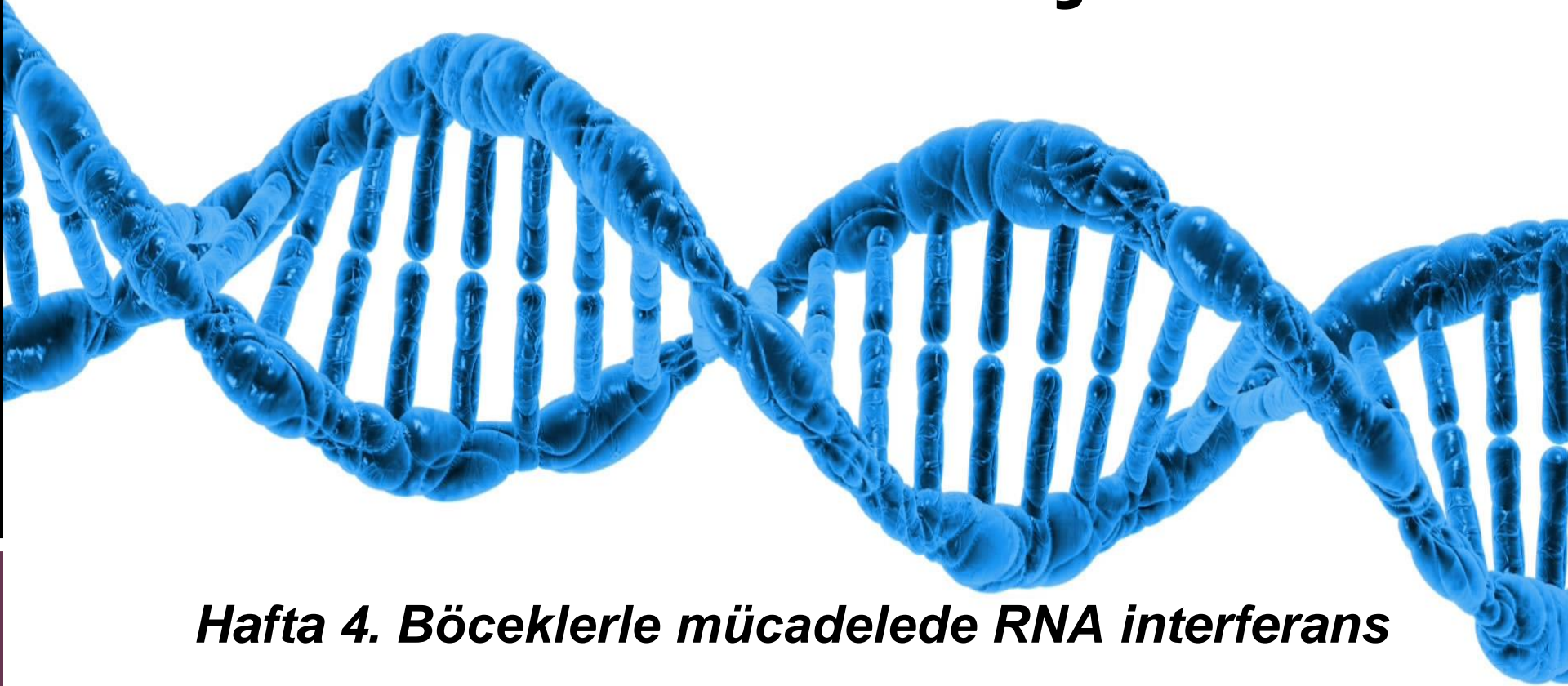


ZBK458 Bitki Korumada Moleküler Yaklaşımlar



Hafta 4. Böceklerle mücadelede RNA interferans

Umut Toprak, Ph.D

RNA interferans (RNAi): Gen Susturma

2006 Fizyoloji ve Tıp Alanında Nobel Ödülü



Andrew Fire

Patoloji ve
Genetik

Profesörü,

**Stanford
University**

Tıp Fakültesi



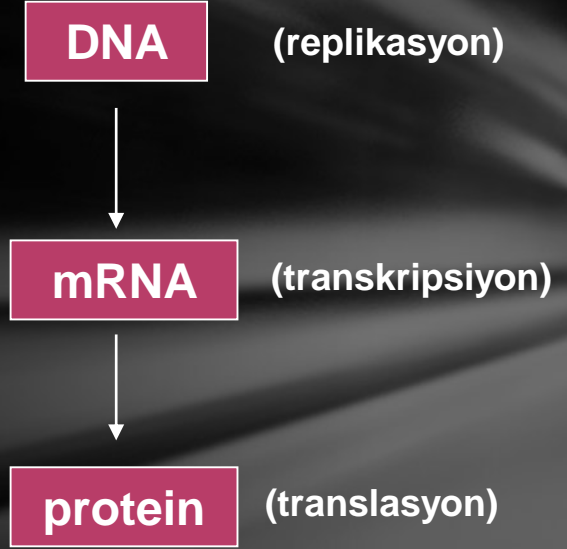
Craig Mello

Moleküler Tıp
Profesörü

**Massachusetts
University**

Tıp Fakültesi

Genler konuşur mu?



**Genin konuşması mRNA
üretmesidir=Transkripsiyon=Gen
Ekspresyonu=Gen İfadesi!**

Genleri susturabilir miyiz?

Hangi Durumlarda Genleri susturmak gerekir?

Genin ne dediğini anlamak için!

Genler çok konuşuyorsa da susturmak gerekebilir! Bu durumlar:

- Mutasyonlar
- Aşırı mRNA ekspresyonu (ifadesi)
- Zararlı (Hastalığa neden olan) genler
- Bazı patojenik etmenlerin çoğalmasıyla ilişkili genler
- Metabolik rahatsızlıklar

Gen Konuşuyor ama ne diyor?

RNA interferans (RNAi), konuşan genin ne dediğini anlamaya yarayan dolayısıyla fonksiyonel bir genom analiz tekniğidir. Diğer bir deyişle genlerin ne işe yaradığını anlamamızı sağlar.

RNAi, gene spesifik iki sarmallı RNA'lar (dsRNA'lar) kullanılarak, ökaryot modellerde ilgili mRNA'nın parçalanması sağlanır.

RNAi Bir gen susturma tekniğidir.

RNAi Bir Gen terapi tekniğidir.

RNAi bir genetik yapı değişikliği **değildir!** Etkisi sürekli **değildir.**

RNAi gene spesifiktir.

RNA interferans'ın Etki Mekanizması

1. Hücre içerisine giren dsRNA, dicer adı verilen bir RNaz III enzimi tarafından 21-23 nükleotitten oluşan siRNA adı verilen küçük RNA'lara parçalanır.
2. siRNA'lar "RNA induced silencing complex (RISC)" olarak bilinen endonükleaz komplekslerine bağlanır.
3. siRNA'lar, tek sarmallı RNA'lara dönüşür ve RISC komplekslerini, eşlenikleri olan mRNA'ya yönlendirerek bu mRNA'ları parçalar. Böylece protein sentezi gerçekleşmez.

Neden RNAi?

İnsanda ve çeşitli canlılarda ilgili genlerin fonksiyonlarına yönelik pek çok çalışma yapılmıştır. Bunlarda temel olarak nokta mutasyonlarına dayalı '**Site directed mutagenesis**' ten yaygın olarak faydalanılmıştır. Ancak mutasyona dayalı bu teknik:

- Yaygın olarak mikroorganizmalarda uygulanmakta olup, yüksek canlılarda pratik değildir.
- Mutantların tanımlaması ciddi zaman ve emek gerektirmektedir.

Bu durum RNAi'yi fonksiyonel genom çalışmalarında önemli bir **çekim noktası haline getirmiştir.**

Böcekler ve RNAi

- RNAi yönteminin entomolojide kullanımı yenidir.
- Bu çalışmaları, tipik olarak **tıp veya diğer alanlardaki RNAi çalışmalarından ayıran önemli fark**, hedef genin susturulmasının sonucunun sadece fonksiyonel olması değil aynı zamanda **bir bitki koruma stratejisi olarak da potansiyele sahip oluşudur**.
- Böcek fizyolojisindeki önemli rollere sahip genlerin susturulmasının sonuçları böcek açısından **olumsuz** hatta **ölümcül** olabilir.
- RNAi'nin **gene spesifik oluşu** **çevre ve güvenlik açısından** da önemli bir **avantaj** sağlamaktadır.
- Bu nedenlerle böcek genom çalışmalarıyla dizi bilgileri elde edilen ve böcek fizyolojisinde önemli rolleri olabileceği düşünülen farklı genler **RNAi ile hedeflenmiş** ve bu genlerin fonksiyonlarının aydınlatılmasında önemli başarılar elde edilmiştir.

Hangi Geni Susturmalıyım?

- **Önemli görevleri olan bir doku/organ?**
- **Dışarıdan ulaşılabilir bir doku/organ?**

Öyle bir yeri hedeflemeliyiz ki ulaşılabilir ama önemli görevleri de olmalı!

Susturulan Böcek Genleri

Coleopter larva veya erginleri (Arakane et al., 2005; 2008) kitin sentez genlerinin susturulması sonucunda kitin miktarı azalmış ve bu durum *T. castaneum*'da ölümlerle sonuçlanmıştır (Arakane et al., 2005).

Tribolium castaneum'da *TcCHT5* kitinaz genine spesifik dsRNA'nın (200 ng) larvalara enjeksiyonu ölümlerle sonuçlanmıştır.

Tribolium castaneum'da *TcIDGF4* (İmajinal disk büyüme faktörü) genine spesifik dsRNA'nın (200 ng) larvalara enjeksiyonu ergin olamama ve ölümlerle sonuçlanmıştır.

TcCHT10 genine spesifik 200 ng dsRNA'nın sondan bir önceki larva dönemi Son larva dönemi Pupalara yapılan enjeksiyon ölümlerle sonuçlanmıştır.

Tribolium castaneum erginlerinde Hox geninin susturulması iki çift elytra kanadının oluşmasına neden olmuştur. (Fotoğraflar: Yoshi Tomoyasu and Rob Denell).

Tribolium castaneum larvalarında bir fenoloksidaz enzimi kodlayan Lakkaz 2 geninin susturulması 'tanning' olarak adlandırılan kahveringeleşmenin engellenmesine neden olmuşturthe right
Fotoğraflar: Yas Arakane)

Hemipter *Oncopeltus fasciatus* embryolarında *Hox* geninin susturulması ergin bireylerde ilk abdominal segmentte bir çift bacak benzeri yapının oluşumuna neden olmuştur.

***Tribolium* pupalarının *Tc'Dll* genine spesifik dsRNA ile enjeksiyonu, F1 dölünün larvalarında bacak ağrazlarına neden olmuştur (Bucher et al., Current Biology Vol 12 No 3).**

Larva döneminde TcASH dsRNA enjekte edilen *T. castaneum* bireylerinin ergin dönemde göstermiş olduğu ağrazlar:

a, b: Baş ve ilk toraks segmenti
c, d: Dorsal- pro ve mezonotum

Kontrol böceklerinde kütikula küçük algısal yeteneğe sahip duyu noktalarıyla kaplı iken (a,c), dsRNA enjekte edilmiş bireylerde bu duyu noktaları kaybolmuştur (b,d).

Kontrol larvalarında bulunan antenin uç segmentinde (e) yer alan duyu organları yine dsRNA enjekte edilen bireylerde yok olmuştur (f).

Kontrol larvalarının 3. bacaklarında tibia ve tarsus duyu organları ile kaplı iken (e, g), dsRNA enjekte edilmiş bireylerde bu duyu noktaları kaybolmuştur (f, h).

Tomoyasu and Denell, 2004, *Dev Genes Evol* 214: 575–578)

GFP dsRNA'sı enjekte edilen larvalar normal deri değiştirme faaliyeti gösterirken, CDA dsRNA'sı enjekte edilen larvalar deri değiştirememiştir

(Quan et al., 2013, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43:683-691).

dsRNA Kodlayan Yeni Nesil GDO'lar

RNAi'nin bir bitki koruma stratesi olarak kullanımındaki en başarılı saha uygulamalarından biri ise dsRNA üreten transgenik bitkilerden elde edilmiştir.

Susturulan Böcek Genleri

Bugüne kadar yapılan RNAi çalışmalarında ağırlıklı olarak:

- **Mide**
- **İntegüment**
- **Sinir sistemi**
- **Üreme sistemi (kısır böcekler)**

genlerinin hedeflendiği dikkati çekmektedir.

Bununla birlikte RNAi teknolojisi:

Coleoptera-Çok etkili

Diptera-Etkili

Hemiptera: Orta etkili

Lepidoptera-Düşük/Orta etkili

Nasıl dsRNA Yaparım?

Total RNA İzolasyonu

(İlgili organdan)



RT-PCR

(Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu)



p-GEM-t Easy Klonlaması

(Ters eşlenik iki plazmitin seçimi)



Plazmit izolasyonu ve dizi analizi



Linear ters eşlenik DNA'ların eldesi

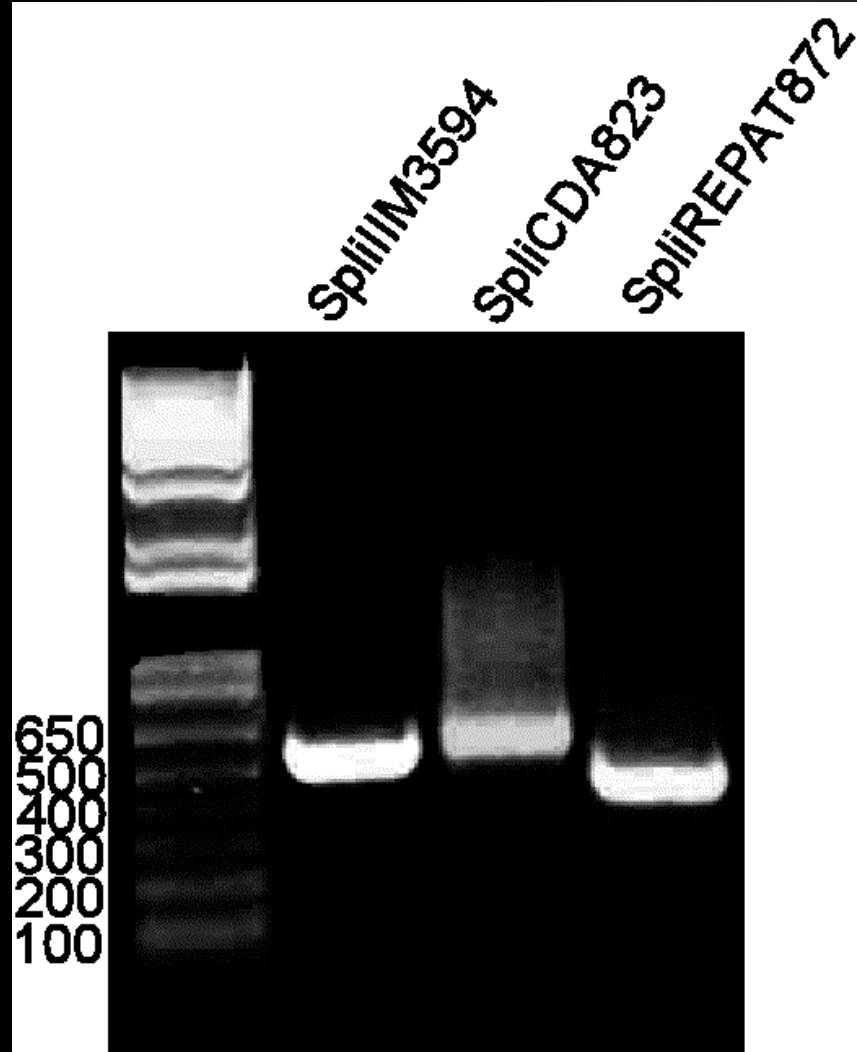


T7 promotorü üzerinden RNA'ya çevirim



Denatürasyon ve dupleks RNA oluşumu

dsRNA Sentezinin Doğrulanması



% 1'lik Agaroz Jel

Böceęe Hangi Dozu Vereceęim?

Coleoptera: 5-50 ng/ul

Diptera: 50 ng/ul

Hemiptera:

Lepidoptera: 1-10 ug/ul

Böceęe Dozu Nasıl Vereceęim?

1. Enjeksiyon (Coleopter-Dipter modeller, ve sokucu-emici ağız yapısına sahip bütün böcekler)

2. Yedirme (Lepidoptera-Coleoptera-Diptera)

3. Deri Yoluyla (Topikal aplikasyon) (Hemiptera ve sokucu-emici ağız yapısına sahip bütün böcekler)

4. Transgenik bitkiler-rekombinant organizmalar, virüs, bakteri(sokucu-emici ağız yapısına sahip bütün böcekler)

Gen Sustu mu Susmadı mı?

dsRNAların böcek tarafından alınımını takiben çeşitli moleküler metotlarla genin susturulup susturulmadığı belirlenebilir. Bu metotlar:

- **Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu**
- **Real time Polimeraz Zincir Reaksiyonu**
- **Northern Blot Analizi**
- **Western Blot Analizi**

Journal of Insect Physiology 57:231-245.

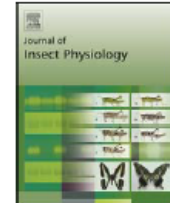
Journal of Insect Physiology 57 (2011) 231–245



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Insect Physiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jinsphys

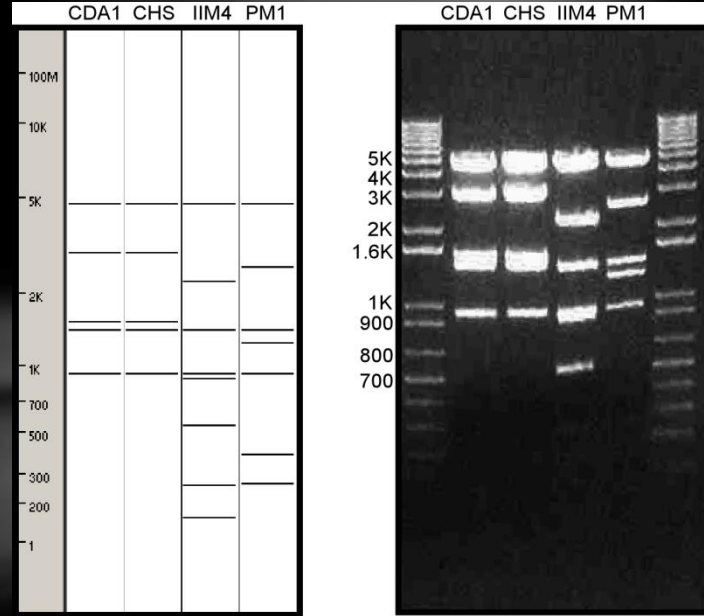


Review

RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design

Olle Terenius^{a,*}, Alexie Papanicolaou^{b,c}, Jennie S. Garbutt^d, Ioannis Eleftherianos^e, Hanneke Huvenne^f, Sriramana Kanginakudru^g, Merete Albrechtsen^h, Chunju Anⁱ, Jean-Luc Aymeric^j, Andrea Barthel^k, Piotr Bebas^l, Kavita Bitra^m, Alejandra Bravoⁿ, François Chevalier^j, Derek P. Collinge^{c,o}, Cristina M. Crava^p, Ruud A. de Maagd^q, Bernard Duvic^j, Martin Erlandson^{r,s}, Ingrid Faye^t, Gabriella Felföldi^u, Haruhiko Fujiwara^v, Ryo Futahashi^{v,w}, Archana S. Gandhe^g, Heather S. Gatehouse^x, Laurence N. Gatehouse^x, Jadwiga M. Giebultowicz^y, Isabel Gómezⁿ, Cornelis J.P. Grimmelikhuijzen^z, Astrid T. Groot^k, Frank Hauser^z, David G. Heckel^k, Dwayne D. Hegedus^{r,A}, Steven Hrycaj^B, Lihua Huang^C, J. Joe Hull^{D,E}, Kostas Iatrou^F, Masatoshi Iga^f, Michael R. Kanostⁱ, Joanna Kotwica^l, Changyou Li^C, Jianghong Li^C, Jisheng Liu^f, Magnus Lundmark^h, Shogo Matsumoto^D, Martina Meyering-Vos^G, Peter J. Millichap^d, Antónia Monteiro^H, Nirotpal Mrinal^g, Teruyuki Niimi^I, Daniela Nowara^Z, Atsushi Ohnishi^D, Vicencio Oostra^J, Katsuhisa Ozaki^K, Maria Papakonstantinou^F, Aleksandar Popadic^B, Manchikarla V. Rajam^L, Suzanne Saenko^J, Robert M. Simpson^x, Mario Soberónⁿ, Michael R. Strand^m, Shuichiro Tomita^M, Umut Toprak^{s,N}, Ping Wang^C, Choon Wei Wee^O, Steven Whyard^P, Wenqing Zhang^Q, Javaregowda Nagaraju^g, Richard H. ffrench-Constant^b, Salvador Herrero^{p,q}, Karl Gordon^C, Luc Swevers^F, Guy Smagghe^f

Sahaya Taşıma: Böcek mide genine ait dsRNA üreten transgenik bitkiler



Bitkiler başarı ile dsRNA`ları üretti

Mamestra configurata'da yapılan çalışmalarda ise, McCDA1 ve McPM1 genlerine spesifik iki sarmallı RNA gen kasetleri *Arabidopsis thaliana* genomuna aktarılmış ve bu transgenik bitkilerinin başarılı bir şekilde dsRNA ürettiği rapor edilmiştir (Toprak et al., 2014).



dsRNA'lı Transgenik Mısır Sahada!

Diabrotica virgifera virgifera'ya ait dsRNA sentezleyen yeni nesil transgenik mısır varyetesi 2016 yılında ABD'de EPA tarafından ruhsat aldı!
(<https://www.regulations.gov/docket?D=EPA-HQ-OPP-2014-0293>).

Hedeflenen gen böcek midesinde kodlanan DvSnf7 genidir.

İlgili mısır varyetesi, DvSnf7 dsRNA'sına ilaveten *Bacillus thuringiensis* Cry3Bb1 genini de kodlamaktadır.

İlk izin 2 yıl süreyle 15 bin hektar alan için verilmiştir.

Ruhsat ilk etapta sadece tohum üretimi ve ıslah çalışmaları için verilmiştir!

dsRNA'lı Transgenik Mısırın Ruhsatlandırma Öyküsü

- Ruhsat dosyası diğer örneklere göre oldukça kısa ancak bir o kadar da ilginç bir doküman olarak kayıta geçmiştir. Dokümanda insan sağlığına olan riskler ile kuş, memeliler, balık ve akuatik omurgasızlar, hedef alınmayan böcekler ve diğer omurgasızlarla ilişkili ekolojik riskler değerlendirilmiştir.
- Bu değerlendirmeler, RNAi'li mısırın 'Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act (FIFRA)'nın diğer insektisitler için şart koştuğu standart kriterleri sağladığını göstermiştir.

RNAi ile dilediğiniz ökaryot organizmada dilediğiniz geni susturabilirsiniz:

- Sadece böcek değil, nematod ve bitkilerde hastalığa yol açan virüs genleri de hedeflenebilir.
- RNAi'nin başarılı bir bitki koruma stratejisi olarak kurgulanmasında hedeflenecek konukçu geninin hayati rollerinin olması esastır.

RNAi'nin Başarısını Etkileyen Faktörler

- Hedeflenen tür
- Hedeflenen gen ve ekspresyonu
- Hedeflenen organizmanın dönemi-yaşı
- dsRNA'nın Uygulanma metodu
- dsRNA Dozu
- dsRNA Uzunluğu
- dsRNA'nın GC içeriği