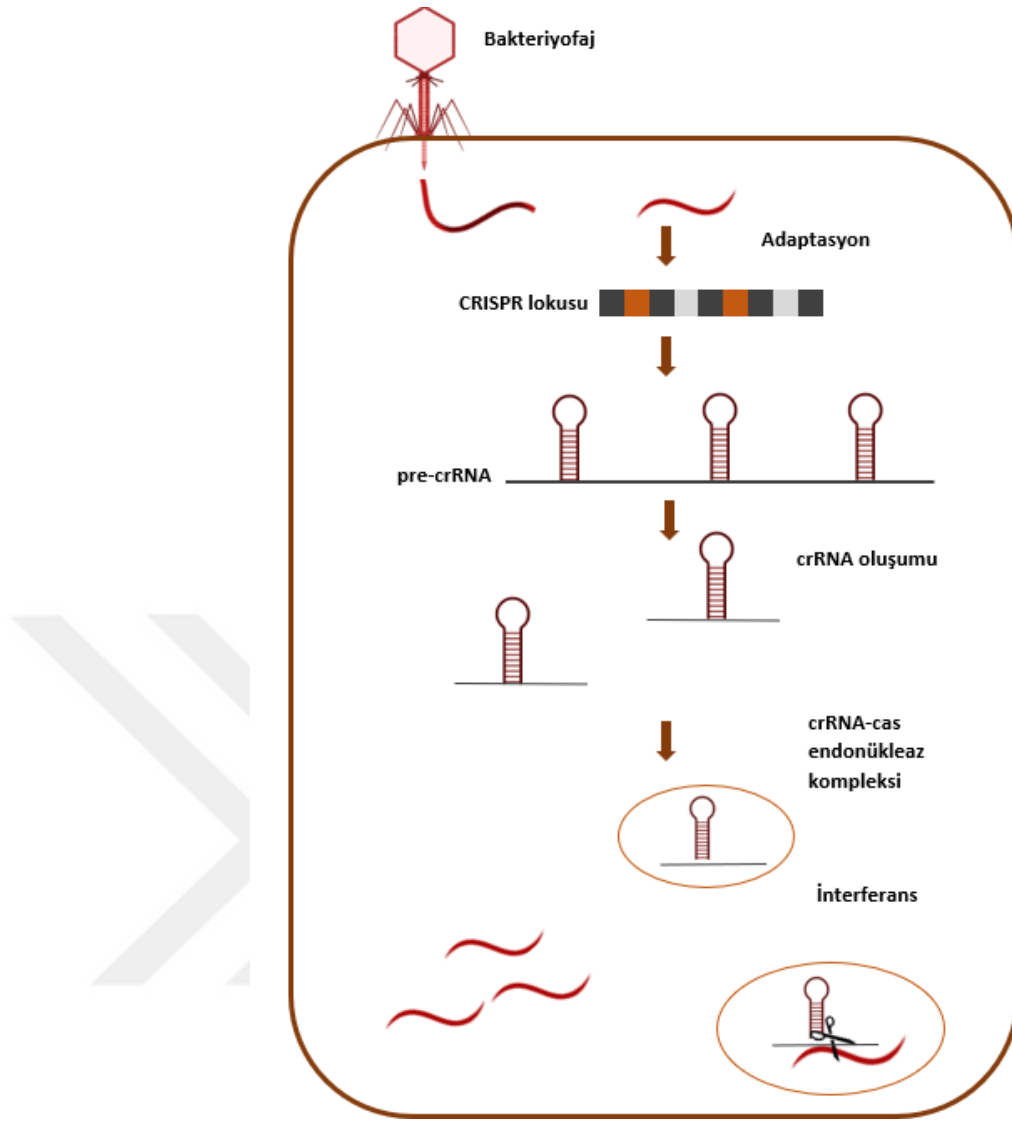
ZFN'lere göre TALEN sisteminin daha az toksik olmak, mühendisliklerinin daha kolay olması gibi avantajları vardır. Fakat tekrarlayan TALE dizisi, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yoluyla sistemin oluşturulmasını zorlaştırmaktadır. Bunun için bitkiler de dahil olmak üzere birçok organizmada genom düzenleme için TALEN teknolojisinin hızlı bir şekilde benimsenmesini sağlayan, büyük çoğunlukla Golden gate klonlamasına dayanan yöntemler geliştirilmiştir [64].



Şekil 2.4: Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Efektör Nükleazların (TALEN) mekanizması.

### 2.2.3. CRISPR/cas9 (Clustered regulatory interspaced short palindromic repeat)

CRISPR/cas9 (Clustered regulatory interspaced short palindromic repeat), hedeflenen genom üzerinde modifikasyonlar yapmayı sağlayan bir genom düzenleme sistemidir. “Düzenli Aralıklı Palindromik Tekrar Kümeleri” olarak tanımlanan CRISPR sistemi, yabancı genetik elementleri parçalamak için RNA aracılı nükleazları kullanan mikrobiyal bir adaptif bağışıklık sisteminin bir parçasıdır. Bakteri ve arkelerde bu süreç temelde 3 adımda gerçekleşir. İlk adım olan adaptasyon sürecinde, yabancı nükleik asitlerin kısa parçaları protospacer olarak adlandırılan CRISPR lokusu üzerinde geçmiş enfeksiyonların bir hafızasını oluşturmak üzere depolanır. CRISPR lokusuna eklenen bölgeler, pre-crRNA olarak bilinen öncül CRISPR RNA'lara transkripsiyonuna takiben, elde edilen pre-crRNA'lar olgun crRNA'lara dönüştürülmek üzere işlenir. Daha sonra interferaz olarak bilinen son adımda, crRNA'lar cas endonükleazlar tarafından bağlanır ve yabancı nükleik asitleri hedefler (Şekil 2.5) [65], [66].

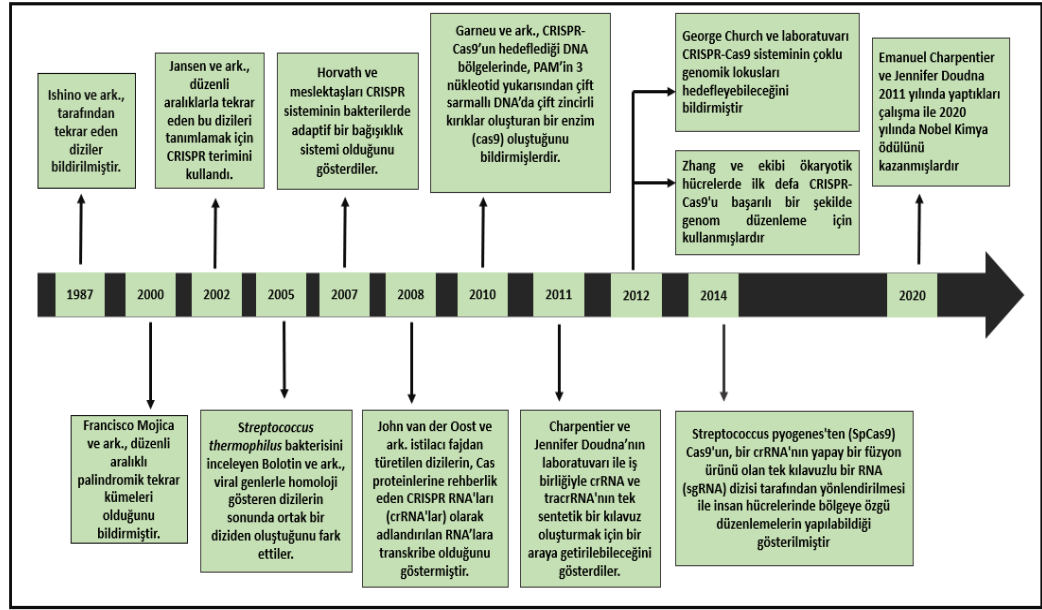


Şekil 2.5: CRISPR/cas immün sisteminin biyolojisi.

CRISPR dizilerine yönelik ilk ipucu, 1987 yılında fosfat metabolizmasında yer alan genlerin analizi sırasında *E.coli* genomunda 29 nükleotitten oluşan beş homolog sekans bulunmasına dayanmaktadır. Daha sonraki yıllarda Francisco Mojica ve ark., iki *Haloferax* türünde düzenli aralıklı palindromik tekrar kümeleri olduğunu bildirmiştir. 2002 yılına gelindiğinde Jansen ve ark., düzenli aralıklarla tekrar eden bu dizileri tanımlamak için CRISPR terimini kullanmıştır [67][68]. 2005'te bağımsız olarak çalışan iki grup, eş zamanlı olarak bu dizilerin bakteriyofaj genomunda bazı bölgelerle homoloji gösterdiğini bildirmiştir [69], [70]. *Streptococcus thermophilus* bakterisini inceleyen Bolotin ve ark., Viral genlerle homoloji gösteren bu dizilerin sonunda ortak bir diziden oluştuğunu fark etmişlerdir. Bu dizi daha sonra "protospacer bitişik motifi

(PAM)” olarak adlandırılan hedef tanıma dizisi olarak tanımlanmıştır [71]. 2007 yılında Horvath ve meslektaşları *S. thermophilus* üzerinde gerçekleştikleri çalışmalarında CRISPR sisteminin bakterilerde de adaptif bir bağışıklık sistemi olduğunu gösterdiler [72]. Daha sonraki yıllarda bilim insanları bu adaptif bağışıklık sisteminin nasıl çalıştığına dair sonuçlar elde etmek için çalışmalar yapmaya başladılar. 2008 yılında John van der Oost ve arkadaşları istilacı fajdan türetilen dizilerin, Cas proteinlerine rehberlik eden CRISPR RNA'ları (crRNA'lar) olarak adlandırılan RNA'lara transkribe olduğunu göstermiştir [72]. 2010 yılına gelindiğinde Garneau ve meslektaşları, *Streptococcus thermophilus* bakterisini kullanarak faj ile yaptıkları çalışmalarda CRISPR-Cas9'un hedeflediği DNA bölgelerinde, PAM'in 3 nükleotid yukarısından çift sarmallı DNA'da çift zincirli kırıklar oluşturan bir enzim (cas9) oluştuğunu bildirmişlerdir [73]. Fakat hala sistemin nasıl çalıştığına dair eksik parçalar bulunmaktaydı. 2011 yılında, Emmanuelle Charpentier *Streptococcus pyogenes* 'da crRNA'nın yanı sıra trans-aktif edici CRISPR RNA (tracrRNA) olarak adlandırılan RNA'nın varlığını göstermişlerdir. Charpentier ve Jennifer Doudna'nın laboratuvarlarının iş birliğinde yapılan çalışmalar sonucunda, crRNA ve tracrRNA'nın tek sentetik bir kılavuz oluşturmak için bir araya getirilebileceğini ve CRISPR-Cas9 sisteminin hücre ve organizmaların genomu üzerinde değişiklikler yapmak için kullanılabileceğini göstermişlerdir[74]. Emanuel Charpentier ve Jennifer Doudna yaptıkları bu çalışma ile 2020 yılında Nobel Kimya ödülünü kazanmışlardır.

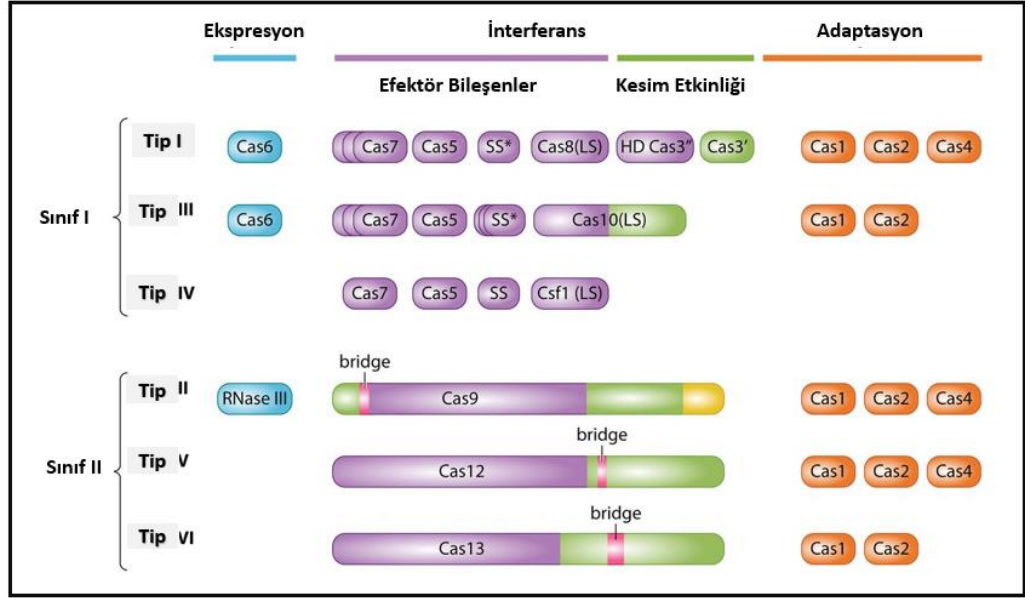
Zhang ve ekibi ökaryotik hücrelerde ilk defa CRISPR-Cas9'u başarılı bir şekilde genom düzenleme için kullanmışlardır. Aynı dönemlerde George Church ve laboratuvarı CRISPR-Cas9 sisteminin çoklu genomik lokusları hedefleyebileceğini bildirmiştir[75]. 2014 yılında *Streptococcus pyogenes*'ten (SpCas9) Cas9'un, bir crRNA'nın yapay bir füzyon ürünü olan tek kılavuzlu bir RNA (sgRNA) dizisi tarafından yönlendirilmesi ile insan hücrelerinde bölgeye özgü düzenlemelerin yapılabildiği gösterilmiştir [76] O zamana kadar ki çalışmalar CRISPR/cas sisteminin genom mühendisliği için potansiyel uygulanabilirliğini göstermekteydi. Şimdiye kadar *S. pyogenes* CRISPR-Cas9 sisteminin farklı türdeki canlılar için bölgeye özgü modifikasyonlar, gen nakavtları veya değiştirmeleri, gen ifadesinin kontrolü gibi amaçlarla çok sayıda çalışma yapılmıştır [77] [78]. Ayrıca arkeler ve bakterilerde çeşitli özgülük ve özelliklere sahip farklı CRISPR-Cas sistemleri geliştirilmiştir.



Şekil 2.6: CRISPR/cas9 sisteminin tarihsel gelişimi.

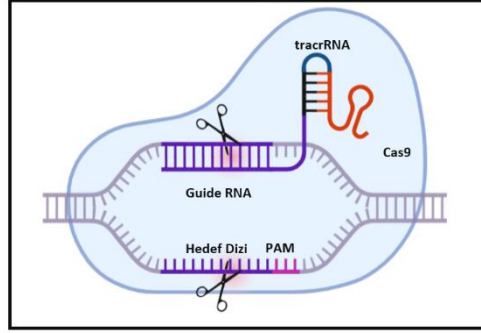
### 2.2.3.1. CRISPR/cas Sisteminin Çeşitliliği ve Sınıflandırılması

Bakteri ve arkelerde farklı suçlar arasında CRISPR ve cas genlerinin çeşitliliği ve dağılımı önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Bu farklılıkları temel alarak genom mühendisliği çalışmaları ile farklı CRISPR–Cas sistemleri geliştirilmiştir [79]–[81]. CRISPR-Cas sistemleri, CRISPR lokusu, sahip olduğu Cas genleri, crRNA’nın bileşimi veya işlenmesi ve işlevlerine bağlı olarak farklı sınıflara ve alt tiplere ayrılmıştır. 2015 yılında 5 tip ve 16 alt tip olarak sınıflandırma yapılırken günümüzde 2 sınıf, 6 tip ve 33 alt tip olarak sınıflandırılmaktadır[82]. Sınıf 1 (tip I, III, IV) nükleazlar çoklu protein nükleazları iken, sınıf 2 (tip II, V, VI) nükleazları tek bir protein görev almaktadır (Şekil 2.7) [83].

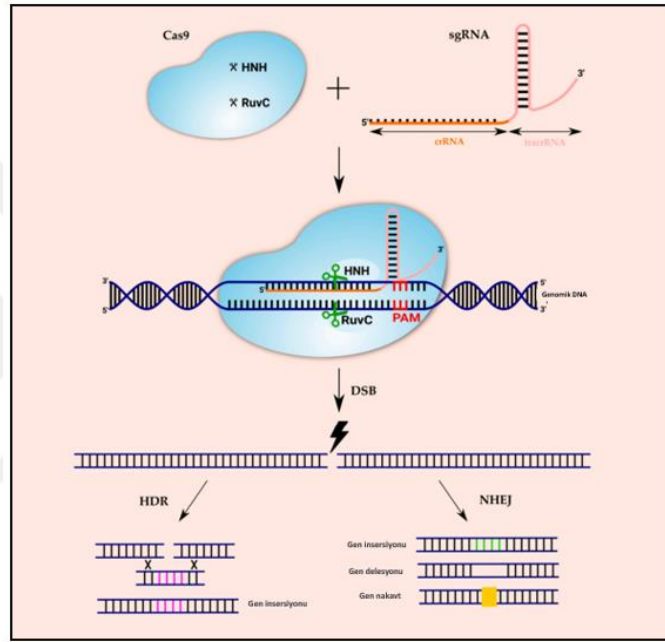


Şekil 2.7: CRISPR/Cas bağışıklık sisteminin sınıflandırılması.

Günümüzde CRISPR çalışmalarında en yaygın kullanılan Sınıf II sistemler, efektör protein olarak Cas9 kullanan tip II'lerdir [84]. Cas9 ortologları, RuvC benzeri endonükleaz alanına ek olarak (RuvC-I, II ve III alt alanlarından oluşan) bir HNH (His-Asn-His) endonükleaz alanı içermektedir [85]. Ayrıca Cas9 proteinleri arasındaki homolojide değerlendirilerek diğer Cas proteinlerinin varlığı ve yokluğuna göre farklı alt tiplere ayrılmaktadır. En yaygın kullanılan Cas9, *Septococcus pyogenes*'ten (SpCas9) izole edilmiştir [86]. Cas9 proteini RuvC alanı ve DNA dizilerini parçalayan HNH alanı olmak üzere iki nükleaz alanı içerir. Farklı Cas9 ortologları genom düzenleme çalışmaları için genetik mühendisliği çalışmalarıyla yeniden tasarlanmıştır. CRISPR/cas9 sistemi sgRNA ve Cas9 proteininden oluşmaktadır. sgRNA, trans-aktive edici RNA'yı (tracrRNA) ve crispr RNA'yı (crRNA) içermektedir (Şekil 2.8). Cas9 endonükleazın hedef bölgede kesim yapılabilmesi için PAM (protospacer adjacent motif) kısa bir diziye ihtiyaç duymaktadır. Cas9 kendi hedef dizinin aşağı akışında bulunan PAM dizisini tanıdığı anda, Cas9- sgRNA kompleksi hedef bölgeye bağlanıp hedef dizide bir DSB oluşturur (Şekil 2.9). DNA'daki çift zincirli kırılma (DSB) oluşur ve daha sonra uygun bir donör varsa homolojiye yönelik onarım (HDR) yolu ile veya homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) ile onarılır. Farklı Cas9 ortologları için farklı PAM dizileri vardır ve SpCas9 için PAM dizisi 5'-NGG-3' (N = A, T, C, G) şeklindedir [87],[88].



Şekil 2.8: sgRNA-Cas9 kompleksi.



Şekil 2.9: CRISPR–Cas 9 sistem moleküler mekanizmasının şematik diyagramı.

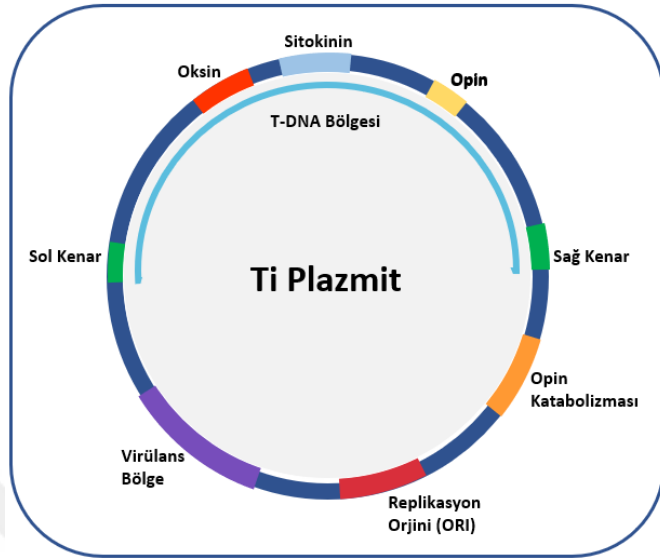
CRISPR/Cas9 sistemi programlanabilir genom düzenleme araçları olan TALEN ve ZFN araçlarına kıyasla daha ucuz ve kolaydır. ZFN ve TALEN araçlarında kullanılan nükleaz, DNA üzerinde DSB oluşturmak için dimerizasyona ihtiyaç duymaktadır. ZFN ve TALEN'lerin en büyük dezavantajı hedef dışı bölgelerde istenmeyen mutasyonların olmasıdır. CRISPR/cas9 sisteminde ise Cas9 ile sgRNA doğrudan etkileşiminde ölçüde Watson-Crick baz eşleşmesinden dolayı sekans özgünlüğüne sahiptir [88], [89].

### 2.3. *Agrobacterium* Aracılı Bitki Transformasyonu

Transgenik bitkiler elde etmek için *Agrobacterium* aracılı gen transfer yöntemi yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. *Agrobacterium tumefaciens* gram negatif bir bakteridir ve 5.67 Mb genom büyüklüğüne sahiptir. T-DNA olarak aktarılan DNA'sının bir kısmını bir konukçu bitkinin genomuna aktarabilir [90]. *Agrobacterium* aracılı gen transferi; bakteriyel virülans sisteminin indüklenmesi, T-DNA'nın üretilmesi, T-DNA'nın konak hücre çekirdeğine transferi, T-DNA'nın bitki genomuna entegrasyonu ve T-DNA genlerinin ekspresyonu olmak üzere temelde 5 adımda gerçekleşir., T-DNA virA, virB, virC, virD, virE, virF ve virG lokuslarını içeren virülans (vir) bölgesini içerir. VirA ve virG proteinleri, vir genlerinin ekspresyonunu düzenlemektedir. VirB, VirC, VirD, VirE ise T-DNA'nın *A. tumefaciens*'ten konak bitki hücrelerine taşınması ve entegrasyonunda rol almaktadır. Bitki tarafından salgılanan fenolik bileşikler (asetosiringon gibi) VirA tarafından saptanır ve VirG'yi fosforile eder. Fosforilasyon ile aktive olan VirG diğer vir genlerinin transkripsiyonunu indükler ve tek sarmallı T-DNA üretilir [91] [92]. Daha sonra T-DNA, VirD2'ye kovalent olarak bağlanır ve efektör protein olan VirD5, VirE2, VirE3 ve VirF kompleksi bakteri hücrelerinden bitki hücrelerine aktarılır. Ardından çekirdekte işlenen T-DNA bitki genomuna entegre olur [93].

Vir bölgesi, Ori bölgesi, Opn bölgesi ve T-DNA bölgesi içeren Ti plazmidi, *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinden bitki genomuna genetik materyal aktarılmasını sağlar. Ti plazmiti üzerinde bulunan vir bölgesi T-DNA aktarımında görevliken, Ori bölgesi replikasyon orjinidir. Opn bölgesi, çeşitli opinlerin parçalanmasında görev alan gen bölgesidir. T-DNA bölgesi, transfer edilen DNA bölgesidir ve yaklaşık 20.000 bp uzunluğundadır. Ti-plazmiti çeşitli biyoteknolojik ve genetik çalışmalarda kullanılmaktadır. *Agrobacterium* aracılı bitki transformasyonu ilk defa 1983 yılında gerçekleştirilmiştir. Başarılı bir transformasyonun gerçekleşmesi için çeşitli faktörler etkilidir; bitki genotipi, uyarıcı bileşikler, besiyeri ortamı, eksplant tipi, çevresel faktörler. Bu faktörler

göz önüne alınarak farklı bitki türlerinde T-DNA transfer süreci araştırılmış ve farklı bitkiler için çeşitli protokoller oluşturulmuştur.



Şekil 2.10: Ti plazmiti fiziksel haritası.

## 2.4. Coiled-Coil Domain İçeren 124 (Ccdc124) Proteini

Ökaryotlarda korunmuş olarak bulunan Ccdc124 proteini, sarılı-sarmal bölge (CCD) içeren RNA bağlayıcı bir proteindir. 2013 yılında Telkoparan ve arkadaşları tarafından keşfedilen ve karakterizasyona yönelik çalışmaları yapılan Cdc124 proteini, memeli hücre hatlarında yapılan çalışmalarla hücre içi lokalizasyonu interfaz evresinde sentrozomda; mitozun post-anafaz, telofaz ve sitokinez evrelerinde ise orta cisimcikte olduğu gösterilmiştir. Ayrıca geç anafaz/telefoz evrelerinde Rap2 aktivasyonunda görev alan Ras guanin nükleotit değiştirici faktör 1B (RASGEF1B) ile etkileştiği bildirilmiştir. Ccdc124 proteinini kodlayan genin memeli hücre hatlarında susturulması veya aşırı ifade edilmesi durumlarında sitokinezde bozulmaların meydana geldiği ve çok çekirdekli hücrelerin oluştuğu gözlemlenirken, sentrozom oluşumu ve sayısında bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Zebra balığı erken embriyoları kullanılarak yapılan bir diğer öncü çalışmada, Ccdc124 proteinini kodlayan genin ekspresyonunun baskılanmasıyla diğer çalışmaya benzer şekilde çok çekirdekli hücrelerin oluştuğu bildirilmiştir [4].

Kütle spektrometrisi kullanılarak yapılan bir çalışmada Ccdc124'in mayadaki homoloğu Lso2 (late-annotated short open reading frame 2), ribozom ilişkili bir protein olarak tanımlanmıştır. Lso2 ribozomun 40S ve 60S alt birimleri arasındaki bağlanma etkinliğini güçlendirmekle birlikte 25S rRNA ve tRNA ile ribozomun A bölgesinde etkileştiği bildirilmiştir. Daha sonra yapılan in siliko karakterizasyon çalışmalarında CCDC124'ün N-terminalindeki LC (low complexity) bölgelerinin agrega ve dimerik/oligometik durumların oluşumunu düzenleyebildiği gösterilmiştir [2], [3]. Ayrıca Ccdc124'ün stres granülleri, nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili proteinler ile etkileştiği kütle spektrometresi ile tespit edilmiştir. (Merve TUZLAĞOĞLU ÖZTÜRK, Yayına Hazırlanmakta Olan Data). CCDC124 geninin çeşitli türlerdeki homologlarının çoklu dizi hizalaması Şekil 2.11 ve Şekil 2.12'de verildiği gibidir. Hem farklı alemler arasında hem de bitkiler aleminde CCDC124 geni korunmuş bölgelere sahiptir. Daha önce yapılan çalışmalarda sentrozom ve ribozomla etkileştiği gösterilmiştir. Fakat günümüze kadar yapılan çalışmalarda Ccdc124 proteinin hücre içerisindeki hangi biyolojik süreçlerde nasıl rol aldığı hala net olarak belirlenememiştir.



Şekil 2.11: Türler arasında CCDC124 homologlarının çoklu dizi hizalaması.



### 3. MATERİYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1 Bitki Materyali ve Kullanılan Hücreler

Çalışmamızda bitki materyali olarak kullanılan domates tohumları (*Solanum lycopersicum*) E-Z Tohumculuk firmasından ticari olarak temin edilmiştir. Tohumlar Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü bitki büyüme odasında 23°C sıcaklıkta 16/8 saat foto periyot uygulaması ile büyütülmüştür. Bitkiye transformasyon için *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 suşu kullanılmıştır.

##### 3.1.2. Kullanılan Stok Solüsyonlar ve Antibiyotikler

Kullanılan stok solüsyonlar ve antibiyotikler hazırlandıktan sonra kullanımlarına kadar -20 °C 'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.1: Stok solüsyon ve antibiyotiklerin hazırlanışı.

| Stok Solüsyonun Adı           | Hazırlanışı                                                                                                                                                                                                        |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tiamin HCl<br>(1 mg/ml)       | 50 mg tiamin HCl 50 ml dH <sub>2</sub> O içerisinde çözülüp 2 ml olarak alikotlanmıştır.                                                                                                                           |
| Piridoksin HCl<br>(0.5 mg/ml) | 25 mg piridoksin HCl 50 ml dH <sub>2</sub> O içerisinde çözülüp 1 ml olarak alikotlanmıştır.                                                                                                                       |
| Nikotinik asit<br>(0.5 mg/ml) | 25 mg nikotinik asit 50 ml dH <sub>2</sub> O içerisinde çözülüp 1 ml olarak alikotlanmıştır.                                                                                                                       |
| 1000X Nitsch Vitamin          | 0.1 g glisin, 0.5 g nikotinik asit, 0.025 g piridoksin HCl, 0.025 g tiamin HCl, 0.025 g folik asit, 0.002 g biotin dH <sub>2</sub> O içerisinde çözülmüştür ve çözelti pH 7 ayarlanıp 1 ml olarak alikotlanmıştır. |

Tablo 3.1: Devam.

|                           |                                                                                                                                                                                                     |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Trans-Zeatin<br>(1 mg/ml) | 50 mg Trans-Zeatin 2 ml 1 M NaOH içerisinde çözölüp total hacim dH <sub>2</sub> O ile 50 ml'e tamamlandıktan sonra 0.22 µm membran filtre kullanılarak steril edilerek 1 ml olarak alikotlanmıştır. |
| Timentin<br>(350 mg/ml)   | 5.25 g Timentin 15 ml 50 ml dH <sub>2</sub> O içerisinde çözölümüştür. Ardından 0.22 µm membran filtre kullanılarak steril edilip 1 ml olarak alikotlanmıştır.                                      |
| Kanamisin<br>(50 mg/ml)   | 2.5 g Kanamisin 50 ml 15 ml 50 ml dH <sub>2</sub> O içerisinde çözölümüştür. Ardından 0.22 µm membran filtre kullanılarak steril edilip 1 ml olarak alikotlanmıştır.                                |
| Ampisilin<br>(100 mg/ml)  | 5 g ampisilin 50 ml dH <sub>2</sub> O içerisinde çözölümüştür. Ardından 0.22 µm membran filtre kullanılarak steril edilip 1 ml olarak alikotlanmıştır.                                              |
| IAA<br>(1 mg/ml)          | 10 mg IAA 1 ml 1 M NaOH içerisinde çözölüp total hacim dH <sub>2</sub> O ile 10 ml tamamlanmıştır. Ardından 0.22 µm membran filtre kullanılarak steril edilip 1 ml olarak alikotlanmıştır.          |

### 3.1.3. Kültür Ortamları

Kullanılan besiyerleri için aşağıda listelenen ortam bileşenleri litre bazında belirtilmiştir. Sterilizasyon için 121°C'de 15 dakika otoklavlanmıştır ve daha sonra besiyerleri 55-60 °C kadar su banyosunda soğutulmuştur. Kullanılan petri başına 25 ml besiyeri ve Magenta başına 50 ml besiyeri kullanılmıştır.

#### 3.1.3.1. Hücre Kültür Ortamları

*E.coli* ve *A.tumafaciens EHA10* bakterileri büyütmek için Luria Broth (LB) besiyeri kullanılmıştır. Katı besiyeri için Tablo3.2'de belirtilen bileşenler sıvı besiyeri için ise agar hariç tabloda belirtilen miktarlarda tartılıp hacim 1 litreye tamamlanmıştır. Ardından otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir.

*Agrobacterium tumefaciens* EHA105 için gentamisin (final konsantrasyonu 10 µg/mL) besiyeri ortamına ilave edilmiştir.

Tablo 3.2: Luria Broth besiyeri içeriği.

| Besiyeri Bileşeni | Miktar<br>(Ağırlık/Hacim) |
|-------------------|---------------------------|
| Tripton           | 10 g/L                    |
| Maya Ekstraktı    | 5 g/L                     |
| NaCl              | 10 g/L                    |
| Agar              | 15 g/L                    |

### 3.1.3.2. Tohum Çimlenme ve Transformasyon Ortamı

Domates tohumlarının çimlenmesi için Tablo 3.3'te verilen besiyeri bileşenleri 1 litre için belirtilen miktarlarda kullanılmıştır. pH 5.8 ayarlandıktan sonra 8 gram agar eklenip 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Tablo 3.3: Tohum çimlenme besiyeri içeriği (½ MSO).

| Besiyeri Bileşeni           | Miktar (Ağırlık/Hacim) |
|-----------------------------|------------------------|
| MS (Murashige ve Skoog) Tuz | 100 mg/L               |
| Miyoinositol                | 2 ml/L                 |
| Tiamin-HCl Stok             | 2 ml/L                 |
| Piridoksin Stok             | 1 ml/L                 |
| Nikotinik Asit Stok         | 1 ml/L                 |
| Sükroz                      | 10 g/l                 |
| pH 5.8                      |                        |
| Agar                        | 8 gram/L               |

Eksplanlantların *Agrobacterium* ile muamale edilmesi için Co-kültür sıvı besiyeri ortamı kullanılmıştır. Tablo3.4'te verilen besiyeri bileşenleri 1 litre için belirtilen miktarlarda kullanılmıştır. pH 5.8 ayarlandıktan sonra 8 gram agar eklenip 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Tablo 3.4: Co-kültür sıvı besiyeri ortamı (%2 MS).

| Besiyeri Bileşeni           | Miktar (Ağırlık/Hacim) |
|-----------------------------|------------------------|
| MS (Murashige ve Skoog) Tuz | 4.3 g/L                |
| Miyoinositol                | 100 mg/L               |
| Tiamin HCl Stok             | 0.4 ml/l               |
| Sükroz                      | 20 g/L                 |
| <b>pH 5.8</b>               |                        |

Ön kültür besiyeri ortamı için Tablo3.5'te verilen besiyeri bileşenleri 1 litre için belirtilen miktarlarda kullanılmıştır. pH 5.8 ayarlandıktan sonra 8 gram agar eklenip 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Ardından son konsantrasyonu 1mg/ml olacak şekilde Trans-zeatin eklenmiştir.

Tablo 3.5: Ön Kültür Besiyeri / Co-Kültür Besiyeri ( 22 ).

| Besiyeri Bileşeni            | Miktar<br>(Ağırlık/Hacim) |
|------------------------------|---------------------------|
| MS (Murashige ve Skoog) Tuz  | 4.3 g/L                   |
| Miyoinositol                 | 100 mg/L                  |
| Nitsch Vitamin Stok          | 1 ml                      |
| Sukroz                       | 20 g/L                    |
| <b>pH 5.8</b>                |                           |
| Agar                         | 8 g/L                     |
| 121°C'de 15 dk sterilizasyon |                           |
| Trans-Zeatin Stok (1 mg/ml)  | 2 ml                      |

### 3.1.3.3. Bitki Rejenerasyon ve Köklendirme Ortamları

Bitki Rejenerasyon ve köklendirme besi ortamları için Tablo 3.6 ve Tablo 3.7’de verilen besiyeri bileşenleri 1 litre için belirtilen miktarlarda kullanılmıştır. pH 5.8 ayarlandıktan sonra 8 gram agar eklenip 121°C’de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Daha sonra konsantrasyonları tabloda verilen şekilde trans-zeatin eklenmiştir. Agrobacterium’u baskılamak için timentin, seçilim için kanamisin antibiyotigi kullanılmıştır.

Tablo 3.6: Birincil rejenerasyon ortamı (2Z).

| Besiyeri Bileşeni            | Miktar<br>(Ağırlık/Hacim) |
|------------------------------|---------------------------|
| MS                           | 4.3 g/L                   |
| Miyoinositol                 | 100 mg/L                  |
| Nitsch Vitamin Stok          | 1 ml/L                    |
| Sukroz                       | 20 g/L                    |
| pH 5.8                       |                           |
| Agar                         | 8 g/L                     |
| 121°C’de 15 dk sterilizasyon |                           |
| Trans-Zeatin Stok (1 mg/ml)  | 2 ml                      |
| Timentin Stok (100mg/ml)     | 3.5 ml                    |
| Kanamisin (50 mg/ml)         | 2 ml                      |

Tablo 3.7: Köklendirme ortamı.

| Besiyeri İçeriği | Miktar<br>(Ağırlık/Hacim) |
|------------------|---------------------------|
| MS               | 4.3 g/L                   |
| Nitsch Vitamin   | 1 ml/L                    |
| Sükroz           | 30 g/L                    |
| pH 5.8           |                           |

Tablo 3.7: Devam.

|                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| Agar                                | 8 g/L  |
| <b>121°C'de 15 dk sterilizasyon</b> |        |
| Timentin (100 mg/ml)                | 3.5 ml |
| Kanamisin (50 mg/ml)                | 1 ml   |

### 3.1.4. Kullanılan Cihazlar ve Kitler

Tablo 3.8: Kullanılan cihazlar.

| Cihaz Adı            | Cihazın Markası Ve Modeli           |
|----------------------|-------------------------------------|
| Laminar Kabin        | Heraeus                             |
| Nanodrop             | Thermo Scientific / EC 1000 XL      |
| Azure Imager         | Thermo Scientific / C150            |
| PZR                  | Biorad/ T100                        |
| Elektroforez Sistemi | Thermo Scientific / EC 1000 XL      |
| İnkübatör            | Nüve/EN300                          |
| Santrifüj            | MPW-260RH                           |
| Shaker               | Wisd Shaking Incubator /WITEG_34009 |
| Su banyosu           | Nüve NB 20/                         |

Tablo 3.9: Kullanılan Kitler.

| Kit İsimleri                | Kit Markası<br>Katolog Numarası |
|-----------------------------|---------------------------------|
| Zyppy™ Plazmid Miniprep Kit | Zymo/D4019                      |
| CloneJET PCR Cloning Kit    | Thermo Scientific™/ K1231       |
| PCR & DNA Cleanup Kit       | BioLabs/ T1030S                 |
| DNA Gel Extraction Kit      | BioLabs/T1020S                  |

### 3.1.5. Kullanılan Kimyasallar

Tablo 3.10: Kullanılan kimyasalların listesi.

| Kimyasalın Adı          | Kimyasalın Markası/Katolog Numarası |
|-------------------------|-------------------------------------|
| Agar                    | Duchefa Biochemie /012290.02        |
| LB Broth Miller         | BD Difco /244620                    |
| MS                      | Duchefa Biochemie /P17840.01        |
| Myoinositol             | Duchefa Biochemie /015677.02        |
| Timentin                | Caisson/ 08202011                   |
| Kanamisin               | Wisent Bioproducts / 400-145-IG     |
| Gentamisin              | Caisson/07192001                    |
| Trans-Zeatin            | Caisson/03192033                    |
| IAA                     | Sigma Aldrich/ I2886                |
| Nikotinik Asit          | Sigma Aldrich 59H0621               |
| Pyridoxine HCl          | Sigma Aldrich 80K1103               |
| Thiamine HCl            | Sigma Aldrich 20K094025             |
| Tris HCl                | Applichem R10532                    |
| $\beta$ -merkaptoetanol | Applichem 9X003976                  |
| CTAB                    | Applichem 0U010499                  |
| NaCl                    | Sigma Aldrich ZBE630V31434          |
| Agaroz                  | Bio Basic Canada L6132170KC         |
| Red Safe                | Intron/ 21141                       |

### 3.1.6. Kullanılan Vektörler ve Primerler

Tablo 3.11: Kullanılan vektörler ve kullanım amaçları.

| Vektör Adı                   | Kullanılma Amacı                                     |
|------------------------------|------------------------------------------------------|
| pYLsgRNA pYLsgRNA-AtU3d      | Kaset vektörü oluşturmak için (U3 promotör).         |
| pYLsgRNA-AtU6-1/LacZ         | Kaset vektörü oluşturmak için (U6 promotör).         |
| PYLCRISPR/Cas9-35-           | CRISPR/cas9 vektörü                                  |
| pJET1.2/blunt Cloning Vector | Sekanslamaya göndermek için PZR ürününü klonlanması. |

Tablo 3.12: Kullanılan vektörler ve nükleotit dizileri.

| Primer Adı  | Nükleotit Dizisi (5'--3') |
|-------------|---------------------------|
| 182/FB-U3   | GTCAGAAGCCGAGAAGCGAGCAG   |
| 182/RB-U3   | AAACCTGCTCGCTTCTCGGCTTC   |
| 203/FB-U6   | ATTGGCCGCAGCAAAGAAAGCCG   |
| 203/RB-U6   | AAACCGGCTTTCTTTGCTGCGGC   |
| U-F         | CTCCGTTTTACCTGTGGAATCG    |
| gR-R        | CGGAGGAAAATTCCATCCAC      |
| pYL PmeI F1 | TGGACGAACGGATAAACCTT      |
| RB-TDNA F   | GAAGGCGGGAAACGACAATC      |
| PI-SceI R   | CTATGTCGGGTGCGGAGAAA      |
| CCDC123-F1  | GAGCGCAAAGACCGTGAATC      |
| CCDC124-R1  | AGTCTCTTCTCGGGATGCCT      |

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. sgRNA Tasarımı

*Solanum lycopersicum* CCDC124 genini susturmak için 1.ekzonu hedef alan iki sgRNA tasarlanmıştır. Uygun sgRNA'ların belirlenmesi için çevrimiçi bir program olan CRISPOR programı kullanılmıştır. sgRNA'lar seçilirken yüksek GC içeriği ve hedef bölge dışı bağlanmaları az olan primerler seçilmiştir. Belirlenen aday sgRNA'lar için self-complementary analizi için RNA Folding Form V2.3 programı kullanılmıştır. Daha sonra en uygun iki sgRNA seçilmiştir. CCDC124-FB adaptör primeri tasarlanmak için seçilen iki gRNA hedef dizisinin U3 promotorü için 5' hedef dizisinin ucuna 5'-GTCA-3' dizisi, U6 promotorü için 5'-ATTG-3' eklenmiştir. CCDC124-RB adaptör primer için seçilen dizilerinin komplementlerinin 5' dizisinin ucuna 5'-AAAC-3' dizisi eklenmiştir.

### 3.2.2. sgRNA Ekspresyon Kasetlerinin Oluşturulması

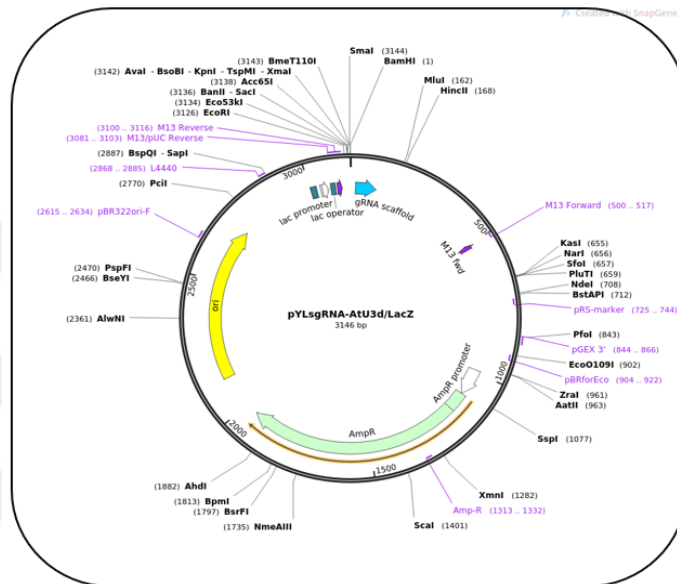
sgRNA ekspresyon kasetinin oluşturulması için pYLsgRNA-AtU3d/LacZ ve pYLsgRNA-AtU6-1 kaset vektörleri kullanılmıştır ( Şekil 3.1 ve Şekil 3.1) .Tasarlanan 182/FB-U3 ve 182/RB-U3 ; 203/FB-U6 ve 203/RB-U6 adaptör primerleri konsantrasyonları 0.1 µM olacak şekilde bir araya getirildikten sonra 98 °C'de 5 dk ve ardından 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra adaptör primerlerle, pYLsgRNA ekspresyon kaset vektörü oluşturmak için 182 ve 203 için ayrı ayrı tablo 3.13'te verilen şekilde kesim/ligasyon reaksiyonu kurulmuştur. Daha sonra reaksiyon termal döngü cihazında 37°C'de 5 dk, 20 °C'de 5 dk 5 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.13: Kesim/ligasyon reaksiyonu için kullanılan bileşenler.

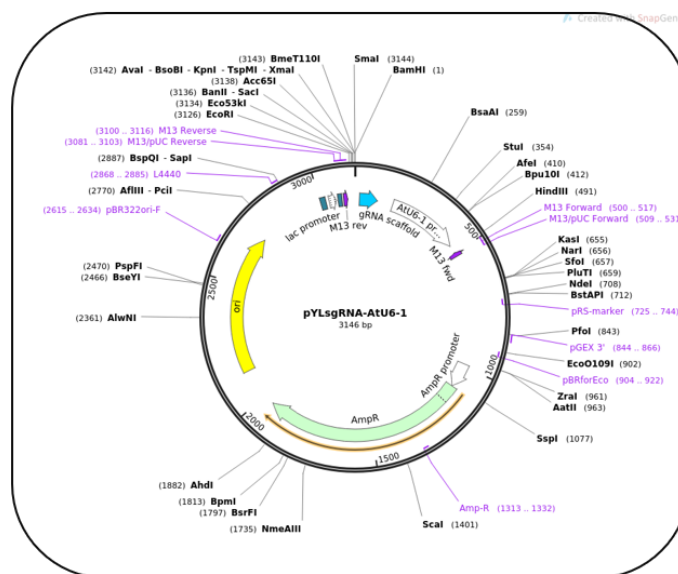
| Reaksiyon Bileşeni                       | Miktarı |
|------------------------------------------|---------|
| 10× CutSmart buffer                      | 1 µL    |
| pYLsgRNA sgRNA kaset plazmiti (20 ng/µL) | 1 µL    |
| Adaptör primer miks                      | 0.5 µL  |

Tablo 3.13: Devam.

|                                   |        |
|-----------------------------------|--------|
| 10× T4 DNA ligaz reaksiyon buffer | 0.5 µL |
| <i>Bsa</i> I (10 U/µL)            | 0.3 µL |
| T4 DNA ligase (20 U/µL)           | 1 µL   |
| ddH <sub>2</sub> O                | 5.7 µL |



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



Şekil 3.2: pYLsgRNA-AtU6-1/LacZ kaset vektörünün fiziksel haritası. (Adgene: Vektör #66203).

Hedef dizileri içeren adaptör primerlerini bir araya getirip tek bir sgRNA ekspresyon kaseti oluşturmak için (182 ve 203 için ayrı ayrı) nested PZR yapılmıştır. Her kaset için ayrı ayrı UF (evrensel ileri Primer)/RP (adaptörlere ait) ve FB (adaptörlere ait)/ gR-R (evrensel geri primer) çiftleri kullanılarak iki PZR reaksiyonu kurulmuştur ( Tablo 3.14 ve Tablo 3.16). Birinci PZR için kalıp olarak daha önce kurulan kesim/ligasyon reaksiyonu 10 kat dilue edilerek Tablo 3.15 ve 3.16’da belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.14: Nested PZR için birinci PZR bileşenleri.

| Reaksiyon Bileşeni      | Miktar |
|-------------------------|--------|
| 5X Q5 Reaksiyon Buffer  | 2 µl   |
| Kesim/Ligasyon Ürünü    | 1 µl   |
| 2.5 mM dNTP             | 1 µl   |
| 10 µM UF veya FP primer | 0.2 µl |
| RP veya gR-R primer     | 0.2 µl |
| Q5 DNA Polimeraz        | 0.1 µl |
| ddH <sub>2</sub> O      | 6,5 µl |

Tablo 3.15: Nested PZR için program koşulları.

| Adım          | Sıcaklık | Süre      |
|---------------|----------|-----------|
| Başlangıç     | 98 °C    | 30 saniye |
| Denatürasyonu |          |           |
| 30 Döngü      | 98 °C    | 10 saniye |
|               | 60 °C    | 15 saniye |
|               | 72 °C    |           |
| Son Uzama     | 72 °C    | 5 dakika  |

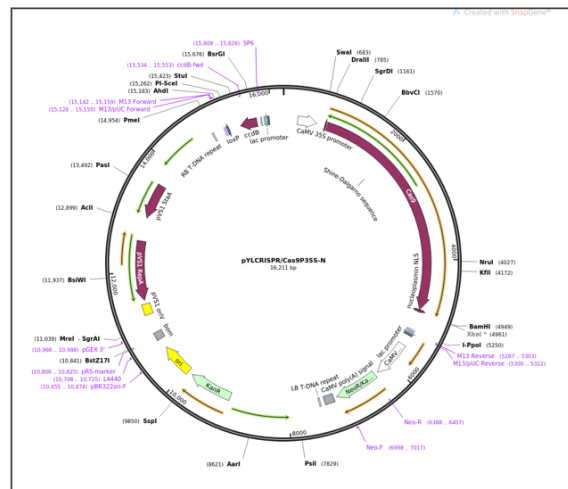
Tablo 3.16: İkinci PZR için kullanılan bileşenler.

| Reaksiyon Bileşeni     | Miktar |
|------------------------|--------|
| 5X Q5 Reaksiyon Buffer | 4 µl   |
| PZR Ürünü (182 için)   | 1 µl   |
| PZR Ürünü ( 203 için)  | 1 µl   |
| 2.5 mM dNTP            | 2 µl   |
| Pps primer             | 0.4 µl |
| Pgs primer             | 0.4 µl |
| Q5 DNA Polimeraz       | 0.2 µl |
| ddH <sub>2</sub> O     | 11 µl  |

İkinci PZR ürünleri %1 agaroz jele yüklenip U.V altında görüntülenmiştir. Daha sonra Zymo-Clean up Kit kullanılarak saflaştırılmıştır.

### 3.2.3. Golden Gate Klonlama

Golden Gate klonlama ile birden fazla DNA fragmanlarının Tip IIS restriksiyon enzimi (Bsal, BsmBI ve BbsI gibi) ve T4 DNA ligazın kullanılması ile bir vektöre klonlanmasına olanak verir [95]. Bu çalışmada ayrı ayrı hazırlanan sgRNA ekspresyon kasetleri pYLCRISPR/Cas9 vektörüne Golden Gate klonlama tekniği ile klonlanmıştır.



Şekil 3.3: pYLCRISPR/Cas9P35S-N plazmiti fiizksel haritası.

Tablo 3.17 Golden Gate klonlama için kullanılan reaksiyon bileşenleri.

| Reaksiyon Bileşeni                  | Miktarı |
|-------------------------------------|---------|
| 10× CutSmart buffer                 | 1 µL    |
| PYLCRISPR/Cas9 plazmidi (100 ng/µL) | 1 µL    |
| PCR Ürünleri (20 ng/ µL)            | 1 µL    |
| 10× T4 DNA ligaz reaksiyon buffer   | 0.5 µL  |
| <i>Bsa</i> I (10 U/µL)              | 1 µL    |
| T4 DNA ligase (40 U/µL)             | 1 µL    |
| ddH <sub>2</sub> O                  | 9.5 µL  |

Kesim/ligasyon reaksiyonu Tablo 3.17’te belirtilen koşullarda kurulmuştur ve termal döngü cihazında 3 döngü 37 °C’ da 10 dk, 10°C’ da 5 dk, 20°C’ de 5 dk, 10 döngü 37 °C da 3 dk, 10°C’ da 5 dakika, 20°C’ de 5 dk reaksiyon koşullarında gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2.4. *E. Coli* ve *Agrobacterium* Kompetant Hücre Hazırlama ve Transformasyon

Bu tez çalışmamızda *E.coli* DH5α suşu ve *Agrobacterium tumafeciens* EHA105 suşu kullanılmıştır. *E.coli* DH5α hücrelerini kompetant hale getirmek için stok *E.coli* DH5α bakteri hücrelerinden 3 ml LB (Luria Broth) içerisinde ön kültür başlatılmıştır ve 37 °C’de, 250 rpm’de çalkalanarak gece boyu (~16 saat) büyütülmüştür. Ardından 250ml LB’ye aşılama yapıp aynı koşullarda OD<sub>(600)</sub> 0.55’e gelene kadar büyütülmüştür. Daha sonra 4000rpm de 4°C’de 10 dakika santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant atılıp pelet 80 ml soğuk Inoue Ultra Competent hücre tamponunda çözülüp tekrar aynı koşullarda santrifüj yapılmıştır. Ardından süpernatant atılıp pelet 20ml soğuk Inoue Ultra Competent Hücre Tamponunda çözülüp üzerine 1.5 ml DMSO eklendikten sonra buzda 10 dk bekletilmiştir. Hemen ardından alikotlanıp sıvı azot içerisinde yaklaşık 2-3 dk bekletilip -80°C muhafaza edilir.

*Agrobacterium tumafasiens* EHA105 kompetant hücresi yapmak için stok *Agrobacterium tumafasiens* EHA105 hücresinden 3 ml LB içerisinde gentamisin (10mg/L) antibiyotiği kullanılarak 30°C’de, 200 rpm’de çalkalanarak ön kültür

başlatılmıştır. Gece boyu büyütülen kültür daha sonra 50 ml LB'ye aşılama yapılarak OD<sub>(600)</sub> 0.5 olana kadar OD takibi yapılmıştır. Daha sonra 3000 rpm'de 5 dk 4°C'de santrifüj yapılmıştır. Süpernatant uzaklaştırılıp pelet 1 ml 20 mM CaCl<sub>2</sub> ile çözülmüştür. Ardından tekrar 3000 rpm'de 5 dk 4°C'de santrifüj yapılmıştır. Pelet %15 gliserol ve 20 mM CaCl<sub>2</sub> içeren karışım karışım ile çözülmüştür. Ardından 100 µl olacak şekilde ependorflara dağıtılarak -80°C'de saklanmıştır.

#### 3.2.4.1. *E. Coli*'ye Transformasyon

Goldan gate klonlama için hazırlanmış kesim/ligasyon reaksiyonun 4 µl'si daha önce hazırlanmış olan 100 µl kompetan *E.coli* DH5α hücre üzerine eklenmiştir ve 30 dk buzda inkübe edildikten sonra ısı şoku için 42°C de 2 dk bekletilmiştir. Hemen ardından buzda 5 dk inkübe edilip üzerine 900 µl LB eklenip 37°C'de 200 rpm'de 1 saat çalkalanarak büyütülmüştür. İnkübasyon sonrasında hücreler santrifüj ile toplanıp kanamisinli (50 µg/mL) LB agara yayılıp gece boyu (~16 saat) büyütülmüştür. Seçilen kolonilerden Tablo 3.18'de belirtilen koşullarda koloni PZR yapılarak rekombinant hücrelerin doğruluğu test edilmiştir. Koloni PZR ürünleri %0.8'lik agaroz jele yüklenip U.V altında görüntülenmiştir. Pozitif çıkan kolonilerden %30 gliserol stok ve Zyppey™ Plazmid Miniprep Kit plazmit izolasyon kiti kullanılarak plazmit izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra plazmit BamHI ile kontrol kesimi yapılmıştır.

Tablo 3.18 Koloni PZR koşulları.

| Bileşen                           | Miktar |
|-----------------------------------|--------|
| 10x HS Prime Taq Polimeraz Buffer | 1 µL   |
| 10 mM dNTP                        | 0.8 µL |
| UF ya da 182-FB                   | 0.2 µL |
| gR-R ve 182-RB                    | 0.2 µL |
| HS Prime Taq DNA polimeraz        | 0.1 µL |
| Template                          | 0.3 µL |
| ddH2O                             | 7.4 µL |

Tablo 3.19: Koloni PZR program koşulları.

| Adım                 | Sıcaklık | Süre      |
|----------------------|----------|-----------|
| <b>Başlangıç</b>     | 95 °C    | 3 dakika  |
| <b>Denatürasyonu</b> |          |           |
| <b>30 Döngü</b>      | 95 °C    | 30 saniye |
|                      | 51 °C    | 30 saniye |
|                      | 72 °C    | 40 saniye |
| <b>Son Uzama</b>     | 72 °C    | 5 dakika  |

#### 3.2.4.2. *Agrobacterium*'a Transformasyon

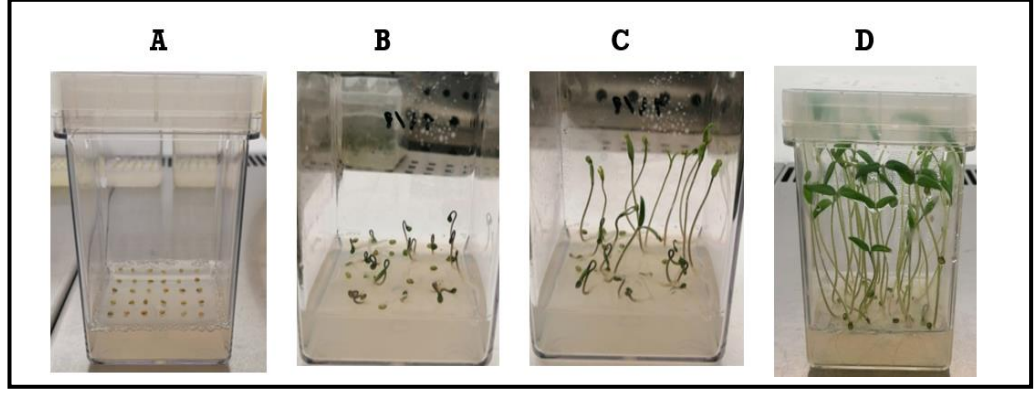
İzole edilen pYLCRISPR/Cas9 plazmitinin *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 transformasyonu için 100 µL kompetent *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 üzerine 1 µg plazmit koyulmuştur. Daha sonra sıvı nitrojen içerisinde 2 dk bekletilip ısı soku için 37°C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Hemen ardından 5 dk buzda bekletilip üzerine 900 LB eklenip 30°C'de 2 saat üretilmiştir. Ardından hücreler santrifüj ile toplanıp gentamisin (10 µg/ml) ve kanamisin (100 µg/ml) içeren LB agara yayılıp 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra çıkan kolonilerden koloni PZR yapıp hücrelerin vektörü alıp almadığı kontrol edilmiştir. Daha sonra %15 gliserol stok hazırlanıp -80°C'de saklanmıştır.

#### 3.2.5. Bitki Doku Kültürü

Bitki doku kültürü çalışmaları için Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü bitki büyüme odası (23°C sıcaklıkta 16/8 saat foto periyot) kullanılmıştır.

### 3.2.5.1. Kotiledon Eksplantlarından Transgenik Domates Hatlarının Üretilmesi

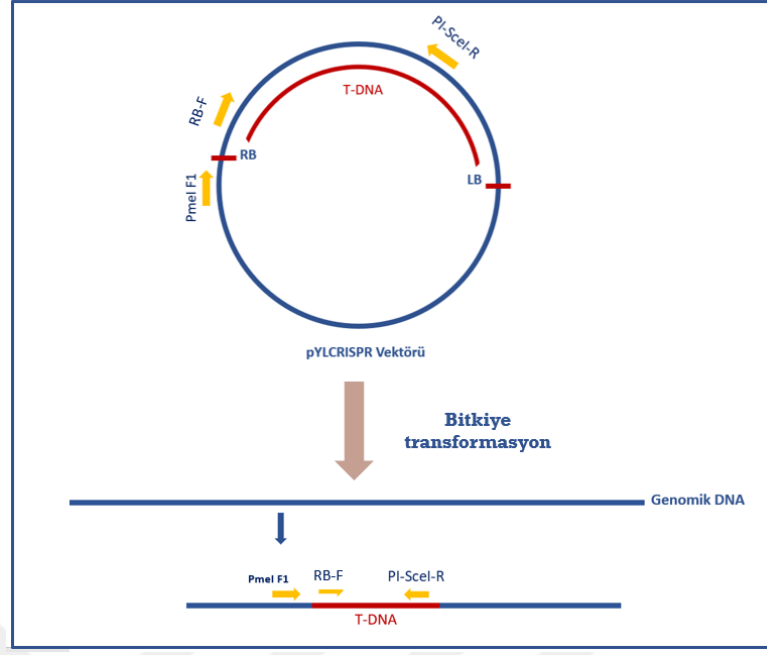
Domates (*Solanum lycopersicum*) tohumları ticari olarak satın alınmıştır. Tohum sterilizasyonu için 1 gram domates tohumu 25 ml %20'lik çamaşır suyu içerisinde 20 dk inkübe edilmiştir. Ardından steril deiyonize su ile 3 kez yıkanıp steril kurutma kağıdı üzerine alınmıştır. Daha sonra önceden hazırlanmış magentaların içindeki çimlenme besiyerine, magenta başına 30 tohum olacak şekilde ekilmiştir. Bitki büyütme odasında 23°C sıcaklıkta 16/8 saat foto periyotta 7 gün büyütülmüştür. Ardından genç kotiletonlar 1 cm kesilerek daha önceden hazırlanmış katı ön-kültür besiyerine her petride 50 eksplant olmak üzere, dış yüzleri besiyerine değecek şekilde yerleştirilmiştir. Petriler 1 gün 23°C'de 16/8 saat foto periyotta bitki büyütme kabininde bekletilmiştir. Eksplantların ön-kültür besiyerine aktarıldığı gün pYLCRISPR/Cas9 vektörünü içeren *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 hücresi, kanamisin (100 µg/ml) ve gentamisin (10 µg/ml) içeren 50 ml LB'ye ekilmiştir. 30°C'de O.D<sub>600</sub> 0.6 olana kadar 200 rpm'de çalkalanarak büyütülmüştür (yaklaşık 16 saat). Daha sonra O.D<sub>600</sub> 0.6 olunca 8300 xg 'd, 20 °C'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Pelet 50 ml sıvı co-kültür besiyerinde çözülmüştür. Ardından her 25 ml içerisine ön-kültür besiyerindeki eksplantlardan 50 eksplant koyulmuştur. Eksplantlar 5 dk sıvı co-kültür besiyerinde inkübe edildikten sonra tekrar katı ön-kültür besi ortamına yerleştirilmiştir. Toplam eksplant sayısının yüzde 10 kadar pozitif ve negatif kontrol ayrılmıştır. Petriler daha sonra 48 saat 19°C'de karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda eksplantlar her petride 25 eksplant olacak şekilde rejenerasyon besiyerine (2Z) aktarılmıştır. Pozitif kontrol için ayrılan eksplantlar kanamisin içermeyen rejenerasyon besiyerine aktarılmıştır. 7 gün 23°C sıcaklıkta 16/8 saat foto periyotta büyütülmüştür. Daha sonra IAA içeren rejenerasyon besiyerine (2Z) aktarılıp 2 hafta aynı koşullarda büyütülmüştür. Ardından zeatin konsantrasyonu yarıya indirip rejenerasyon besiyerine aktarılmış ve her 15 günde bir besiyeri değiştirilmiştir. Bitkiler petri kabına sığmamaya başladığında magentaya aktarılmıştır. Rejenerasyon besiyerine aktarıldıktan yaklaşık 4-6 hafta sonra yeterli büyüklüğe ulaşan bitkiler köklendirme besiyerine aktarılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: Tohumların çimlenmesi. A) Tohumların çimlenme besiyerine ekilmesi, B) Çimlenen filizler 3.gün, C) Çimlenen filizler 5.gün, D) Eksplant alınımına hazır 7 günlük filizler.

### 3.2.6. Transgenik Bitki Hatlarının Belirlenmesi

Transgenik hatların belirlenip daha sonra mutant bitkilerin doğrulanması için ilk olarak bitkilerden DNA izolasyonu, optimize ettiğimiz Dooley ve arkadaşlarının CTAB (setil trimetil-amonyum bromid) protokolü kullanılarak yapılmıştır. İlk olarak bitki örnekleri homonijetör kullanılarak homojenize hale getirilmiştir. Ardından her bir örneğin üzerine 65°C'de bekletilmiş ekstrasyon bufferi 600 (CTAB/%2(v/v)  $\beta$ -merkaptoetanol) eklenip vortekslendikten sonra 15 dk 65°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiş ve üzerine 600  $\mu$ l kloroform/oktanol (24:1, v/v) eklenmiştir. Ardından örnekler 20-25 kez alt-üst edilmiştir ve 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernatant (yaklaşık 500  $\mu$ l) yeni bir tüpe alınıp üzerlerine 250  $\mu$ l 5 M NaCl ve 750  $\mu$ l %95 EtOH eklenip +4°C bir gün bekletilmiştir. Ertesi gün 13.000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıp süpernatant uzaklaştırılıp pelet 1 ml %76 (v/v) etanol ile yıkanmıştır. Ardından tekrar 13.000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıp kuruması için beklenmiştir. Tamamen kuruduktan sonra pelet 30  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O ile çözünmüştür. Daha sonra örneklerin miktarları ve saflıkları Nanodrop ile ölçülmüştür. DNA örnekleri kullanılana kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.5: Transgenik bitkilerin belirlenmesi için tasarlanan primerler.

Transgenik bitkilerin belirlenmesi için bitkiye aktarılan T-DNA bölgesinin içinden ve dışından tasarlanan primerler ile Tablo 3.19 ve 3.20’de belirtilen koşullarda PZR yapılmıştır.

Tablo 3.20: Transgenik bitkilerin belirlenmesi için PZR bileşenleri.

| Bileşen                 | Miktar        |
|-------------------------|---------------|
| 2x HS Prime Taq Pre mix | 5 µL          |
| RB-F                    | 0.2 µL        |
| PI-Scel-R               | 0.2 µL        |
| Template                | 2 µL (150 ng) |
| ddH <sub>2</sub> O      | 2.6 µL        |

Tablo 3.21: Transgenik bitkilerin belirlenmesi için PZR koşulları.

| Adım                 | Sıcaklık | Süre      |
|----------------------|----------|-----------|
| <b>Başlangıç</b>     | 94 °C    | 3 dakika  |
| <b>Denatürasyonu</b> |          |           |
| <b>30 Döngü</b>      | 94 °C    | 30 saniye |
|                      | 51 °C    | 30 saniye |
|                      | 72 °C    | 40 saniye |
| <b>Son Uzama</b>     | 72 °C    | 5 dakika  |

### 3.2.7. Mutant Bitkilerin Doğrulanması

Transgenik bitki hatları belirlendikten sonra mutant bitkilerin doğrulanması için Sanger dizileme yöntemi kullanılmıştır. Sanger dizilemeye örnekler iki farklı şekilde gönderilmiştir. İlk olarak aday mutant bitkilerden genomik DNA izolasyonu yapılmış ve CCDC124-F VE CCDC124-R primerleri Tablo 3.22 ve Tablo 3.23'te belirtilen koşullarda PZR reaksiyonu kurulmuş Daha sonra PZR ürünü BM Labosis firmasına gönderilmiştir. İkinci olarak genomik DNA izolasyonundan sonra PZR yapılmıştır ve ardından PZR ürünü pJET1.2/blunt Cloning Vector kiti kullanılarak pJET1.2 vektörüne klonlanmıştır. Seçici besiyerinde büyüyen kolonilerden koloni PZR yapıp agoroz jelde görüntülenmiştir. Boyut farkı gözlemlenen koloniler belirlenmiştir ve kolonilerden Zyppy™ Plazmid Miniprep Kit kullanılarak plazmit izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra plazmitler dizilenmek için BM Labosis firmasına gönderilmiştir.

Tablo 3.22: Mutant bitkilerin doğrulanması için PZR bileşenleri.

| Bileşen                              | Miktar |
|--------------------------------------|--------|
| Phusion® High-Fidelity DNA Polimeraz | 0,5 µL |
| 5X Phusion HF Bufer                  | 10 µL  |
| 10 mM dNTPs                          | 1 µL   |
| 10 µM CCDC124-F                      | 2,5 µL |
| 10 µM CCDC124-R                      | 2,5 µL |

Tablo 3 .22: Devam.

|                        |         |
|------------------------|---------|
| <b>Template</b>        | 1 µL    |
| <b>dH<sub>2</sub>O</b> | 32,5 µL |

Tablo 3.23: Mutant bitkilerin doğrulanması için PZR koşulları.

| <b>Adım</b>          | <b>Sıcaklık</b> | <b>Süre</b> |
|----------------------|-----------------|-------------|
| <b>Başlangıç</b>     | 98 °C           | 30 saniye   |
| <b>Denatürasyonu</b> |                 |             |
| <b>30 Döngü</b>      | 98 °C           | 10 saniye   |
|                      | 51 °C           | 20 saniye   |
|                      | 72 °C           | 30 saniye   |
| <b>Son Uzama</b>     | 72 °C           | 5 dakika    |

## 4.SONUÇ

### 4.1. Domates ( *Solanum lycopersium* ) CCDC124 Genini Susturmak için sgRNA Tasarlanması

Domates (*Solanum lycopersium*) CCDC124 geninin 1.ekzonunu hedefleyen 2 sgRNA çevrimiçi bir program olan CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) programı kullanılarak tasarlanmıştır. Primerler seçilirken yüksek GC içeriğine sahip olmaları (%40-70) ve off-target bölgelerinin düşük olması gibi kriterler dikkat edilerek seçilmiştir (Şekil 4.1). 182/FB ve 203/FB olarak isimlendirdiğimiz 2 primer seçilmiştir. 182/FB-U3 ileri primeri için 5' hedef dizisinin ucuna 5'-GTCA-3' dizisi eklenmiştir. 182/RB-U3 geri primeri için seçilen dizilerinin komplementlerinin 5' dizisinin ucuna 5'-AAAC-3' dizisi eklenmiştir. 203/FB-U6 ileri primeri için 5' hedef dizisinin ucuna 5'-ATTG-3 dizisi eklenmiştir. 203/RB-U6 geri primeri için seçilen dizilerinin komplementlerinin 5' dizisinin ucuna 5'-AAAC-3' dizisi eklenmiştir.

| Position/<br>Strand | Guide Sequence + PAM<br>+ Restriction Enzymes<br><input type="checkbox"/> Only G- <input type="checkbox"/> Only GG- <input type="checkbox"/> Only A- <input type="checkbox"/> | MIT<br>Specificity<br>Score | CFD<br>Spec.<br>score | Predicted Efficiency<br><a href="#">Show all scores</a><br>Doench *16<br>Mor-Mateos | Outcome<br>Out-of-Frame<br>Lindel | Off-targets for<br>0-1-2-3-4<br>mismatches<br>+ next to PAM | Genome Browser links to matches sorted by CFD off-target score                            |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| 68 / fw             | TCGGAAGACGCGCTCGAAT CGG<br>Enzymes: <i>HinPII</i> , <i>HinfI</i> , <i>Hpy188I</i> , <i>TaqI</i> ,<br><i>PfiI</i><br>Cloning / PCR primers                                     | 100                         | 100                   | 50                                                                                  | 55                                | 73 80<br>0-0-0-1-1<br>0-0-0-0-0<br>2 off-targets            | 3:M821.3cn01 24.93 Mbp<br>4:M821.3cn01 23.48 Mbp                                          |
| 105 / rev           | CTTCGGCTCGCGCAATAC TGG<br>Enzymes: <i>BseI</i><br>Cloning / PCR primers                                                                                                       | 100                         | 100                   | 39                                                                                  | 29                                | 55 73<br>0-0-0-0-1<br>0-0-0-0-0<br>1 off-targets            | 4:M821.3cn11 5.11 Mbp                                                                     |
| 200 / rev           | CTCGGCAAGCGCGACCT CGG<br>Enzymes: <i>BseDI</i> , <i>MniI</i><br>Cloning / PCR primers                                                                                         | 100                         | 100                   | 53                                                                                  | 47                                | 65 88<br>0-0-0-0-0<br>0-0-0-0-0<br>0 off-targets            |                                                                                           |
| 203 / fw            | GGCCGAGCAAGAGGCGG AGG<br>Enzymes: <i>NmeAIII</i> , <i>BseDI</i> , <i>MwoI</i><br>Cloning / PCR primers                                                                        | 97                          | 98                    | 55                                                                                  | 29                                | 65 79<br>0-0-0-0-15<br>0-0-0-0-0<br>15 off-targets          | 4:M821.3cn04 9.17 Mbp<br>4:M821.3cn08 39.78 Mbp<br>4:M821.3cn02 46.90 Mbp<br>show all...  |
| 136 / rev           | TCAGTTTCTTGGCGCGG TGG<br>Enzymes: <i>HinPII</i> , <i>BspFNI</i><br>Cloning / PCR primers                                                                                      | 99                          | 99                    | 51                                                                                  | 44                                | 63 92<br>0-0-0-0-4<br>0-0-0-0-0<br>4 off-targets            | 4:M821.3cn12 31.38 Mbp<br>4:M821.3cn04 34.23 Mbp<br>4:M821.3cn08 26.25 Mbp<br>show all... |
| 182 / fw            | AGAGCCGAGAGCGAGCA AGG<br>Enzymes: <i>BstFI</i> , <i>TauI</i> , <i>MwoI</i> , <i>SsiI</i> , <i>FspdHI</i> ,<br><i>BstCPI</i><br>Cloning / PCR primers                          | 99                          | 98                    | 57                                                                                  | 50                                | 53 64<br>0-0-0-0-13<br>0-0-0-0-1<br>13 off-targets          | 4:M821.3cn01 84.27 Mbp<br>4:M821.3cn09 25.04 Mbp<br>4:M821.3cn07 43.21 Mbp<br>show all... |
| 185 / rev           | CACCTCGCTTCTTTCTG CGG<br>Enzymes: <i>BstFI</i> , <i>TauI</i> , <i>MwoI</i> , <i>MniI</i> , <i>ApeKI</i> ,<br><i>FspdHI</i><br>Cloning / PCR primers                           | 99                          | 99                    | 58                                                                                  | 39                                | 49 67<br>0-0-0-0-3<br>0-0-0-0-1<br>3 off-targets            | 4:M821.3cn02 17.45 Mbp<br>4:M821.3cn11 42.20 Mbp<br>4:M821.3cn01 26.86 Mbp                |

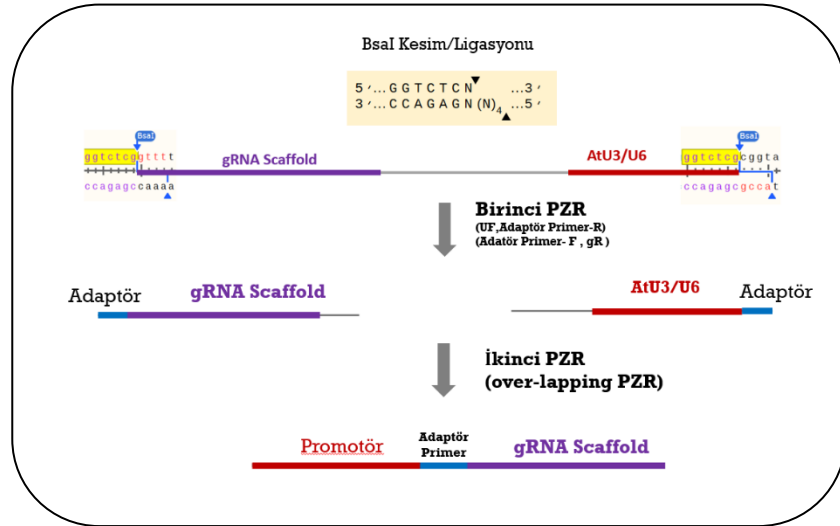
Şekil 4.1 CRISPOR-Tefor programı kullanılarak tasarlanan sgRNA tasarımı için özgüllük puanlarına göre sıralanan tahmini kılavuz RNA'lar.

Tablo 4.1: Domates Ccdc124 geni için tasarlanan adaptör primerleri

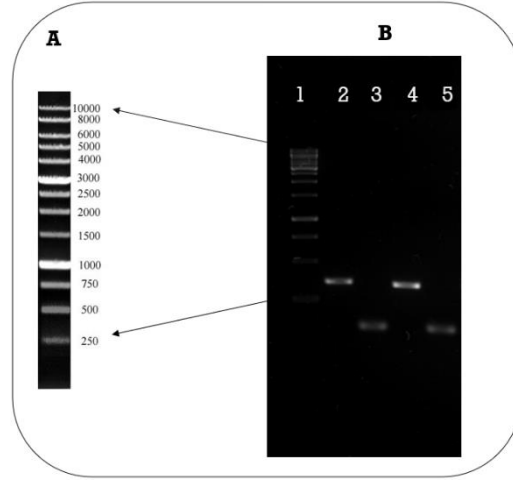
| Adaptör Primer | Nükleotit Dizisi (5'--3')      |
|----------------|--------------------------------|
| 182/FB-U3      | <b>GTCAGAAGCCGAGAAGCGAGCAG</b> |
| 182/RB-U3      | <b>AAACCTGCTCGCTTCTCGGCTTC</b> |
| 203/FB-U6      | <b>ATTGCCCGCAGCAAAGAAAGCCG</b> |
| 203/RB-U6      | <b>AAACCGGCTTTCTTTGCTGCGGC</b> |

## 4.2. pYLsgRNA Ekspresyon Kaset Vektörlerinin Oluşturulması

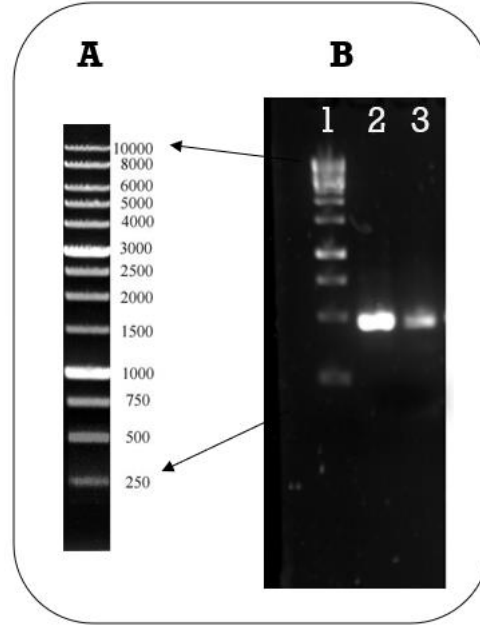
Adaptör primerlerin pYLsgRNA-AtU3d/LacZ ve pYLsgRNA-AtU6-1 ekspresyon kaset vektörlerine klonlanması 3.2.2’de belirtildiği koşullarda gerçekleştirilmiştir. Ardından iki adaptör primer içinde elde edilen adaptör/Promotör, adaptör/Scaffold fragmentleri PZR reaksiyonu ile birleştirilmiştir. Birinci ve ikinci PZR’in ürünleri agaroz jele yüklenmiştir.



Şekil 4.2: sgRNA ekspresyon kasetlerinin oluşturulma basamakları.

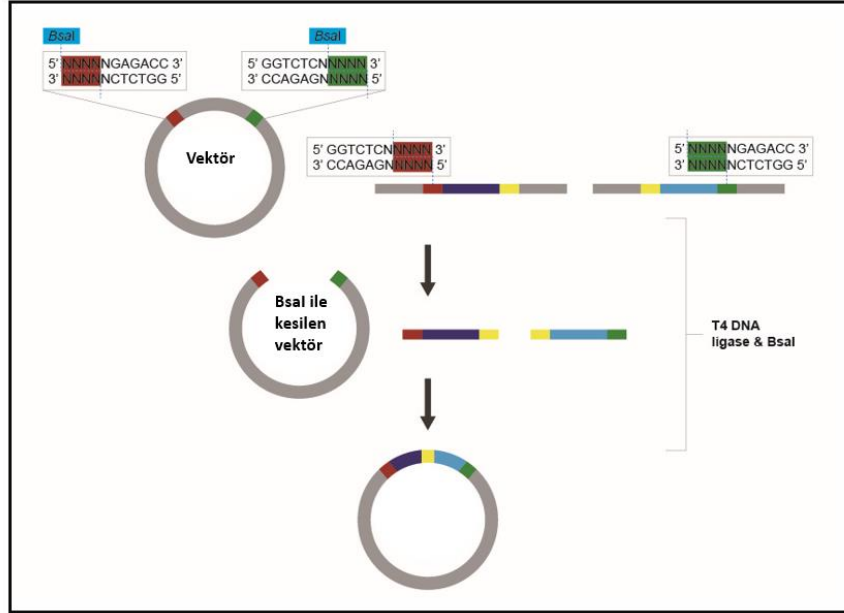


Şekil 4.3: Birinci PZR agaroz jel görüntüsü. **A)** Intron 1 kb DNA Ladder, **B)** 1) Intron 1 kb DNA Ladder, 2) 182-CCDC124/Promotör, 3) 182-CCDC124/Scaffold, 4) 203-CCDC124/Promotör, 5) 203-CCDC124/Scaffold.



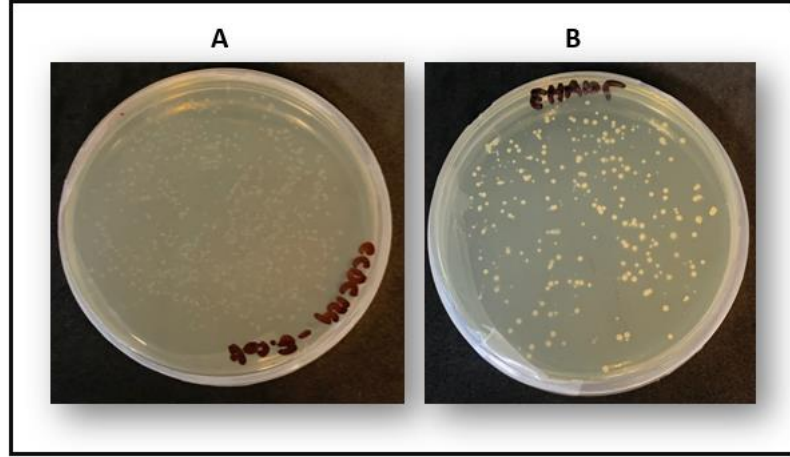
Şekil 4.4 İkinci PZR agaroz jel görüntüsü. A) Intron 1 kb DNA Ladder, B) 1) Intron 1 kb DNA Ladder, 2)182-CCDC124 guide RNA ekspresyon fragmenti, 3) 203-CCDC124 guide RNA ekspresyon fragmenti.

#### 4.3. pYLCRISPR / Cas9-P35S-N Vektörünün Goldan Gate Klonlama Tekniği Kullanılarak Oluşturulması ve Klonlanan Bölgelerin Kontrol Edilmesi

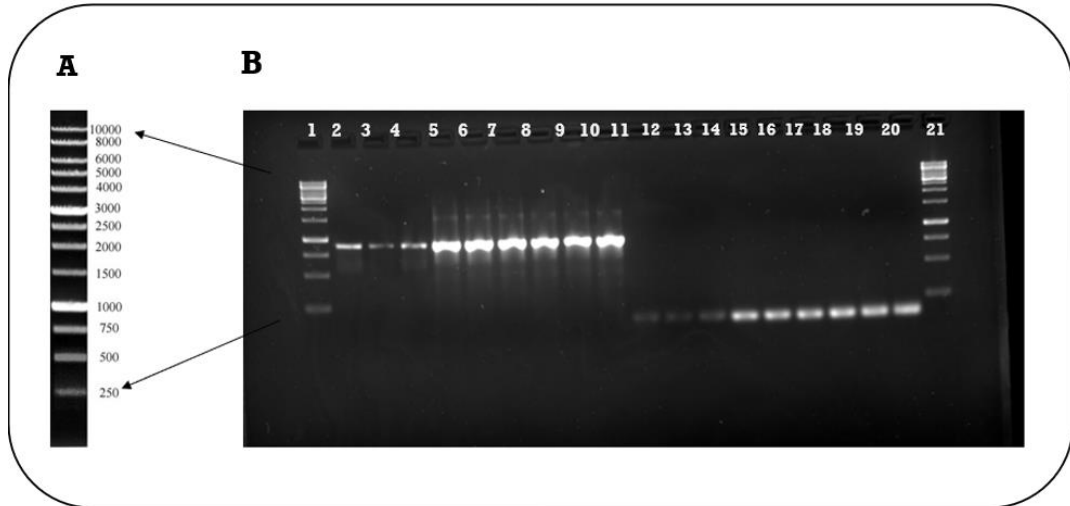


Şekil 4.5: Golden Gate klonlama ile vektörün oluşturulma basamakları.

Goldan Gate Klonlama ile oluşturulan pYLCRISPR/Cas9 plazmitinin *E.coli*'ye transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra seçici besiyerinde büyüyen kolonilerden UF/ 182-RB ve 182-FB /gR-R primerleri kullanılarak koloni PZR yapılmıştır ve agoroz jelde yürütölüp görüntülenmiştir. Daha sonra 1.koloniden plazmit izolasyonu yapılmıştır ve kontrol kesimi için BamHI enzim kesimi yapılmıştır ve jelde görüntülenmiştir. Ardından 1.koloniden %20 gliserol stok yapılmıştır ve -80°C'de muhafaza edilmiştir. Daha sonra oluşturulan vektörün *Agrobacterium tumafeciens*'e transformasyon yapılmıştır.

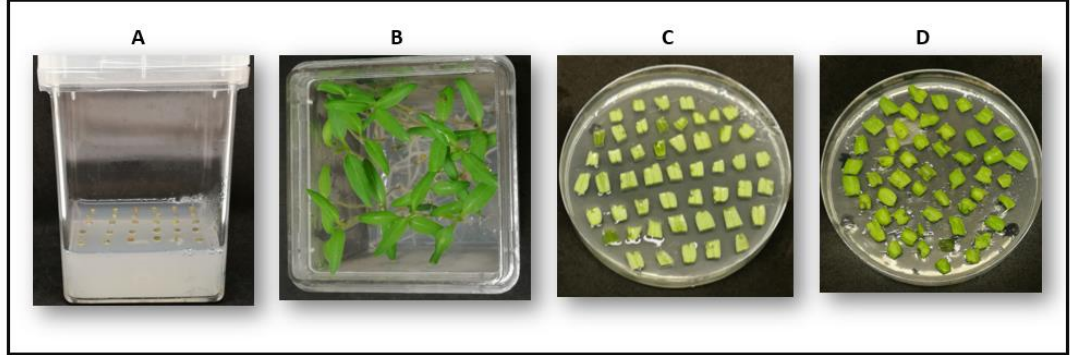


Şekil 4.6: Transformasyondan sonra seçici besiyerinde büyüyen *E.coli* (A) ve *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (B)



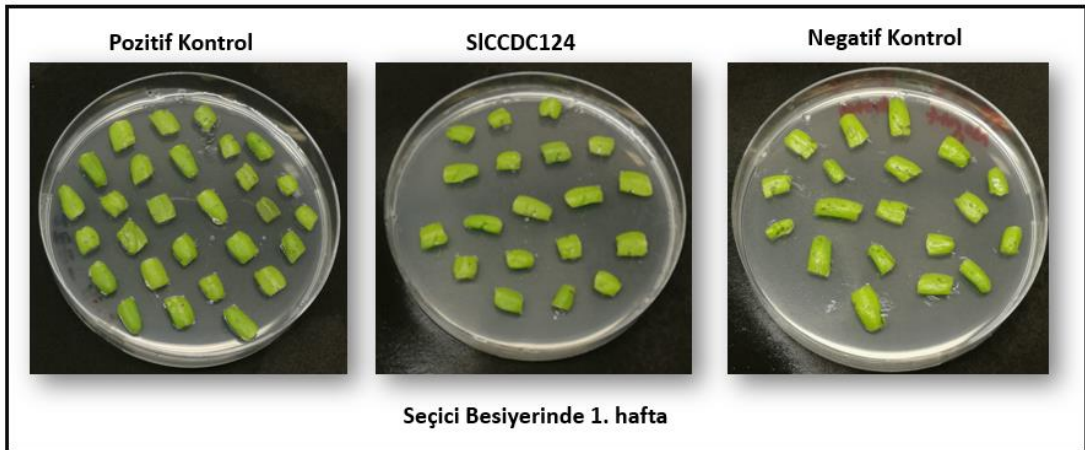
Şekil 4.7: Koloni PZR'la seçici besiyerinde büyüyen bakterilerde vektör varlığının tespit. A) Intron 1 kb DNA Ladder. B) 2-11 UF/ 182-RB primer çifti ile yapılan PZR. 12-20 182-FB /gR-R primer çifti ile yapılan PZR.

#### 4.4. Domates Kotiledonlarından Transgenik Domates Hatlarının Oluşturulması



Şekil 4.8: Genç domates kotiledonlarından transgenik domates hatlarının oluşturulması. A) Domates tohumlarının ekilmesi. B) 7-8. Günün sonunda oluşan filizler. C) Yaralanan Eksplantların ön-kültüre alınması. D) Eksplantların *Agrobacterium tumefaciens* ile muamele edilmesinden sonra co-kültür ortamına alınması.

Co-kültür ortamından sonra eksplantlar seçici besiyerine (2Z) alınıp 1 hafta bitki büyütme odasında büyütülmüştür. Daha sonra 2 haftada bir alt kültür yapılmıştır. Seçici besiyerinde 4.haftadan sonra bazı aday SICCDC124 mutantlarında belirgin morfolojik farklılıklar gözlemlenmiştir.



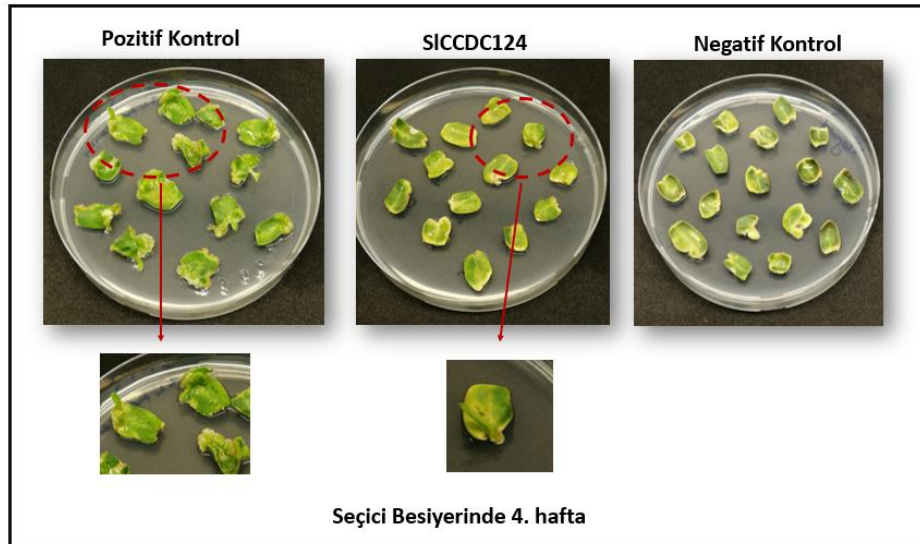
Şekil 4.9: Seçici besiyerlerine aktarılan eksplantların 1. Haftası.

Eksplantların seçici besiyerinde 2.haftalarında pozitif kontrollerin hepsinde kallus oluşumu gözlemlenirken aday mutant bitkilerde ve negatif kontrolde herhangi bir kallus oluşumu gözlemlenmemiştir (Şekil 4.9). 2.haftadan sonra besiyerinde zeatin konsantrasyonu yarıya indirilmiştir (1 µg g/ml).



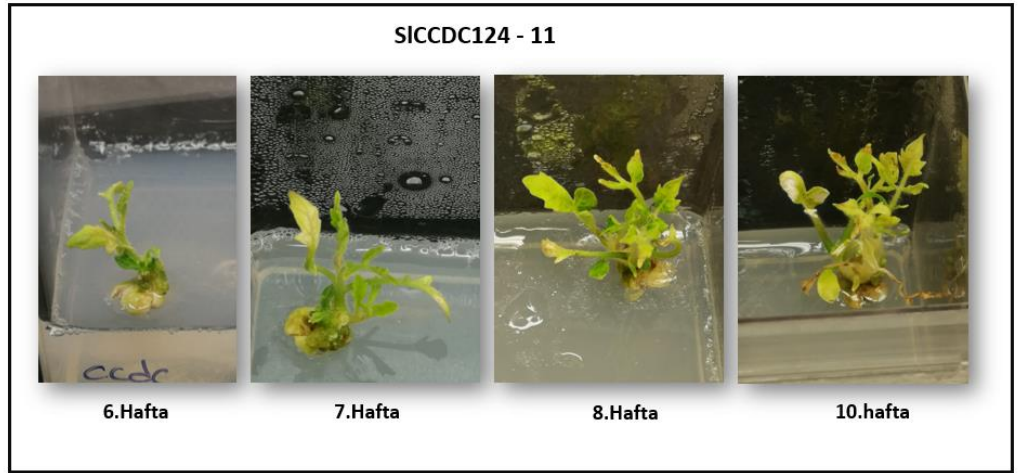
Şekil 4.10: Seçici besiyerinde 2.hafta.

Seçici besiyerinde 4.haftanın sonunda pozitif kontrollerin %90'ında gövde oluşumu gözlemlenirken, aday mutant bitkilerde (SICCDC124) kallus oluşumunun devam ettiği ve bazı bitkilerde gövde oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 4.10).



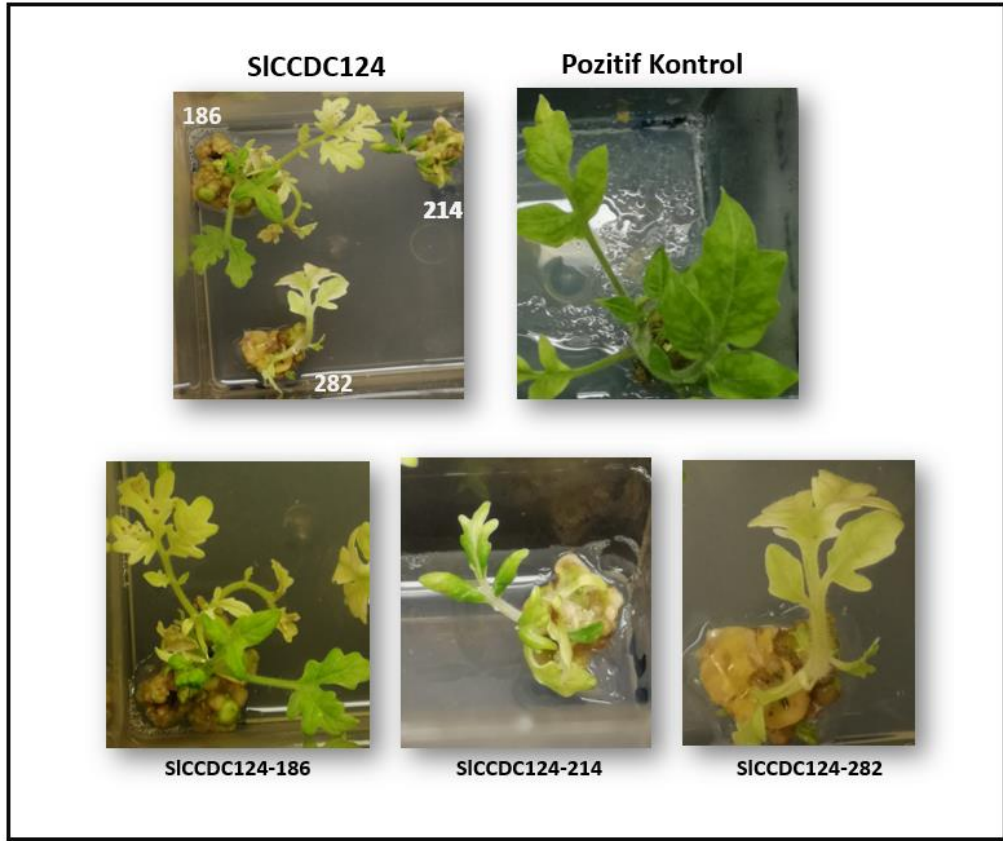
Şekil 4.11: Seçici besiyerinde 4.hafta.

Seçici besiyerinde 4.haftadan sonra bazı aday mutant bitkilerin yapraklarında sararmalar gözlemlenmiştir. SICCDC124-11 mutant bitkisinin yapraklarında sararmalar 4.haftadan sonra başlamıştır. 6. haftada belirgin olarak görülen sararmalar ilerleyen haftalarda devam etmiştir. Sararmalar en yaşlı yaprakta başlayıp ilerleyen haftalarda diğer yapraklarda da sararmaların oluştuğu ve yaprakların gövdeden ayrıldığı gözlemlenmiştir. Şekil 4.11’de SICCDC124-11 mutant bitkisinde meydana gelen morfolojik değişiklikler gösterilmiştir. Kontrol bitkisinde ise herhangi bir sararma gözlemlenmemiştir.



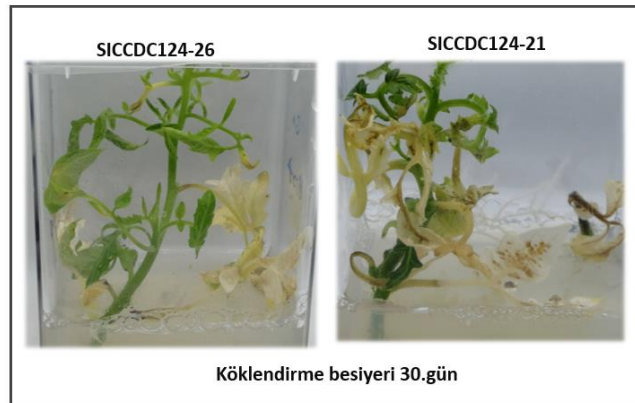
Şekil 4.12: SICCDC124-11 bitkisinde gözlemlenen morfolojik değişiklikler.

Diğer aday mutant bitkilerde ayı şekilde karakteristik olarak sararmalar ve yapraklarda erken yaşlanmalar gözlemlenmiştir. Pozitif kontrolde ise herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Şekil 4.12’de görüldüğü gibi mutant aday bitkilerden olan SICCDC124-186, SICCDC124-214 ve SICCDC124-282’de kontrol bitkisine kıyasla belirgin morfolojik farklılıkların oluştuğu gözlemlenmiştir.



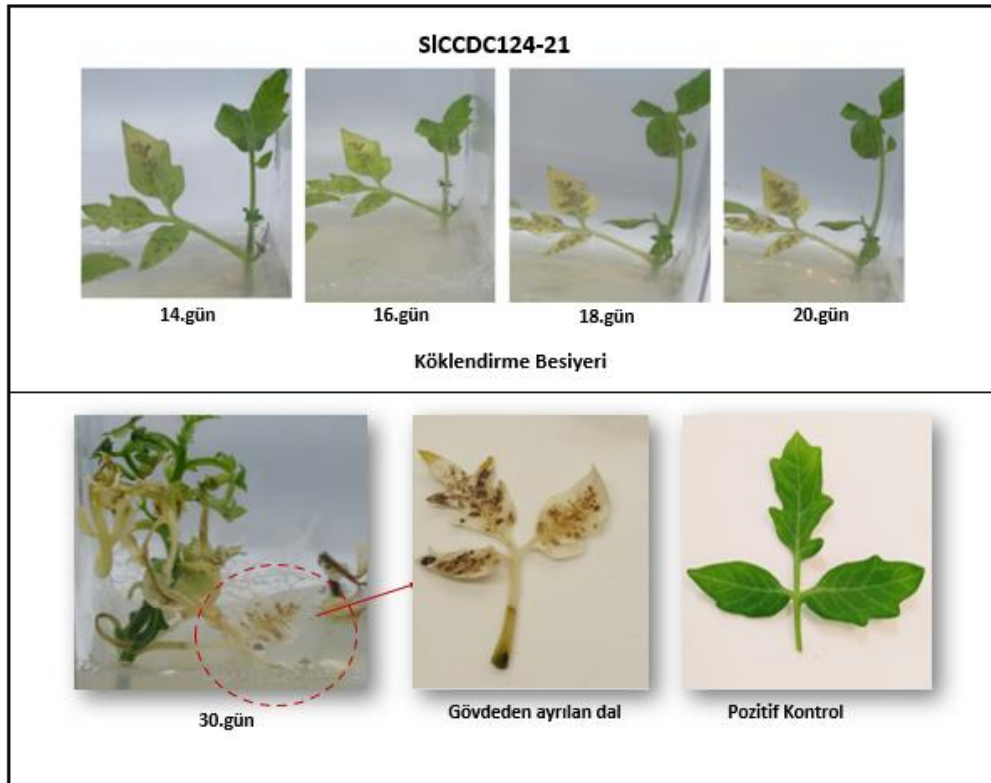
Şekil 4.13: Aday mutant bitkilerde gözlemlenen morfolojik değişiklikler.

Aday mutant bitkiler arasında bazı mutant adaylarında ise sararmalar köklendirme besiyerine aktarıldıktan sonra 1.haftanın sonunda gözlemlenmeye başlamıştır. Şekil 4.13'te görüldüğü gibi köklendirme besiyerindeki aday mutant bitkilerde en yaşlı yapraklardaki sararmalar görülmektedir.

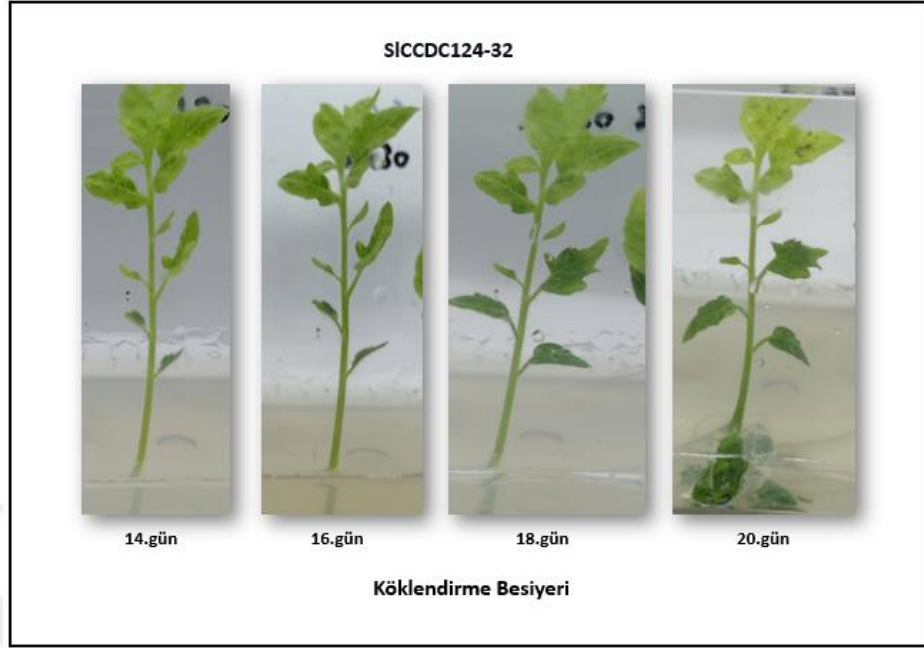


Şekil 4.14: SICCDC124-26 ve SICCDC124-21 bitkilerde gözlemlenen morfolojik değişiklikler.

SICCDC124-21 aday mutant bitkisinde sararmalar köklendirme besiyerine aktarıldıktan sonra 1. haftanın sonunda başlamıştır. Devam eden haftalarda en yaşlı yapraklardan başlayarak diğer yaprakların sararmaları ve sararan yaprakların bir süre sonra gövdeden ayrıldığı gözlemlenmiştir. Pozitif kontrolde ise herhangi bir sararma olmamıştır. Benzer şekilde SICCDC124-32 bitkisinde 2.haftanın sonunda sararmalar başlamış ve yapraklarında bölgesel siyah kahverengi-siyah beneklerin olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15).

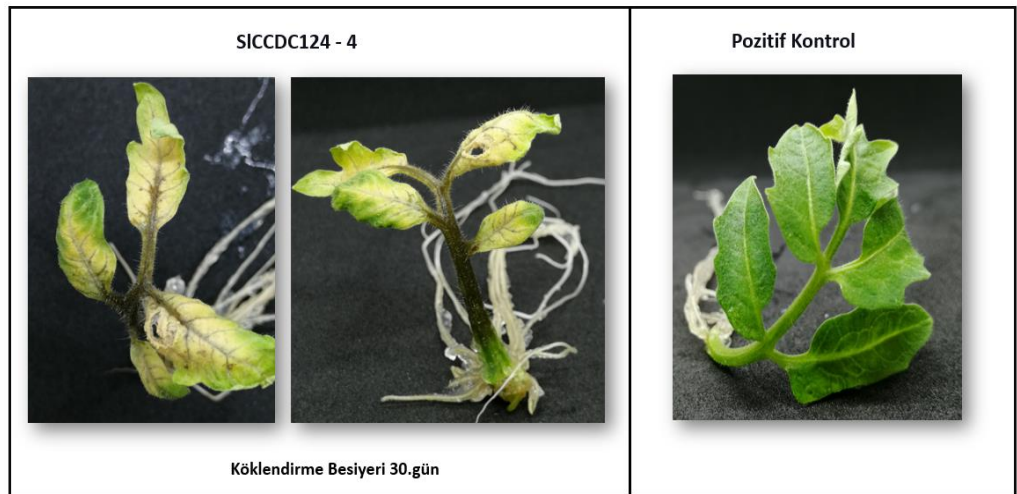


Şekil 4.15: SICCDC124-21 bitkisinde gözlemlenen morfolojik değişiklikler.



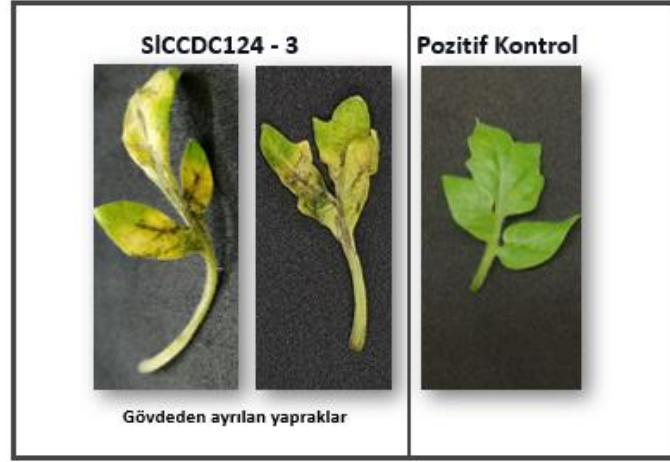
Şekil 4.16: SICCDC124-32 bitkisinde gözlemlenen morfolojik değişiklikler.

Bazı aday mutant bitkilerde ise tüm gövdede sararmaların ve erken yaşlanmanın gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Şekil 4.16’da görüldüğü gibi SICCDC124-4 bitkisinde tüm bitkide sararma ve doku ölümlerinin gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Pozitif kontrolde ise herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.17: SICCDC124-4 bitkisinde gözlemlenen morfolojik değişiklikler.

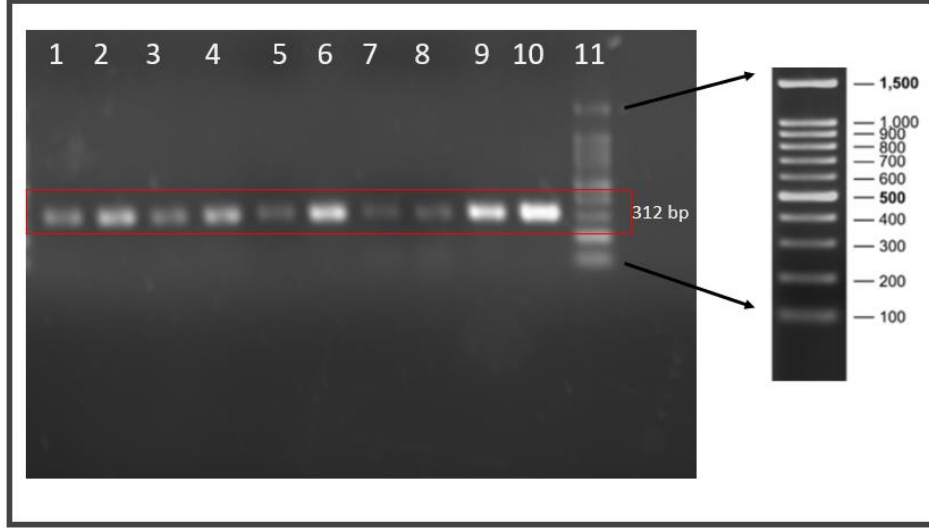
Mutant olduğu sekanslama ile doğrulan SICCDC124-3 bitkisinde ise sararmalar benzer şekilde, köklendirme besiyerine aktarıldıktan sonra 1.haftanın sonunda başlamıştır. İlerleyen haftalarda devam eden sararmalardan sonra sırayla en yaşlı yapraktan başlanarak yaprakların gövdeden ayrıldığı gözlemlenmiştir.



şekil 4.18: SICCDC124-3 bitkisinin gövdesinden ayrılan yapraklar.

#### 4.5. Transgenik Bitki Hatlarının PZR Tabanlı Belirlenmesi

Transgenik bitki hatlarının belirlenmesi için ilk olarak genomik DNA izolasyonu yapılmış ve daha sonra bitkiye aktarılan T-DNA bölgesi üzerinden tasarlanan RB-F ve PI-SceI-R primerleri ile PZR reaksiyonu kurulmuştur. şekil 4.18’de görüldüğü sararma gözlemlediğimiz aday mutant bitkilerden SICCDC124-3, SICCDC124-4, SICCDC124-21, SICCDC124-26, SICCDC124-32, SICCDC124-39, SICCDC124-186, SICCDC124-214, SICCDC124-282 bitkilerinin transgenik olduğu doğrulanmıştır.

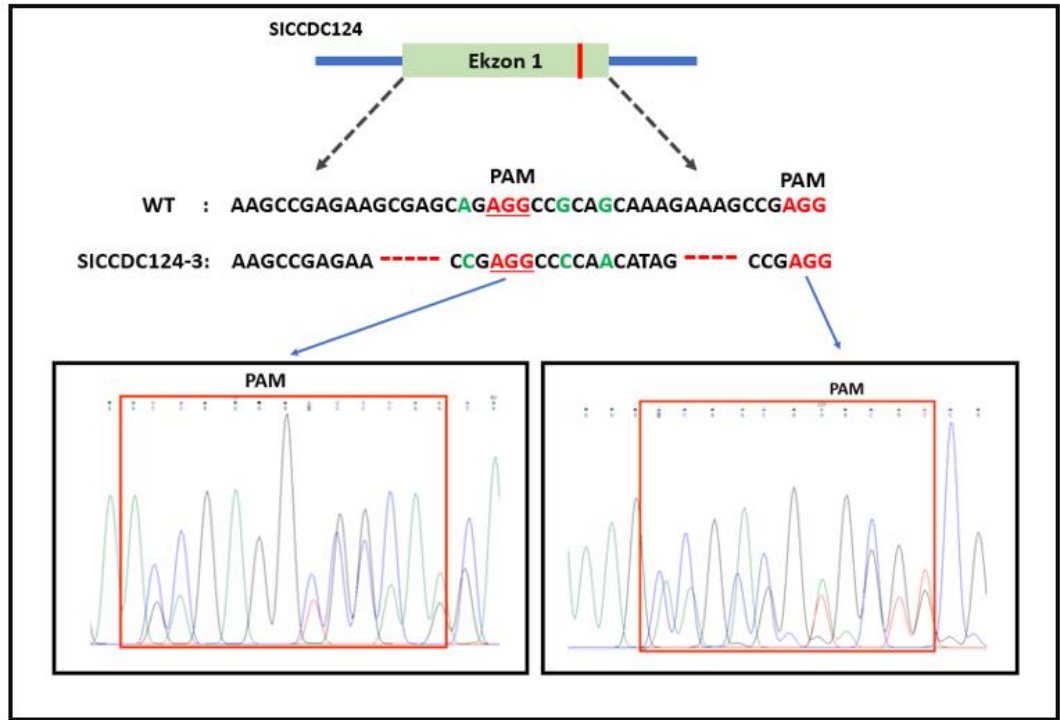


Şekil 4.19: Transgenik bitkilerin PZR tabanlı belirlenmesi. 1) SICCDC124-3, 2)SICCDC124-4, 3)SICCDC124-21, 4)SICCDC124-26, 5)SICCDC124-32, 6) SICCDC124-39, 7) SICCDC124-186, 8) SICCDC124-214, 9) SICCDC124-282, 10) PYLCRISPR/Cas9 plazmiti, 11) 100 bp ladder.

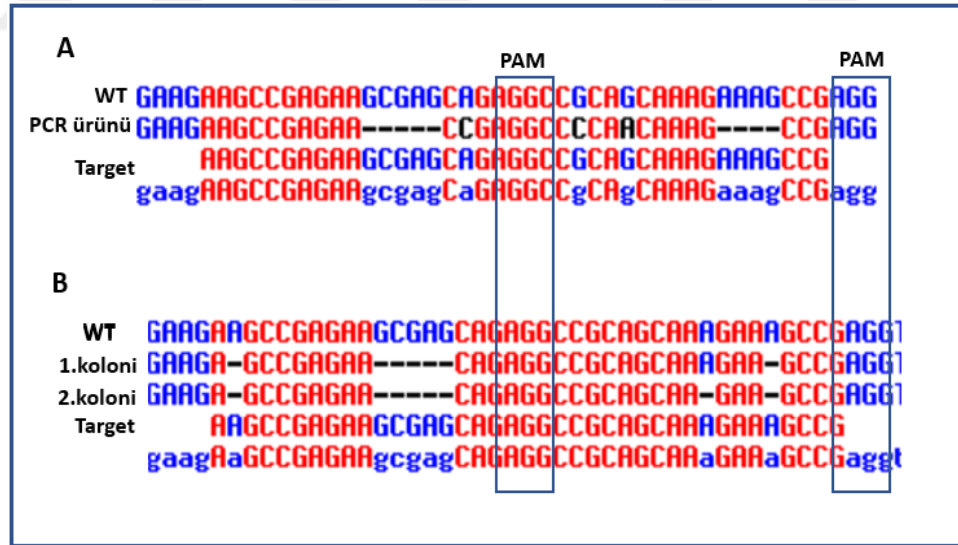
#### 4.6. Sanger Dizileme İle Mutant Hatların Belirlenmesi

Mutant hatların tespiti için Sanger dizileme yöntemi kullanılmıştır. Transgenik olduğu belirlenen hatlardan DNA izolasyonundan sonra gen spesifik primerlerle PZR reaksiyonu kurulmuş ve dizilemeye gönderilmiştir. Şekil 4.19’de SICCDC124-3 için PZR ürünü dizi sonuçları gösterilmiştir. Birinci sgRNA ve ikinci sgRNA bölgelerinde sırasıyla 5 ve 4 bazlık delesyonların olduğu ve 3 farklı nükleotitde baz değişimi olduğu belirlenmiştir. Heterozigot, homozigot ve kimerik bitkilerin tespit edilebilmesi için PZR ürünü “pJET1.2/blunt Cloning Vector kiti” kullanılarak klonlanmış ve farklı kolonilerden plazmit izolasyonu yapıp dizilemeye gönderilmiştir. Şekil 4.20’de görüldüğü gibi 1. Ve 2. Kolonilerde daha önceden gönderilen PZR ürününe göre farklı mutasyonlar tespit edilmiştir.

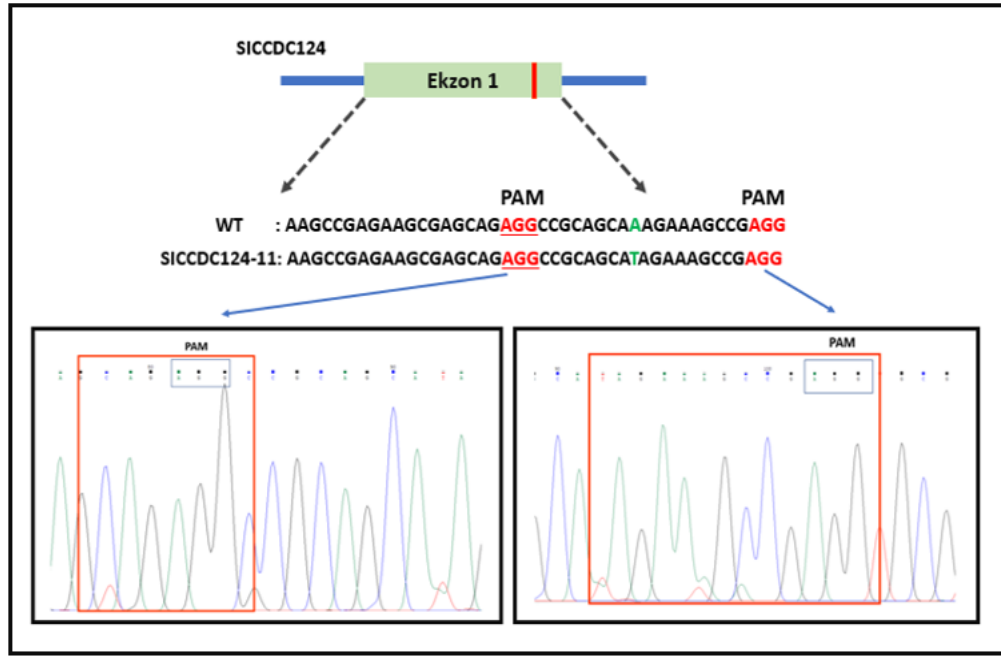
SICCDC124-11 mutanti için gen spesifik primerler ile yapılan PZR ürünü dizilemeye gönderilmiştir. Şekil 4.21’de görüldüğü gibi ikinci sgRNA hedef dizisi içerisinde bir baz değişikliğinin olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kromatogramlara bakıldığından PAM dizisinin 3-4 nükleotit yukarı bölgesinde farklı piklerin olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.20: SICCDC124-3 mutanlığı için gönderilen PZR ürününün dizileme sonucu ve kromatogramları.



Şekil 4.21: SICCDC124-3 mutanlığı için gönderilen PZR ürünü, 1.koloni ve 2.koloni dizileme sonucunun karşılaştırılması. A) Wild-type (WT) ile PZR ürününün sekans hizalaması. B) ) Wild-type (WT) ile 1.koloni ve 2.koloni sekans hizalanması.



Şekil 4.22: SICCDC124-11 mutanđı için gönderilen PZR ürününün dizileme sonucu ve kromatogramları.

## 5.TARTIŞMA

CCDC124 (Coiled-Coil Domain İçeren 124) proteinini kodlayan genin domatesteki (*Solanum lycopersium*) homologu üzerinde CRISPR/cas9 sistemi kullanarak gerçekleştirdiğimiz alışmamızda CCDC124 geninin susturulmasıyla meydana gelen morfolojik değişlikleri gözlemleyerek, genin fonksiyonunu araştırılmıştır. Çalışmamızın sonucunda SICDC124 mutantlarının vahşi tip bitkilerle karşılaştırıldığında belirgin morfolojik farklılıklara sahip olduğunu gözlemlenmiştir. Ayrıca SICDC124 mutantlarında erken yaşlanma (senescence) gözlemlenmiştir.

Bitkilerde yaşlanma belirli hücrelerde, dokularda veya tüm bitkide meydana gelebilir. Bitkilerde yaşlanma tipik olarak nükleik asitlerin ve proteinlerin bozulması, klorofil kaybı, yaprak sararması gibi hem biyokimyasal hem de yapısal farklılıklar ile karakterizedir. Bitkilerde 4 tip yaşlanma modeli tanımlanmıştır. İlk yaşlanma modelinde tüm bitki yaşlanma sürecinden etkilenir ve genellikle yıllık bitkilerde gözlemlenir. İkinci yaşlanma mekanizmasında bitkinin toprağın st kısmında yaşlanmalar meydana gelir ve bitkinin yeraltındaki kök sistemi canlı kalır. nc yaşlanma modelinde ise bitkinin sadece yapraklarında yaşlanma gözlemlenirken, gövdenin büyük kısmında ve yeraltı kök sistemi canlı kalır. Dördüncü yaşlanma modelinde aşamalı yaşlanma görülür. nce en yaşlı yapraklarda, daha sonra daha genç yapraklarda, ardından gövdede ve son olarak kök sisteminde yaşlanma ve ölüm meydana gelir. Bitkilerde kendi genetik programı ile kontrol edilen yaşlanma (senescence) mekanizmasında, bitki hücrelerinin yaşlanması sonucu ölmesi programlı hücre lm (Programmed Cell Death) olarak tanımlanır. Hayvanlarda proteolitik enzimler olarak kaspazlar görev alırken bitkilerde fitaspazlar görev almaktadır. Bitkilerde yaşlanmanın son aşaması, ana bitki gövdesinden organların (ek, tohum, yaprak) ayrılmasını içeren absisyon olarak adlandırılan fizyolojik bir süreçtir [96], [97]. Yaptığımız bu çalışma sonucunda domateste CCDC124 geninin ifadesinin engellendiği bitki hatlarında erken yaşlanmalar gözlemlenmiştir. Bazı mutant bitkilerde (SICDDC124-4, SICDC124-23) bitkinin genelinde yaşlanma gözlemlenirken, diğer mutant bitkilerde (SICDC124-3, SICDC124-21, SICDC124-26, SICDC124-32, SICDC124-39, SICDC124-186, SICDC124-214, SICDC124-282) aşamalı yaşlanma

görülmüştür. İlk olarak en yaşlı yaprakta bölgesel orak başlayan sararmalar daha sonra tüm yaprağa yayılmış ve ardından yaprağın ana gövdeden ayrıldığı (absisyon) gözlemlenmiştir. Daha sonra sırayla diğer yapraklarda sararmalar olmuş ve diğer yaprakların gövdeden ayrıldığı gözlemlenmiştir. Ccdc124 proteininin yokluğunda bitkide belirgin morfolojik farklılıklar tespit edilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda programlanmış hücre ölümleri ve yaşlanma hücrel stres tepkisi olarak kabul edilmektedir. Stres kaynaklarının birçoğu (sıcaklık, açlık, karanlık gibi) bitkide erken yaşlanmaya neden olabilmektedir [98], [99]. Daha önceki çalışmalarda Ccdc124'ün stres granülleri, nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili proteinler ile etkileştiği kütle spektrometresi ile tespit edilmiştir (Merve TUZLAKOĞLU ÖZTÜRK, yayına hazırlanmakta olan data). Bu bağlamda elde ettiğimiz veriler Ccdc124'ün bitkilerde stres granülü oluşumunda veya stres mekanizmasında doğrudan veya dolaylı olarak görev alabileceğine dair verileri desteklemektedir. Bundan dolayı Ccdc124'ün hücre içi fonksiyonunun aydınlatılması, hem yaşlanma hem de stres mekanizmasının daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. Böylece bitkilerde stres toleransı, yüksek verim ve ömrü iyileştirilmiş mahsullerin geliştirilmesine; hayvanlarda hücre-içi Stres Granüllü (SG) bağımlı savunma mekanizmalarının aydınlatılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Ccdc124 proteininin ifadesinin engellendiği domates bitkilerinde erken yaşlanma gözlemlendiği için seraya aktarılmadan bitki ölümü gerçekleşmektedir. Bu yüzden susturulan CCDC124 geninin tekrar aynı bitkiye verilerek değişikliklerin takip edilmesi mümkün olmamaktadır. Bundan dolayı ilerleyen çalışmalarda indüklenabilir bir sistem ile Ccdc124 geninin bitkiye verilmesi planlanmaktadır. Bu amaçla sıcaklıkla indüklenen bir promotör olan Hsp18.2 promotörünü kullandık. Hsp18.2 promotörünün arkasına cas9'un tanıyıp kesmemesi için hedeflediğimiz bölgelerde kodon değişimi yaptığımız CCDC124 genini koyduk. Tasarladığımız DNA fragmentini, bu tez çalışması kapsamında hazırladığımız CCDC124 genini hedefleyen sgRNA ekspresyon kasetlerini klonladığımız pYLCRISPR/Cas9P35S-N vektörüne klonladık. Daha sonra dizi analizi ile doğruladığımız vektörü *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 suşuna transformasyonunu gerçekleştirdik. Devam eden çalışmamızda CRISPR/cas9 sistemi ve sıcaklık ile indüklenabilir sistemi bir arada bulunduran vektörün bitkiye *Agrobacterium* aracılı transformasyonunu gerçekleştireceğiz. Daha sonra 22 °C

derecede büyütülen bitkilerde Cdc124 ifadesinin engellenmesi ve ardından 37°C dereceye aktaracağımız bitkilerde, 37°C derecede indüklenen Hsp18.2 promötoru ile Ccdc124 proteinin ifade edilmesine bağlı olarak bitkideki sararma ve erken yaşlanma süreçlerinin takip edilmesi hedeflenmektedir.



## KAYNAKLAR

- [1] Shikata M., Ezura H., (2016), "Micro-Tom Tomato as an Alternative Plant Model System: Mutant Collection and Efficient Transformatio" *Methods in Molecular Biology*, 1363 ,47–55.
- [2] Tuzlakoğlu Öztürk, M., Güllülü Ö., (2022), "Dimerization underlies the aggregation propensity of intrinsically disordered coiled-coil domain-containing 124" *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 90 (1), 218–228.
- [3] Wells J.N., Buschauer R., Mackens-Kiani T., Best K., Kratzat H., Berninghausen O., et al., (2020) "Structure and function of yeast Lso2 and human CCDC124 bound to hibernating ribosome" *PLoS Biology*, 18 (7).
- [4] Telkoparan, P., Erkek, S., Yaman, E., Alotaibi, H., Bayik, D., and Tazebay, U.H. (2013) Coiled-Coil Domain Containing Protein 124 Is a Novel Centrosome and Midbody Protein That Interacts with the Ras-Guanine Nucleotide Exchange Factor 1B and Is Involved in Cytokinesis. *PLoS ONE*,8 (7).
- [5] Zhu G., Wang S., Huang Z., Zhang S., Liao Q., Zhang C., et al., (2018), "Rewiring of the Fruit Metabolome in Tomato Breeding" *Cell*, 172 (1–2), 249-261.
- [6] Su X., Wang B., Geng X., Du Y., Yang Q., Liang B., et al., (2021), "A high-continuity and annotated tomato reference genome" *BMC Genomics*, 22 (1), 1–12.
- [7] Sato S., Tabata S., Hirakawa H., Asamizu E., Shirasawa K., Isobe S., et al., (2012), "The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution" *Nature*. 485 (7400), 635.
- [8] Tonucci L.H., Holden J.M., Beecher G.R., Khachik F., Davis C.S., Mulokozi G., (2002), "Carotenoid Content of Thermally Processed Tomato-Based Food Products", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 (3), 579–586.
- [9] Frusciant, L., Carli P., Ercolano M.R., Pernice R., di Matteo A., Fogliano V., et al., (2007), "Antioxidant nutritional quality of tomato", *Molecular Nutrition & Food Research* 51 (5), 609–617.
- [10] Raiola A., Rigano M.M., Calafiore R., Frusciante L., Barone A., (2014), "Enhancing the health-promoting effects of tomato fruit for biofortified food", *Mediators of Inflammation*. 2014.
- [11] Frodin D.G., (2004), "History and concepts of big plant genera" *Taxon*, 53 (3), 753–776.

- [12] van Eck J., Kir D.D., Walmsey A.M.,(2006), "Tomato (*Lycopersicum esculentum*)" *Methods in Molecular Biology*, 343 459–473.
- [13] Ranjan A., Ichihashi Y., Sinha N.R., (2012), "The tomato genome: implications for plant breeding, genomics and evolution", *Genome Biology*, 13 (8), 167.
- [14] McCormick S., Niedermeyer J., Fry J., Barnason A., Horsch R., Fraley, R., (1986), "Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*", *Plant Cell Reports* 5 (2), 81–84.
- [15] van Eck J., Keen P., Tjahjadi M., (2019), "Agrobacterium tumefaciens-Mediated Transformation of Tomato", *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1864 225–234.
- [16] Van D.T., Ferro N., Jacobsen H.J., (2010), "Development of a simple and effective protocol for *Agrobacterium tumefaciens* mediated leaf disc transformation of commercial tomato cultivars", *GM Crops*, 1 (5), 312–321.
- [17] Sharma M.K., Solanke A.U., Jani D., Singh Y., Sharma A.K., (2009), "A simple and efficient *Agrobacterium*-mediated procedure for transformation of tomato" *Journal of Biosciences*, 34 (3), 423–433.
- [18] Xiao Y., Zhang S., Liu Y., Chen Y., Zhai R., Yang C., et al., (2022), "Efficient *Agrobacterium*-mediated genetic transformation using cotyledons, hypocotyls and roots of 'Duli' (*Pyrus betulifolia* Bunge)", *Scientia Horticulturae*, 296 110906.
- [19] Fuentes A.D., Ramos P.L., Sánchez Y., Callard D., Ferreira A., Tiel K., et al., (2008), "A transformation procedure for recalcitrant tomato by addressing transgenic plant-recovery limiting factors", *Biotechnology Journal*, 3 (8), 1088–1093.
- [20] Koul B., Srivastava S., Vijay Amla D., Sanyal I., Author C., (2014), "Establishment and optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of tomato (*Solanum lycopersicum* L.)" *International Journal of Biosciences*, 166 (3), 10-30.
- [21] Brooks C., Nekrasov V., Lippman Z.B., van Eck J., (2014), "Efficient Gene Editing in Tomato in the First Generation Using the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated9 System", *Plant Physiology*, 166 (3), 1292–1297.
- [22] Tashkandi M., Ali Z., Aljedaani F., Shami A., Mahfouz M.M., (2018), "Engineering resistance against Tomato yellow leaf curl virus via the CRISPR/Cas9 system in tomato" *Plant Signaling & Behavior*, 13 (10).

- [23] Nekrasov V., Wang C., Win J., Lanz C., Weigel D., Kamoun S., (2017), "Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion", *Scientific Reports.*, 7 (1).
- [24] Zhang S., Wang L., Zhao R., Yu W., Li R., Li Y., et al., (2018), "Knockout of SIMAPK3 Reduced Disease Resistance to *Botrytis cinerea* in Tomato Plants", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (34), 8949–8956.
- [25] Ortigosa A., Gimenez-Ibanez S., Leonhardt N., Solano, R., (2019), "Design of a bacterial speck resistant tomato by CRISPR/Cas9-mediated editing of *SlJAZ2*", *Plant Biotechnology Journal*, 17 (3), 665–673.
- [26] Yin Y., Qin K., Song X., Zhang Q., Zhou Y., Xia X., et al., (2018), "BZR1 Transcription Factor Regulates Heat Stress Tolerance Through FERONIA Receptor-Like Kinase-Mediated Reactive Oxygen Species Signaling in Tomato", *Plant & Cell Physiology*, 59 (11), 2239–2254.
- [27] Hayut S.F., Bessudo C.M., Levy A.A., (2017), "Targeted recombination between homologous chromosomes for precise breeding in tomato", *Nature Communications* 2017 8:1, 8 (1), 1–9.
- [28] Deng L., Wang H., Sun C., Li Q., Jiang H., Du M., et al., (2018), "Efficient generation of pink-fruited tomatoes using CRISPR/Cas9 system", *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao*, 45 (1), 51–54.
- [29] Čermák T., Baltes N.J., Čegan R., Zhang Y., Voytas D.F., (2015), "High-frequency, precise modification of the tomato genome", *Genome Biology*, 16 (1), 1–15.
- [30] Yu, Q.H., Wang B., Li N., Tang Y., Yang S., Yang T., et al., (2017), "CRISPR/Cas9-induced Targeted Mutagenesis and Gene Replacement to Generate Long-shelf Life Tomato Lines", *Scientific Reports* , 7 (1), 1–9.
- [31] Klap C., Yeshayahou E., Bolger A.M., Arazi T., Gupta S.K., Shabtai S., et al., (2017), "Tomato facultative parthenocarpy results from *SlAGAMOUS-LIKE 6* loss of function", *Plant Biotechnology Journal*, 15 (5), 634–647.
- [32] Tomlinson L., Yang Y., Emenecker R., Smoker M., Taylor J., Perkins S., et al., (2019), "Using CRISPR/Cas9 genome editing in tomato to create a gibberellin-responsive dominant dwarf *DELLA* allele", *Plant Biotechnology Journal*, 17 (1), 132–140.
- [33] Xu C., Park S.J., van Eck J., Lippman Z.B., (2016), "Control of inflorescence architecture in tomato by BTB/POZ transcriptional regulators", *Genes & Development*, 30 (18), 2048–2061.

- [34] Zsögön A., Čermák T., Naves E.R., Notini M.M., Edel K.H., Weinl S., et al., (2018), "De novo domestication of wild tomato using genome editing", *Nature Biotechnology* 2018 36:12, 36 (12), 1211–1216.
- [35] Ito Y., Nishizawa-Yokoi A., Endo M., Mikami M., Toki S., (2015), "CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening", *Biochemical and Biophysical Research Communications* 467 (1), 76–82.
- [36] Li J., Ouyang B., Wang T., Luo Z., Yang C., Li H., et al., (2016), "HyPRP1 gene suppressed by multiple stresses plays a negative role in abiotic stress tolerance in tomato", *Frontiers in Plant Science*, 7 (JUNE2016).
- [37] Corem S., Doron-Faigenboim A., Jouffroy O., Maumus F., Arazi T., Bouché N., (2018), "Redistribution of CHH Methylation and Small Interfering RNAs across the Genome of Tomato ddm1 Mutants", *The Plant Cell*, 30 (7), 1628–1644.
- [38] Nonaka S., Arai C., Takayama M., Matsukura C., Ezura, H., (2017), "Efficient increase of  $\Gamma$ -aminobutyric acid (GABA) content in tomato fruits by targeted mutagenesis", *Scientific Reports*, 7 (1).
- [39] Li H., Yang Y., Hong W., Huang M., Wu M., Zhao, X., (2020), "Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects", *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2020 5:1, 5 (1), 1–23.
- [40] Gaj T., Sirk S.J., Shui S.L., Liu J., (2016), "Genome-Editing Technologies: Principles and Applications", *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8 (12).
- [41] Auerbach C., Robson J.M., Carr J.G., (1947), "The chemical production of mutations", *Science*, 105 (2723), 243–247.
- [42] Muller H.J., (1927), "Artificial transmutation of the gene", *Science*, 66 (1699), 84–87.
- [43] Carroll D., (2017), "Focus: Genome Editing: Genome Editing: Past, Present, and Future", *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 90 (4), 653.
- [44] Thomas K.R., Folger K.R., Capecchi M.R., (1986), "High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome", *Cell*, 44 (3), 419–428.
- [45] Steinert J., Schiml S., Puchta H., (2016), "Homology-based double-strand break-induced genome engineering in plants", *Plant Cell Reports*, 35 (7), 1429–1438.
- [46] Pastwa E., Polonica J.B.-A.B., (2003), "Non-homologous DNA end joining", *Acta Biochimica Polonica*, 50(4), 891-908.

- [47] Miller J., McLachlan A.D., Klug A., (1985), "Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*", *The EMBO Journal*, 4 (6), 1609–1614.
- [48] Beerli R.R., Barbas C.F., (2002)," Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors", *Nature Biotechnology* ,2002 20:2, 20 (2), 135–141.
- [49] Liu Q., Segal D.J., Ghiara J.B., Barbas C.F., (1997), "Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (11), 5525–5530.
- [50] Vanamee É.S., Santagata S., Aggarwal A.K., (2001), "FokI requires two specific DNA sites for cleavage", *Journal of Molecular Biology*, 309 (1), 69–78.
- [51] Petolino J.F., (2015), "Genome editing in plants via designed zinc finger nucleases", *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 51 (1), 1.
- [52] Foley J.E., Maeder M.L., Pearlberg J., Joung J.K., Peterson R.T., Yeh J.R.J., (2009), "Targeted mutagenesis in zebrafish using customized zinc-finger nucleases" *Nature Protocols*, 4 (12), 1855–1868.
- [53] Petolino J.F., (2015), "Genome editing in plants via designed zinc finger nucleases" *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant : Journal of the Tissue Culture Association*, 51 (1).
- [54] de Pater S., Neuteboom L.W., Pinas J.E., Hooykaas P.J.J., van der Zaal B.J., (2009), "ZFN-induced mutagenesis and gene-targeting in *Arabidopsis* through *Agrobacterium*-mediated floral dip transformation", *Plant Biotechnology Journal*, 7 (8), 821–835.
- [55] Deng D., Yan C., Pan X., Mahfouz M., Wang J., Zhu J.K., et al., (2012), "Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors", *Science*, 335 (6069), 720–723.
- [56] Mak A.N.S., Bradley P., Cernadas R.A., Bogdanove A.J., Stoddard B.L., (2012), "The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target", *Science*, 335 (6069), 716–719.
- [57] Mak A.N.S., Bradley P., Cernadas R.A., Bogdanove A.J., Stoddard B.L., (2012), "The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target", *Science*, 335 (6069), 716–719.
- [58] Becker S., Boch, J., (2021), "TALE and TALEN genome editing Technologies", *Gene and Genome Editing* 2 100007.

- [59] Malzah, A., Lowder L., Qi Y., (2017), "Plant genome editing with TALEN and CRISPR", *Cell & Bioscience* 2017 7:1 7 (1), 1–18.
- [60] Moscou M.J., Bogdanove A.J., (2009), "A simple cipher governs DNA recognition by TAL effector", *Science*, 326 (5959), 1501.
- [61] Menz J., Modrzejewski D., Hartung F., Wilhelm R., Sprink T., (2020), "Genome Edited Crops Touch the Market: A View on the Global Development and Regulatory Environment", *Frontiers in Plant Science*, 11 1525.
- [62] Qasim W., Zhan H., Samarasinghe S., Adams S., Amrolia P., Stafford S., et al., (2017), "Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells", *Science Translational Medicine*, 9 (374).
- [63] Becker S.,Boch J., (2021), "TALE and TALEN genome editing Technologies", *Gene and Genome Editing*, 2 100007.
- [64] Malzahn A., Lowder L., Qi, Y., (2017), "Plant genome editing with TALEN and CRISPR", *Cell & Bioscience* 2017 7:1, 7 (1), 1–18.
- [65] Barrangou R.,Marraffini L.A., (2014), "CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity", *Molecular Cell*, 54 (2), 234.
- [66] Rath D., Amlinger L., Rath A., Lundgren M., (2015), "The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications", *Biochimie*, 117 119–128.
- [67] Jansen R., Embden J.D., Gastra W., Schouls L.M.,( 2002), "Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes", *Mol Microbiology* ,43(6),1565-75.
- [68] Mojica F.J.M., Juez G., Rodriguez-Valera F., (1993), "Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites" , *Molecular Microbiology*, 9 (3), 613–621.
- [69] Mojica F.J.M., Díez-Villaseñor C., 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.
- [70] Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Dusko Ehrlich S., (2005), "Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin", *Microbiology*, 151 (8), 2551–2561.
- [71] Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A.,Dusko Ehrlich S., (2008), "Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin" *Microbiology*, 151 (8), 2551–2561.

- [72] Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., et al., (2007), "CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes", *Science*, 315 (5819), 1709–1712.
- [73] Garneau J.E., Dupuis M.È., Villion M., Romero D.A., Barrangou R., Boyaval P., et al., (2010), "The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DN", *Nature*, 468 (7320), 67–71.
- [74] 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*, 337 (6096), 816–821.
- [75] Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., et al., (2013), "RNA-guided human genome engineering via Cas9." *Science*, 339 (6121), 823–826.
- [76] Sakuma T., Nishikawa A., Kume S., Chayama K., Yamamoto T., (2014), "Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system", *Scientific Reports*, 4.
- [77] Bortesi L., Zhu C., Zischewski J., Perez L., Bassié, L., Nadi, R., et al., (2016), "Patterns of CRISPR/Cas9 activity in plants, animals and microbes", *Plant Biotechnology Journal*, 14 (12), 2203–2216.
- [78] Gilbert L.A., Larson M.H., Morsut L., Liu Z., Brar G.A., Torres, S.E., et al., (2013), "CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes", *Cell*, 154 (2), 442–451.
- [79] Fonfara I., Richter, H., Bratovič M., le Rhun A., Charpentier E., (2016), "The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA" *Nature*, 532 (7600), 517–521.
- [80] Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Konermann S., Joung J., Slaymaker I.M., Cox D.B.T., et al., (2016), "C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector", *Science*, 353 (6299).
- [81] Shmakov S., Abudayyeh O.O., Makarova K.S., Wolf Y.I., Gootenberg J.S., Semenova, E., (2015), "Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems" *Molecular Cell*, 60 (3), 385–397.
- [82] Makarova K.S., Wolf Y.I., Iranzo J., Shmakov S.A., Alkhnbashi O.S. Brouns S.J.J., et al., (2019), "Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants", *Nature Reviews Microbiology* 2019 18:2, 18 (2), 67–83.
- [83] Ishino Y., Krupovic M., Forterre, P., (2018), "History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology", *Journal of Bacteriology*, 200 (7).

- [84] Saprunauskas 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.
- [85] Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V., (2012), "Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (39).
- [86] Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., et al., (2011), "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III", *Nature*, 471 (7340), 602–607.
- [87] Jiang F., Doudna J.A., (2017), "CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms", *Annual Review of Biophysics*. 46 505–529.
- [88] Janik E., Niemcewicz M., Ceremuga M., Krzowski L., Saluk-Bijak J., Bijak M., (2020), "Various aspects of a gene editing system—crispr-cas9", *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (24), 1–20.
- [89] Morton J., Davis M.W., Jorgensen E.M., Carroll D., (2006), "Induction and repair of zinc-finger nuclease-targeted double-strand breaks in *Caenorhabditis elegans* somatic cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (44), 16370–16375.
- [90] Sheng J., Citovsky V., (1996), "Agrobacterium-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel", *The Plant Cell*, 8 (10), 1699.
- [91] Gelvin S.B., Kim, S.I., (2007), "Effect of chromatin upon Agrobacterium T-DNA integration and transgene expression" *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1769 (5–6), 410–421.
- [92] Gelvin S.B., (2003), "Agrobacterium -Mediated Plant Transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying" Tool", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (1), 16–37.
- [93] Lacroix B., Citovsky V., (2019), "Pathways of DNA Transfer to Plants from Agrobacterium tumefaciens and Related Bacterial Species" *Annual Review of Phytopathology*, 57- 231.
- [94] Arslan Ö., Soylu N.K., Akıllılar P.T., Tazebay U.H., (2021), "Coiled-coil domain-containing protein-124 (Ccdc124) is a novel RNA binding factor up-regulated in endometrial, ovarian, and urinary bladder cancers", *Cancer Biomarkers : Section A of Disease Markers*, 31 (2), 149–164.

- [95] Engler C., Marillonnet S., (2014), "Golden Gate cloning", *Methods in Molecular Biology*, 1116 119–131.
- [96] Thomas H., (2013), "Senescence, ageing and death of the whole plant" *New Phytologist*, 197 (3), 696–711.
- [97] Woo H.R., Masclaux-Daubresse C., Lim, P.O., (2018), "Plant senescence: how plants know when and how to die", *Journal of Experimental Botany*, 69 (4), 715–718.
- [98] Buchanan-Wollaston V., (2008), "Senescence processes in plants *Annual Plant Reviews*", *Annals of Botany*, 101 (1), 197.
- [99] Fridlyanskaya I., Alekseenko L., Nikolsky N., (2015), "Senescence as a general cellular response to stress: A mini-review", *Experimental Gerontology*, 72 124–128.

## ÖZGEÇMİŞ

Hilal Civelek 2015 yılında başladığı Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünü 2019 yılında başarıyla tamamlayarak Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı. 2019 yılından beri Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.



## EKLER

### Ek A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Civelek H., Cebraioğlu N., Tuzlakoğlu Oztürk M., Çiftçi Özden Y., Tazebay Uygur H., (2021), CRISPR/Cas9 MEDIATED SILENCING OF CCDC124 GENE IN *Solanum lycopersicum*, International Green Biotechnology Congress.

