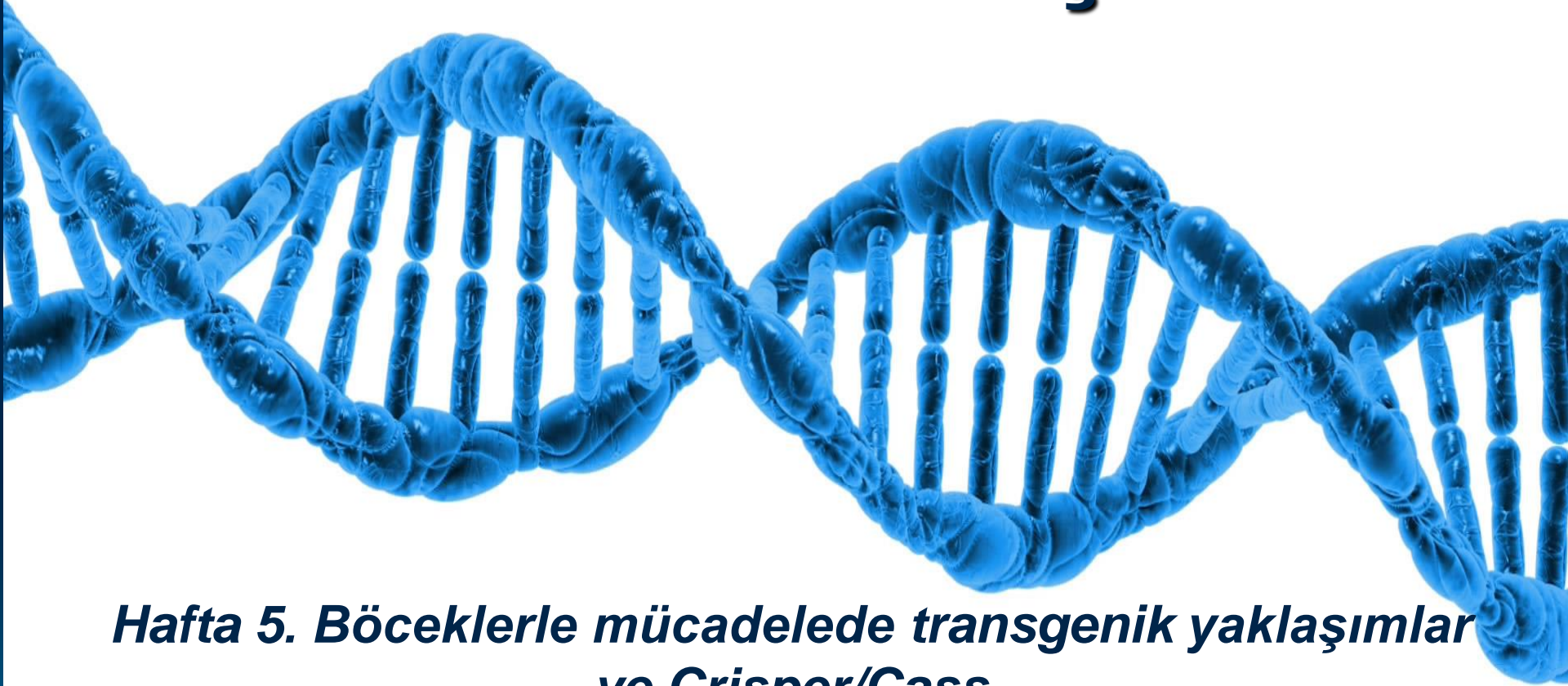


# ZBK458 Bitki Korumada Moleküler Yaklaşımlar



*Hafta 5. Böceklerle mücadelede transgenik yaklaşımlar  
ve Crisper/Cass*

***Umut Toprak, Ph.D***

# Transgenik/Rekombinant Organizma Nedir?

**Transgenik/Rekombinant:** Genetik mühendisliği metotlarıyla DNA'sı değiştirilmiş organizmadır. Bu genetik değişiklikler:

- Genoma yabancı bir gen eklenmesi
- Genomdan mevcut bir genin çıkarılması
- Genomda bulunan bir alanın deđiřtirilmesi

şeklinde olabilir.

# CRISPR-Cas9 Nedir?

**CRISPR:** Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; Düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri

**Cas:** Crispr-associated system; Crispr ilişkili sistem

- 2013 yılında keşfedilen bir genom düzenleme tekniğidir. Emmanuelle Charpentier ve Jennifer Doudna, CRISPR-Cas9 genom düzenlemesini keşfetmeleri ve geliştirmeleri nedeniyle 2020 Nobel Kimya Ödülü'ne layık görülmüştür.

# CRISPR-Cas9 Nedir?

- Genomun çeşitli kısımlarına ekleme, çıkarma ya da DNA diziliminde değişim yapmalarına olanak tanır.
- Şu anda kullanılan en basit ve ucuz genetik manipölasyon yöntemi olarak nitelendirilmektedir.
- Keşfi bakteri ve virüsler arasındaki etkileşimlerin araştırılması sürecine dayanmakta ve temel olarak bakterilerden feyz almıştır. CRISPR kullanarak, bakteriler bünyelerine giren işgalci virüslerden kendilerini korumak için bu bakterilerin DNA'sını Cas9 enzimi ile keserek bu viral DNA'nın bir parçasını çıkarırlar ve kendi genomuna belli diziler şeklinde kopyalarlar. Bu sayede virüslerin olası yeni saldırılarına karşı virüsü tanımış olurlar. Yani bu mekanizma bakterinin aslında bir korunma reaksiyonu olup doğada zaten var olan bir süreçtir.

# CRISPR-Cas9 Nasıl Çalışır?

- CRISPR-Cas9 sistemi, DNA'da değişiklik (mutasyon) yaratan iki önemli molekülden oluşur:

**1. Cas9 enzimi:** Genomun belirli yerlerinden iki DNA sarmalını kesebilen programlanabilir bir DNA endonükleaz olup "moleküler bir makas" görevi görür. Böylece DNA parçaları eklenebilir veya çıkarılabilir.

**2. Rehber/Kılavuz RNA (İng. guide RNA - gRNA):** Daha uzun bir RNA içindeki, önceden tasarlanmış küçük (yaklaşık 20 bazlık) bir RNA diziliminden oluşur. Uzun RNA iskeleti DNA'ya bağlanır ve rehber RNA dizilimi Cas9'un genomun hedeflenen yerine gitmesine rehberlik eder. Böylece Cas9 enzimi doğru yerleri keser.

- Rehber RNA, DNA'daki belirli bir dizilimine spesifik olarak o bölgeyi bulup bağlanmak için tasarlanır. Rehber RNA, genomdaki hedef DNA diziliminin bütünleyici eşlenik RNA bazlarına sahiptir.
- Cas9 rehber RNA'yı izleyerek, DNA'da ilgili yere bağlanarak DNA'nın iki iplikçğinde de kesik oluşturur.
- Kesilen bölgede hücre DNA'nın hasar gördüğünü fark ederek bu alanı onarmaya çalışır.
- Bu şekilde DNA onarım mekanizmasından faydalanılarak gende değişiklik yapılabilir veya yeni bir dizilim eklenebilir.

# Böcekler ve CRISPR-Cas9

- Böceklerde CRISPR-Cas9 tekniğinin kullanımı yenidir.
- Ağırlıklı olarak dipter modellerden *Drosophila melanogaster*'de ve lepidopterlerde, orthopterlerde ve coleopterlerde yaygın kullanım görülmektedir.

Aşamaları şu şekildedir:

1. Rehber RNA ve Cas sisteminin hazırlanması
2. Yumurtaların toplanması
3. Yumurtalara enjeksiyon
4. Larvaların eldesi
5. Mutantların verifikasyonu ve gözlemler

- 2013 yılında, University of Wisconsin, Madison, A.B.D.'de Gratz ve arkadaşları CRISPR/Cas9 teknolojisini ilke defa bir böcek model üzerinde kullanarak *Drosophila melanogaster* genomundan yellow genini çıkarmışlardır (Gratz et al., 2013, GENETICS August 1, 2013 vol. 194 no. 4 1029-1035; <https://doi.org/10.1534/genetics.113.152710> ).

# Böcekler ve CRISPR-Cas9

- Gilles et al., (2015) *Tribolium castaneum*'da un U6 ve hsp68 genlerine ait promotörleri üzerinde CRISPR-Cas9'ın etkinliğini test etmişler ve enjekte edilen bireylerin %58-80'inde homolog olmayan mutasyonların oluştuğunu, bu bireylerin %71-100'ünde ise mutasyonların bir sonraki dölle aktarabildiğini rapor etmişlerdir. Transgenleri gözlemlmek için EGFP (yeşil florasan proteini) kullanmışlardır. Ayrıca E-cadherin geninin CRISPR yöntemi ile genomdan çıkarılması durumunda dorsal morfolojide ağrazlar oluştuğu bildirilmiştir (Development (2015) 142, 2832-2839 doi:10.1242/dev.125054). Dorsal bölgedeki morfolojik ağraz x ile gösterilmiştir.

# Böcekler ve CRISPR-Cas9

- *Drosophila suzukii* white (w) ve Sex lethal (Sxl) genlerinde cinsiyete özgü mutasyonları tanımlamak için CRISPR / Cas9 sistemini kullanılmıştır. W mutasyonlu homozigot erkeklerde beyaz gözler gelişirken mutant genler sonraki dölle aktarılmıştır. Sxl geninde mutasyon taşıyan somatik dişilerde ise anormal genital organ gelişimi gözlemlenmiştir (Li ve Scott, 2016, Biochem Biophys Res Commun . 2016 Jan 22;469(4):911-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.081. 2015).



# Böcekler ve CRISPR-Cas9

*Ceratitis capitata*'nın White geninin CRISPR-Cas9 ile bozulması yine göz pigmentasyonunda değişikliğe yol açmıştır (beyaz renk göz oluşumu) (Meccariello et al., 2017, Scientific reports vol. 7,1 10061. 30 Aug. 2017, doi:10.1038/s41598-017-10347-5).

*Spodoptera litura*'da CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak Abdominal-A (Slabd-A) geninin hedeflenmesi larva döneminde abdomende vücut segmentasyonunda anomaliler oluşmasına neden olmuştur (Bi et al., 2016 , Insect Sci. 2016 Jun;23(3):469-77. doi: 10.1111/1744-7917.12341. Epub 2016 May 13.

# Böcekler ve CRISPR-Cas9

- *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera:Noctuidae)'de koku alma işlevinde görevli olan olfactor co-receptor (Orco) geninin CRISPR/Cas9 ile hedeflenmesi sonucunda enjekte edilen bireylerin% 89,6'sının Orco mutasyonları taşıdığı ve bunların% 70'inin ise sonraki nesle aktarıldığı tespit edilmiştir. Mutant homozigot bireylerde bitki kokusu ve cinsiyet feromonlarının koku alma tespitinde kusurlar bulunmuştur. (F., Monsempes, C., François, MC. et al. Heritable genome editing with CRISPR/Cas9 induces anosmia in a crop pest moth. Sci Rep 6, 29620 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep29620>).
- Bir başka zararlı olarak *Locusta migratoria*'da (Orthoptera:Acrididae) yine Orco geninin CRISPR/Cas9 ile hedeflenmesi sonucunda çekirge yumurtalarının mikroenjeksiyonu, % 71,7 oranında mutasyon saptanmış ve bunların % 88,1'e varan bir oradan bir sonraki generasyona aktarıldığı bulunmuştur. Orco mutantlarının dördüncü dönem nimfleri, birden fazla kokuya ciddi şekilde bozulmuş elektrofizyolojik tepkiler göstermiştir. Orco mutant çekirgeleri, kalabalık koşullar altında toplanma feromonlarına karşı çekim tepkilerini kaybetmiştir (Li et al., 2016, Insect Biochemistry and Molecular Biology Volume 79, December 2016, Pages 27-35 <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.10.003>)

# Böcekler ve CRISPR-Cas9

*Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae)'de CRISPR / Cas9 ile göz pigmentasyonunda görev alan cinnabar geninin kılavuz RNA'sının blastoderm öncesi yumurtalara enjeksiyonu, sonraki G1 nesline kalıtsal olarak aktarılmış, parlak kırmızı bileşik ve nokta göz oluşumuna yol açtığı tespit edilmiştir. *N. lugens* white geni mutasyonları ise beyaz ve hafif pigmentli ommatidia'dan oluşan petek gözler ile sonuçlanmıştır. Bu çalışma, CRISPR / Cas9 aracılı gen düzenlemesinin hemipteran bir böcekte elde edilebileceğini ve bu bitki zararlısı türünde fonksiyonel genomik ve zararlı yönetimi çalışmaları için değerli bir araç olduğunu göstermiştir (Xue et al., 2018, Insect Biochem Mol Biol. 2018 Feb;93:19-26. doi: 10.1016/j.ibmb.2017.12.003. Epub 2017 Dec 11).

# Böcekler ve CRISPR-Cas9

Gui ve ark. 2020 yılında patates böceği olarak bilinen *Leptinotarsa decemlineata*'da, ilk kez, bir CRISPR / Cas9 protokolü geliştirmiş ve diğer böcek türlerinde kanat gelişiminde rol oynadığı bilinen, vestigial (vest) geninin bozulması ile deforme kanat fenotiplerini (elytra ve arka kanat oluşumunun engellenmesi) rapor etmişlerdir (J Insect Physiol . Feb-Mar 2020;121:104013. doi: 10.1016/j.jinsphys.2020.104013. Epub 2020 Jan 7).

# Akarlar ve CRISPR-Cas9

Dermauw ve ark. 2020 yılında *Tetranychus urticae* (iki noktalı kırmızı örümcek) yetişkin dişilerinin yumurtalıklarına, phytoene desaturase genini hedefleyen Cas9 ve single guide RNA (sgRNA)'ların bir karışımının enjeksiyonu bir albino fenotipi göstermiştir. Bu çalışma ile CRISPR-Cas9'un akarlarda gen knock outları oluşturmak için kullanılabileceği ilk defa ispatlanmıştır (Insect Biochemistry and Molecular Biology 120, May 2020, 103347)