

Bitkilerde Genom Düzeltme Uygulamaları

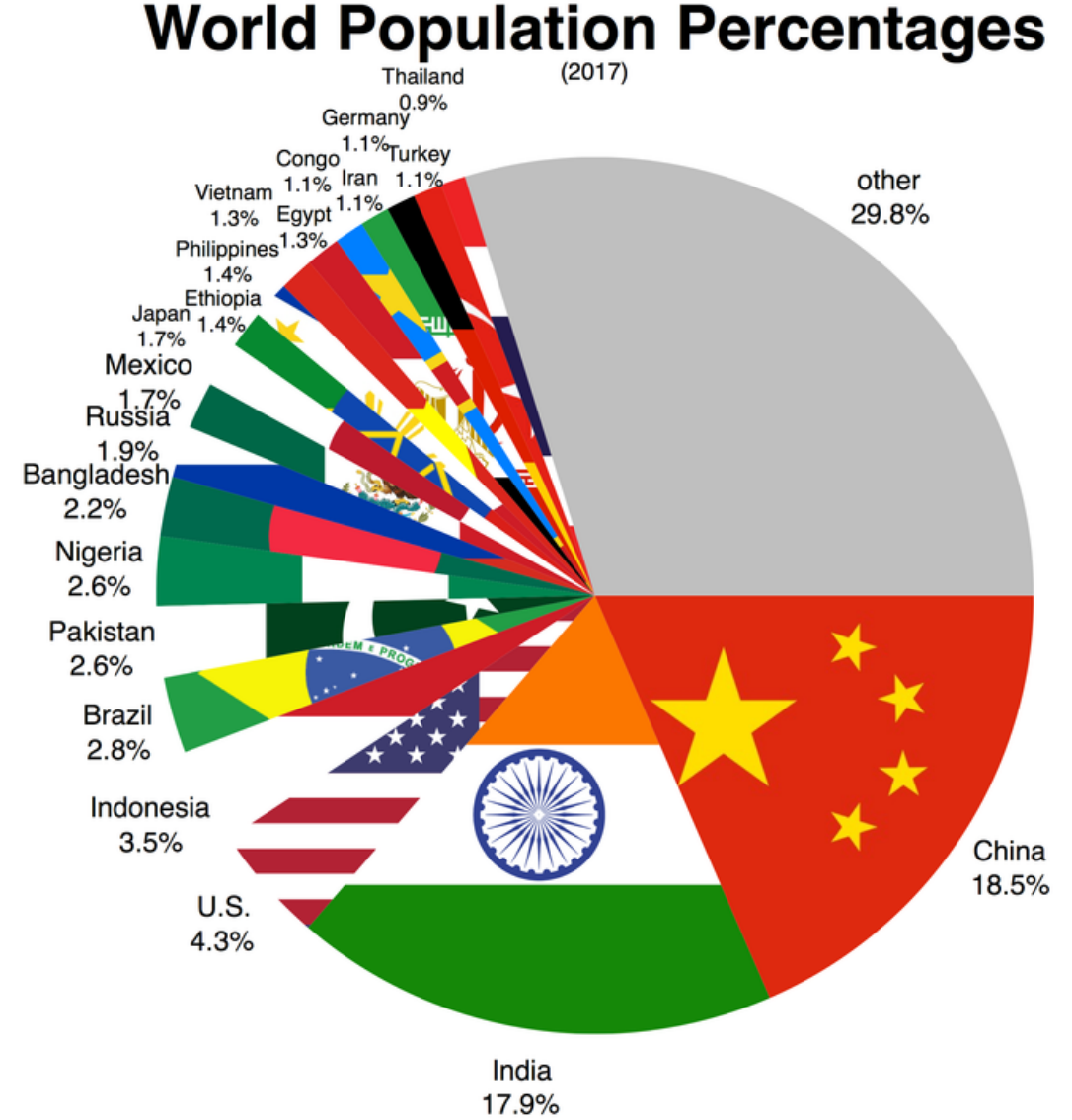
24.03.2020

Doç. Dr. İlker BÜYÜK



- İnsan nüfusu hızlı bir şekilde artmakta olup, 2050 yılına kadar bu rakamın **9,1 milyara** ulaşacağı tahmin edilmektedir [1].

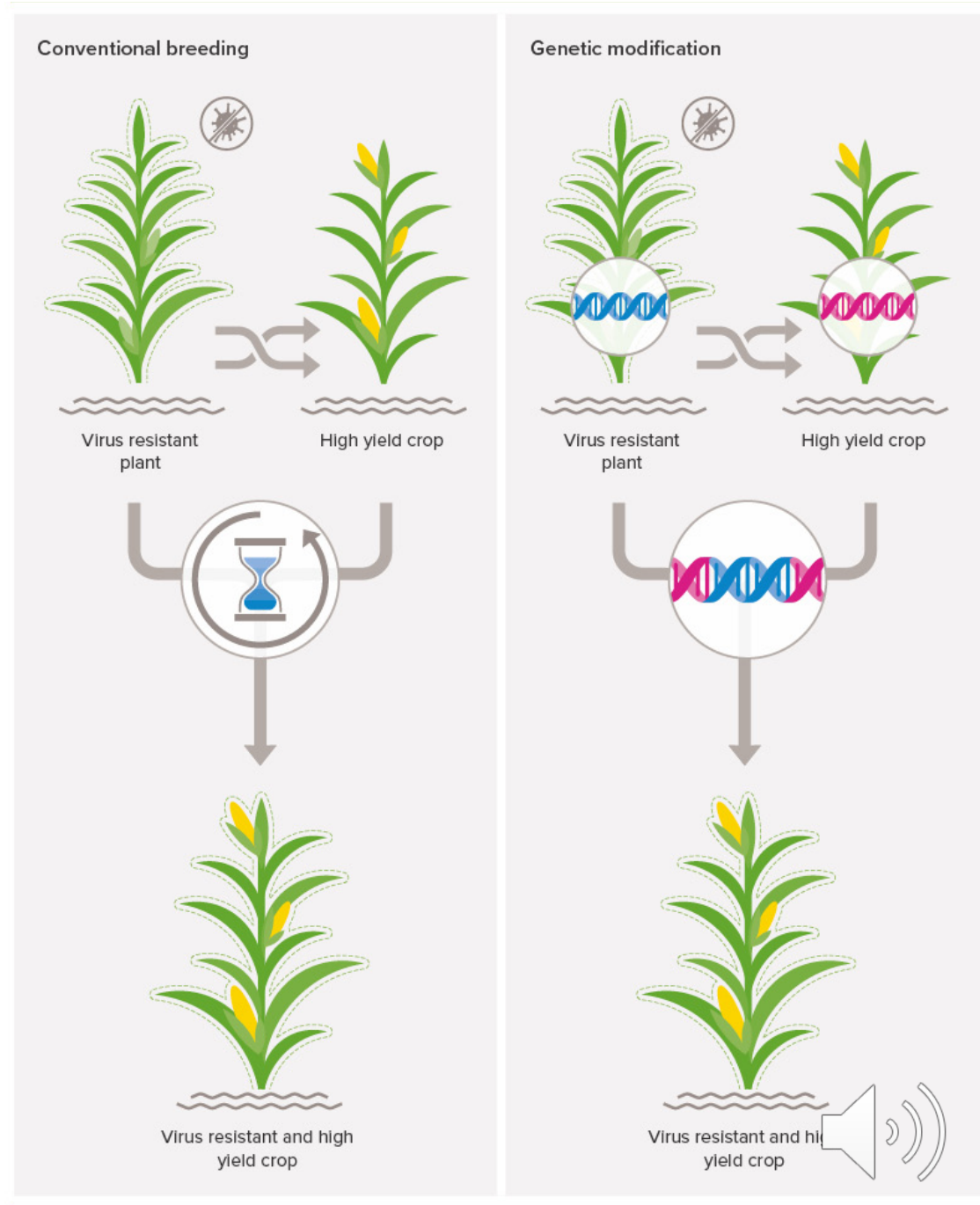
- Tarımsal üretkenliğin nüfus artışına paralel olarak artmamasından dolayı, gıda yetersizliklerinin ileride büyük bir problem olacağı düşünülmektedir [2].



Geleneksel bitki ıslahı tekniklerinin başarısı, bitki stres dayanıklılık mekanizmalarının karmaşıklığı nedeniyle sürdürülebilir tarım ürünlerinin geliştirilmesinde sınırlı kalmaktadır [3].

Bu nedenle, dünyada artan gıda talebini karşılamak için yeni ve güçlü yaklaşımlar geliştirilmelidir.

Son zamanlarda popüler bir araştırma alanı haline gelen **GENOM DÜZELTME TEKNOLOJİSİ**; özgün genlerde mutasyon oluşturma, epigenetik markörlerin yeniden programlanması ve diziye özgü değişiklikler yapılması gibi birçok işleve sahiptir [4].



Genom düzeltme, diziye özgü **endonükleazlar** kullanılarak, önceden oluşturulan bir gen bölgesinde hedeflenen **çift zincirli DNA'nın kırılması** ile başlar [5].



Bu nükleazlar arasında;

- Çinko-parmak nükleazlar (**ZFN**),
- Transkripsiyon aktivatörü benzeri nükleazlar (**TALEN**),
- Kümelenmiş, düzenli olarak aralıklı kısa palindromik tekrarlarla ilişkili endonükleazlar (**CRISPR**) yer almaktadır.

Son zamanlarda keşfedilen **CRISPR**; kolay tasarımı, yüksek etkinliği ve esnekliği sayesinde bitki genom düzeltme alanında yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır.



Ayrıca bu yaklaşımla üretilen bitkiler klasik
islah ve mutageniz teknikleriyle üretilen
bitkilerden ayırt edilememektedir.

Bununla birlikte, **2018 yılında Avrupa
Birliđi Adalet Divanı**, genom
düzeltilmesinin de GDO olarak
sınıflandırılmasına ve aynı sıkı
düzenlemelere tabi olmasına
hükmetmiştir [6].

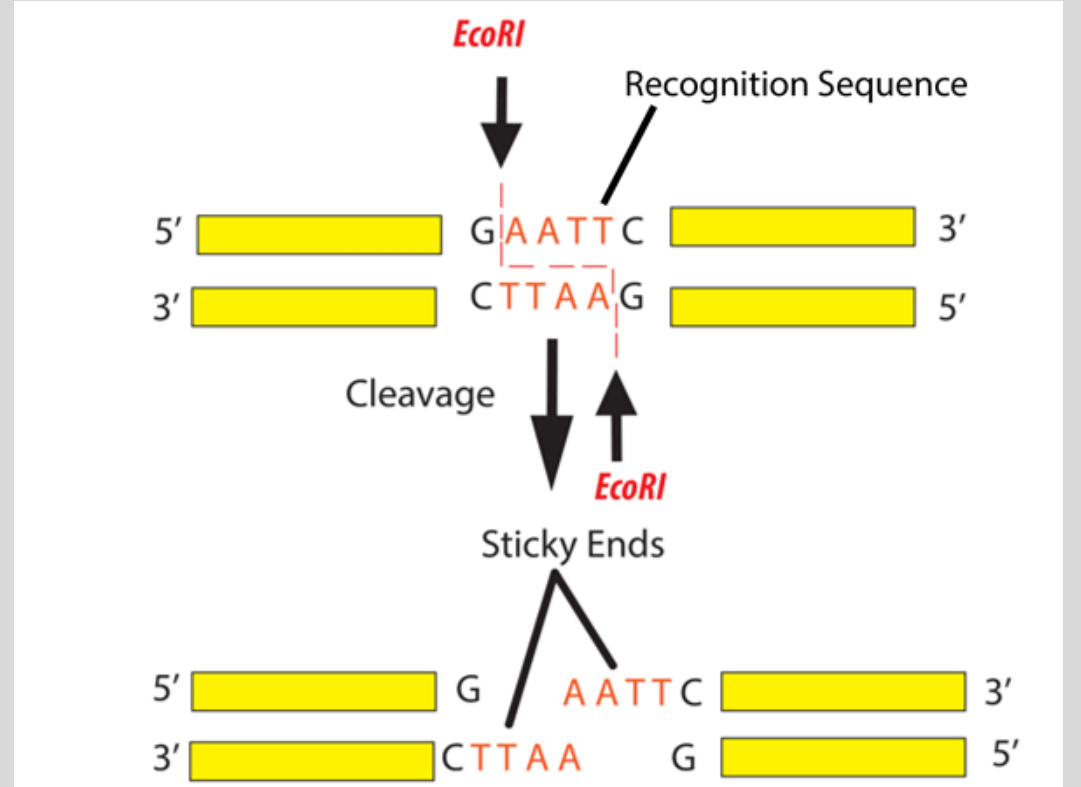
Ancak, **2018 Ağustos ayında Japonya
Hükümeti** bunun tersi yönünde karar
alarak, genom düzeltme tekniklerinin
GDO sayılmayacağını beyan etmiş ve bu
nedenle genetiği değiştirilmiş organizma
üretenlerin hükümetten onay almasına
gerek olmadığını belirtmiştir [7].



Genom Düzeltme Araçları

- ZFN'ler, TALEN'ler ve CRISPR teknolojilerinin temelinde genom düzeltme aracı olarak kullanılan diziye özgü nükleazlar yer almaktadır.
- Bu nükleazlar tıpta, moleküler biyoloji ve bitki ıslahı alanlarında son 10 yıldır geniş bir kullanım alanı bulmuştur.
- Bu nükleazlar, restriksiyon enzimlerine benzer bir şekilde, genomun düzeltileceği bölgede çift zincir kırıkları oluşturarak DNA'yı keserler [8].

Restriksiyon Enzim Kesimi



Nükleazların kesimi neticesinde DNA'da meydana gelen kırılmalar **Homolog Rekombinasyon (HR)** ve **Homolog Olmayan Uçların Birleştirilmesi (NHEJ)** olarak adlandırılan iki DNA tamir mekanizması tarafından onarılır [9].

Hücre tarafından kullanılan tamir mekanizmasına bağlı olarak genomda farklı modifikasyonlar meydana gelir.

Örneğin;

HR mekanizmasında, ekleme veya silme olaylarının indüklenmesi sonucunda genin nakavt (knock out) susturulması sağlanabilir.

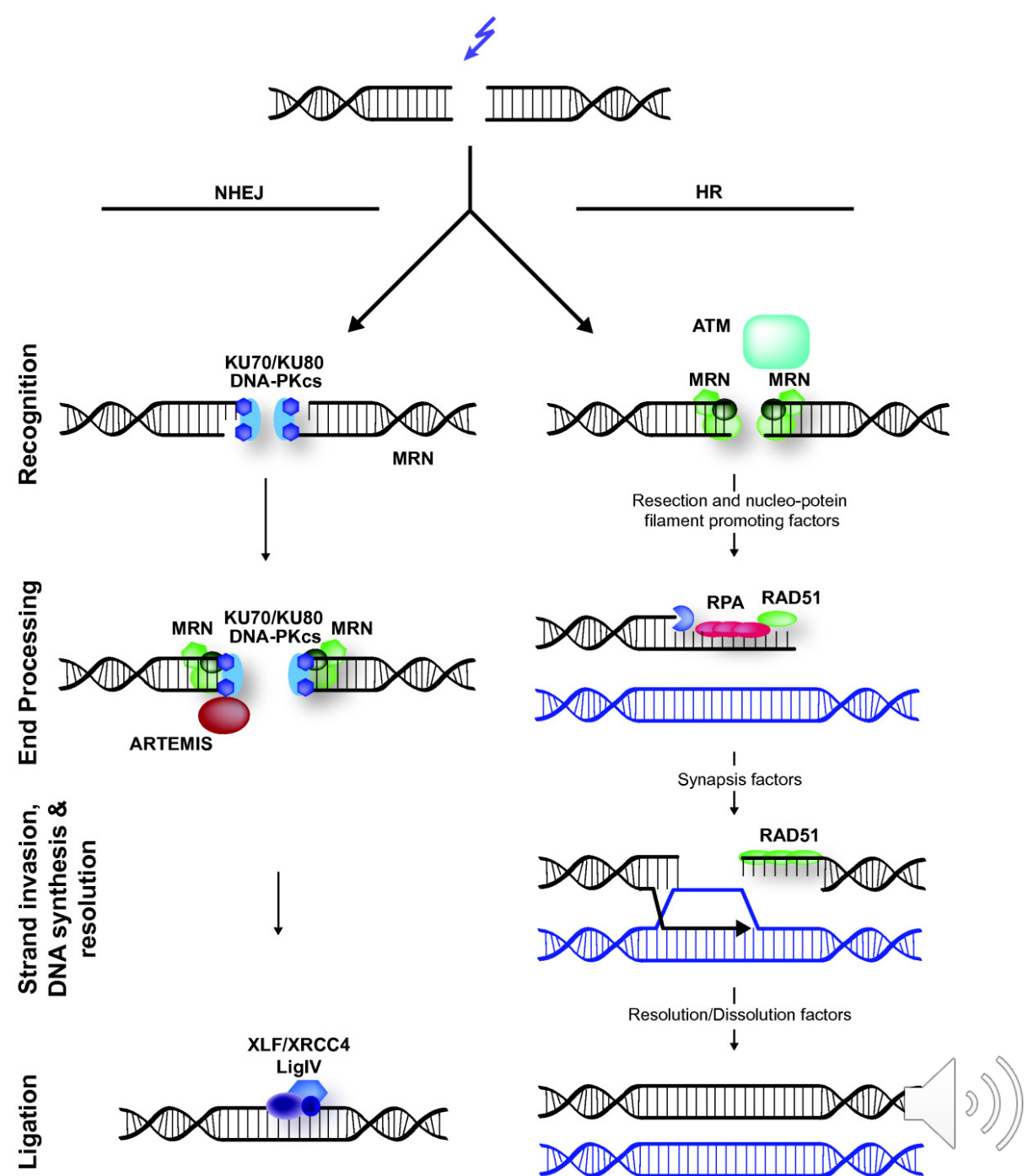


Çift zincir kırıklarına homoloji gösteren tamir şablonlarının bulunduğu durumda, gen değiştirme veya gen ekleme gibi HR tamir mekanizmalarını içeren **homolog oryantasyon onarımı (HDR)**, hatasız ve gene özgü modifikasyonlar oluşturmak için kullanılır.

NHEJ ise özellikle insanlar ve bitkiler gibi gelişmiş ökaryotlarda baskın olan bir tamir mekanizmasıdır. Genellikle çevresel mutasyonların genoma zarar vermiş olduğu zararların düzeltilmesinde kullanılır. Bu yolla genomik bir bölgeye nükleotitler eklenip çıkarılabilir ve sonuçta genomda çerçeve kayması mutasyonları gözlenebilir [9].



Homolog Rekombinasyon (HR) ve Homolog Olmayan Uçların Birleştirilmesi (NHEJ)



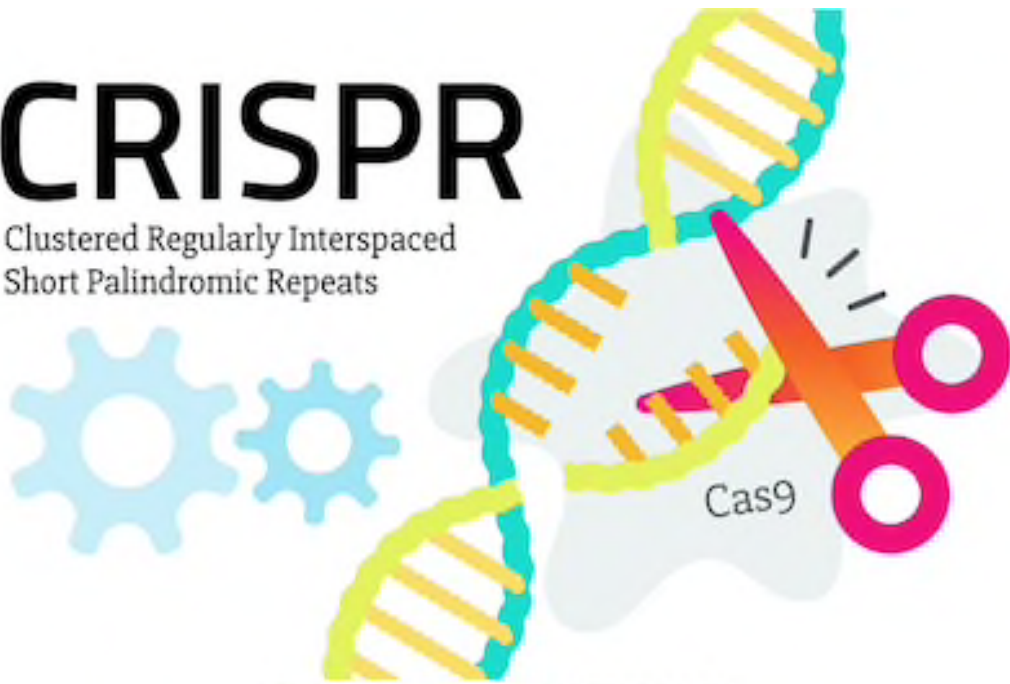
ÖZELLİK	ZFN	TALEN	CRISPR
Bağlanma prensibi	RNA-DNA	Protein-DNA	Protein-DNA
Metilasyon duyarlılığı	Duyarlı Değil	Duyarlı	Duyarlı
Maliyet	Yüksek	Orta	Düşük
Hedeflenen etki	Sınırlı	Ortalama	İyi
Temel bileşenler	Çinko parmak proteini Fok I Füzyon Proteini	TALE ve FOK I Füzyon Proteini	Rehber RNA Cas proteini
Tasarlanma süresi	Uzun (7-15 gün)	Uzun (5-7 gün)	Kısa (1-3 gün)
Çoklu gen mutasyonları	Sınırlı	Sınırlı	Sınırsız
Hedef dışı etki	Yüksek	Düşük	Düşük
Hedef dizi uzunluğu	18-24 baz çifti 4-7 aralayıcı	30-60 baz çifti 13-33 aralayıcı	20 baz çifti
Orijin	Doğada yaygın olarak bulunan çinko parmak proteinlerinden	Bitki patojenlerinde TAL efektör proteinlerinden	S. pyogenes bakteriyal bağışıklık sisteminden
Sitotoksisite	Değişken/Yüksek	Düşük	Düşük
Tasarlanma durumu	Çok kompleks	Kompleks	Basit
Kullanılan nükleaz	Fok I	Fok I	Cas
Başarı oranı	Düşük (%24)	Yüksek (>%99)	Yüksek (>%90)
Mutasyon oranı	Düşük/Değişken (%10)	Yüksek(>%20)	Düşük (<%10)



CRISPR/Cas Teknolojisi

CRISPR

Clustered Regularly Interspaced
Short Palindromic Repeats

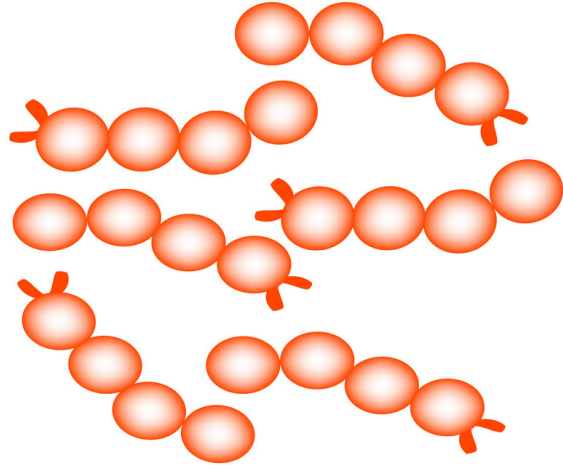




CRISPR/Cas Sisteminin Keşfi

- İlk olarak 1987 yılında Ishino vd. (1987) tarafından *E. coli* genomunda Apoptoz İnhibitör Protein (IAP) gen dizisi incelirken şans eseri 29 nt'lik tekrar kümeleri ve bu tekrarların arasında 32 nt'lik aralayıcı (spacer) DNA bölgeleri keşfedilmiştir. *Ancak bu bölgelere herhangi bir isim verilememiş ve fonksiyonları tanımlanmamıştır.*
- İlerleyen yıllarda yapılan çalışmalar bu dizilerin virüs ve ökaryotlar haricinde pek çok organizmada bulunduğunu göstermiştir.
- İsim karmaşasının ortadan kalkması için bu dizilere 2016 yılında CRISPR denilmesine karar verilmiştir.
- Günümüzde bu sistemin arkelerin %90'ında ve bakterilerin ise yaklaşık %45'inde bulunduğu bildirilmektedir [11].





Streptococcus thermophilus

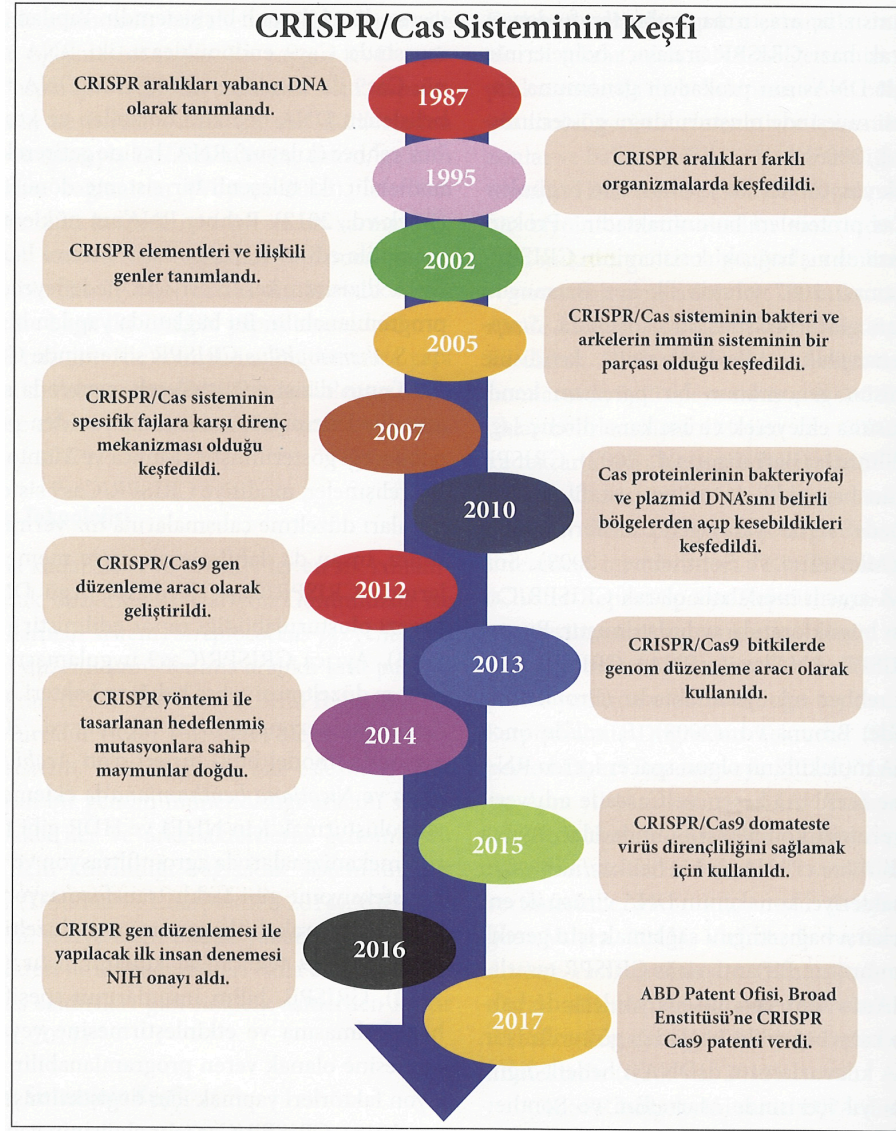
CRISPR bölgelerini saran DNA dizilerinin farklı canlılarda incelenmesinin ardından CRISPR bölgelerinden önce veya sonra Cas proteinlerini kodlayan genlerin varlığı ve CRISPR bölgelerinin 4 adet *Cas* geni ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Cas genlerinin çoğunun nükleaz ve helikaz gen ailelerine dizi benzerliği gösterdiğinin keşfinden sonra CRISPR/Cas sisteminin prokaryotların virüslere karşı geliştirmiş oldukları RNA-aracılı bir savunma sistemi olabileceği düşünülmüştür.

Prokaryotlarda kazanılmış bağışıklık sisteminin CRISPR/Cas mekanizması ilk kez 2007 yılında Barrangou vd. tarafından gösterilmiştir. Bu çalışmada, *Streptococcus thermophilus* adlı bakterinin, kendisine saldıran virüsün genomunun bir parçasını kendi CRISPR lokusuna ekleyerek virüse karşı direnç sağladığı keşfedilmiştir.



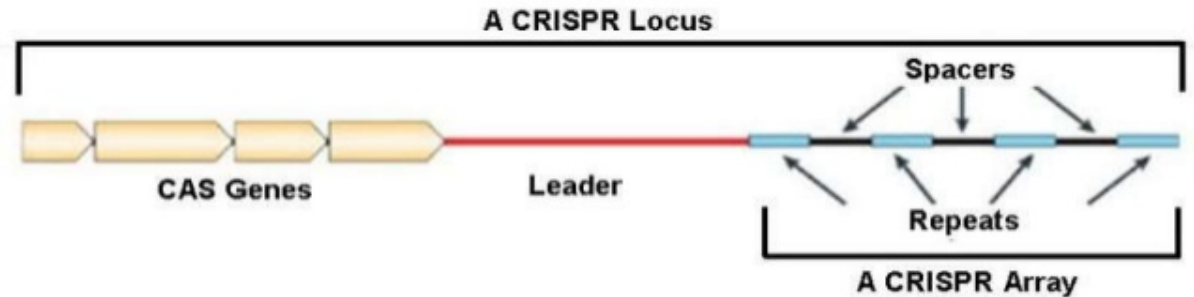
CRISPR/Cas Sisteminin Keşfi



CRISPR/Cas Sisteminin Genel Yapısal Özellikleri

Mikroorganizmalardaki orijinal CRISPR lokus sisteminde;

- Cas9 proteinine rehberlik eden **CRISPR RNA (crRNA)** olarak adlandırılan kodlamayan RNA unsurları,
- Küçük trans-kodlanmış trans-aktive edici **crRNA (tracrRNA)** dizileri olmak üzere iki RNA bulunmaktadır.
- *CRISPR dizisinin transkripsiyonunun ardından, endonükleolitik bölünme yoluyla öncü-CRISPR transkriptlerinin enzimatik işlenmesi, crRNA'ları vermektedir [14].

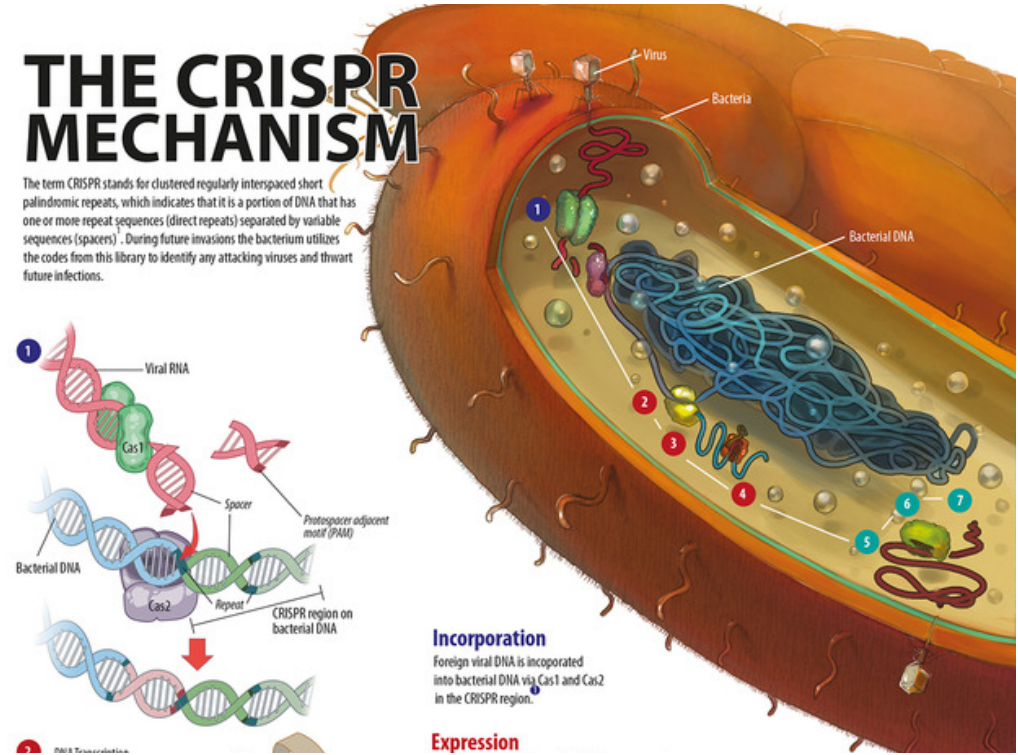


CRISPR/Cas Sisteminin Genel Yapısal Özellikleri

crRNA'nın 5' ucunda, yabancı genetik materyalden gelen bir diziyi tamamlayan **kısa bir RNA parçası**, 3' ucunda ise, CRISPR tekrar dizisinin (palindromik dizi) bir parçasını bulunduran **aralayıcı (spacer)** olarak adlandırılan bölgeler bulunmaktadır.

Organizma faj veya plazmit istilasına maruz kaldıktan sonra, bağışıklık kazanma sürecinde bu bölgeler, yabancı DNA'nın kısa parçalarının entegre edilerek enfeksiyonun genetik bir kaydının oluşturulmasını ve böylece aynı istilacının bir sonraki saldırısının önlenmesini sağlamak amacıyla Cas nükleazlar ile istilacı DNA veya RNA'nın **diziye-özü** yıkımını tetiklemektedir.

Ayrıca CRISPR lokusunun başlangıç bölgesinde bulunan ve **protoaralığa komşu motif (PAM)** olarak adlandırılan, istilacı virüs veya faja ait olan korunmuş diziler, transkripsiyonun yönünün belirlenmesini sağlamaktadır [15].



Natural CRISPR Pathway

1. DNA Invasion

Foreign DNA from a virus or plasmid invades the cell.

2. Invading DNA is Incorporated Into CRISPR Array

DNA fragments from the invading DNA are incorporated into the CRISPR locus as spacers. The exact mechanism of incorporation remains unknown.

3. Pre-crRNA Transcription

The cell constitutively transcribes a repeat/spacer group into pre-crRNA. Black boxes represent repeats. Grey boxes represent spacers. The red box represents the spacer corresponding to the invading DNA.

4. Guide RNA Formation

Constitutively expressed transactivating RNA (tracrRNA) base pairs with the CRISPR repeat sequences on the pre-crRNA. RNase III, Csn 1, and other unidentified CRISPR-associated proteins modify the pre-crRNA/tracrRNA duplex to form a guide RNA. (Deltcheva et al. 2011)

5. Cas9 Activation

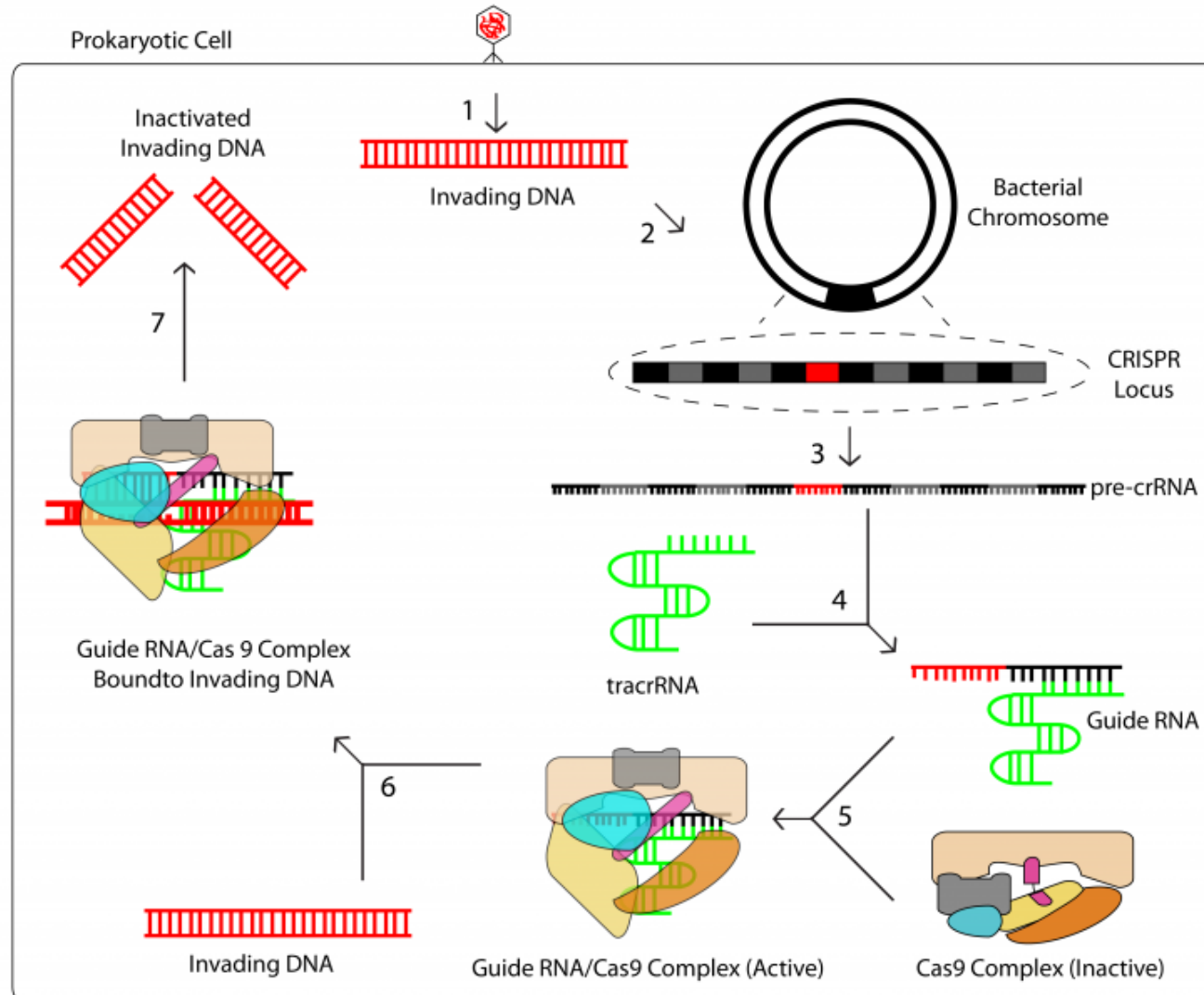
Inactive Cas9 protein binds to the guide RNA and becomes activated.

6. Target Binding

The activated guide RNA/Cas9 complex binds with the target DNA. The localization occurs stochastically (Sternberg et al. 2014).

7. Target Cleavage

The Cas9 protein cleaves the invading DNA and inactivates it.



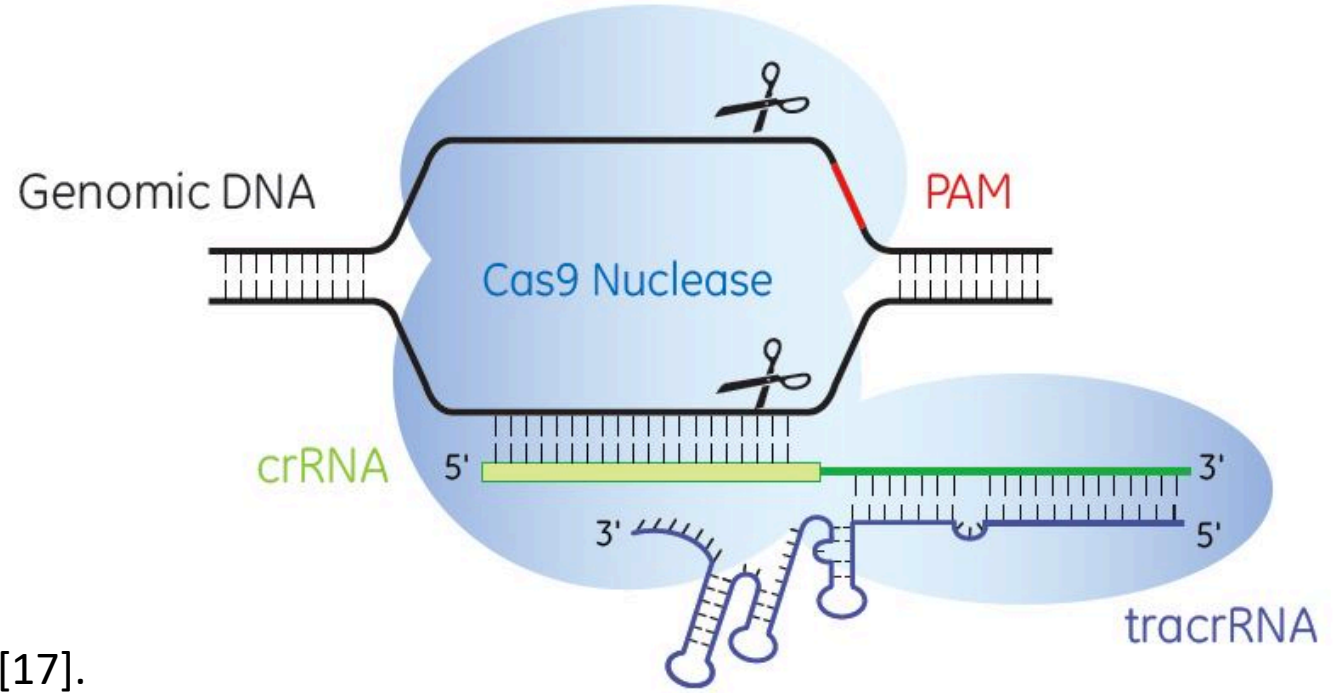
sgRNA: single guide RNA

Genomik düzeltme için yeniden programlanmış CRISPR sisteminde, tracrRNA'nın 5' ucunu crRNA'nın 3' bölgesi ile birleştirerek oluşturulmuş tek rehber RNA adı verilen tek bir RNA bulunur.

sgRNA, orijinal crRNA-tracrRNA çiftini taklit edebilir. Bu şekilde, CRISPR/Cas9 sistemi büyük oranda değişime uğrar.

Cas nükleaz kompleksi, Cas9 proteini ve sgRNA'nın kombinasyonundan oluşur.

Bir NGG dizisinin hedef bölgenin 3' ucundaki PAM bölgesi, hedef bölgenin tanımlanması ve DNA'nın kesilmesi için Cas9/sgRNA kompleksi için tek gerekliliktir [17].



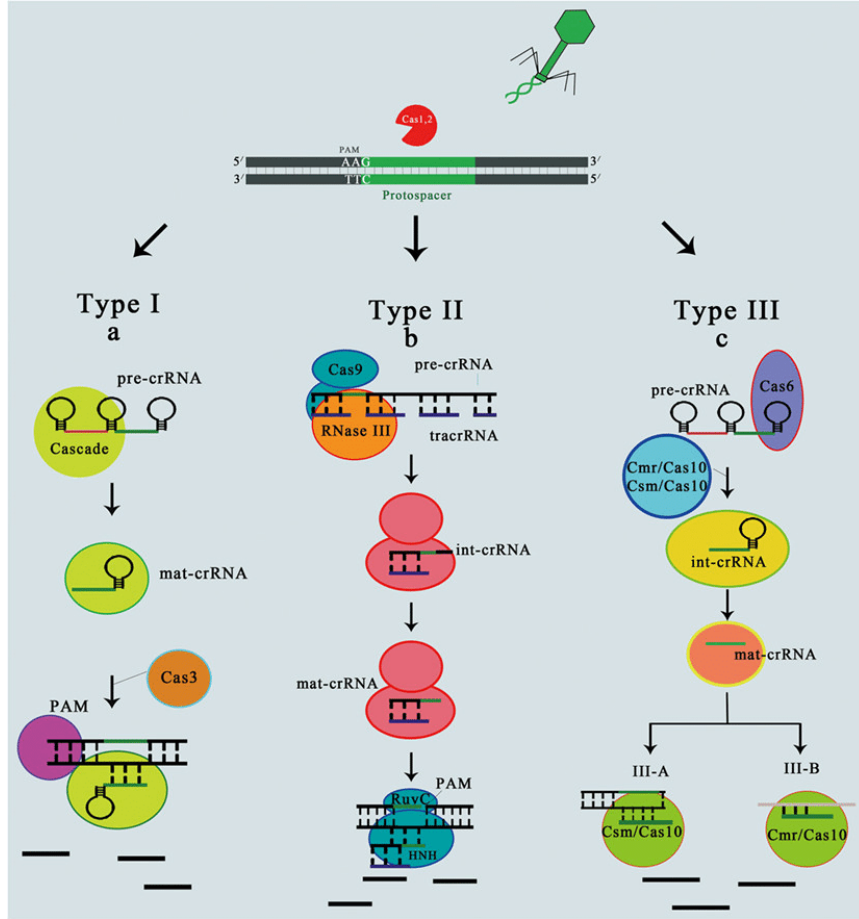


CRISPR/Cas Sisteminin Türevleri

- Tip 1 sistemi
- Tip 2 sistemi
- Tip 3 sistemi

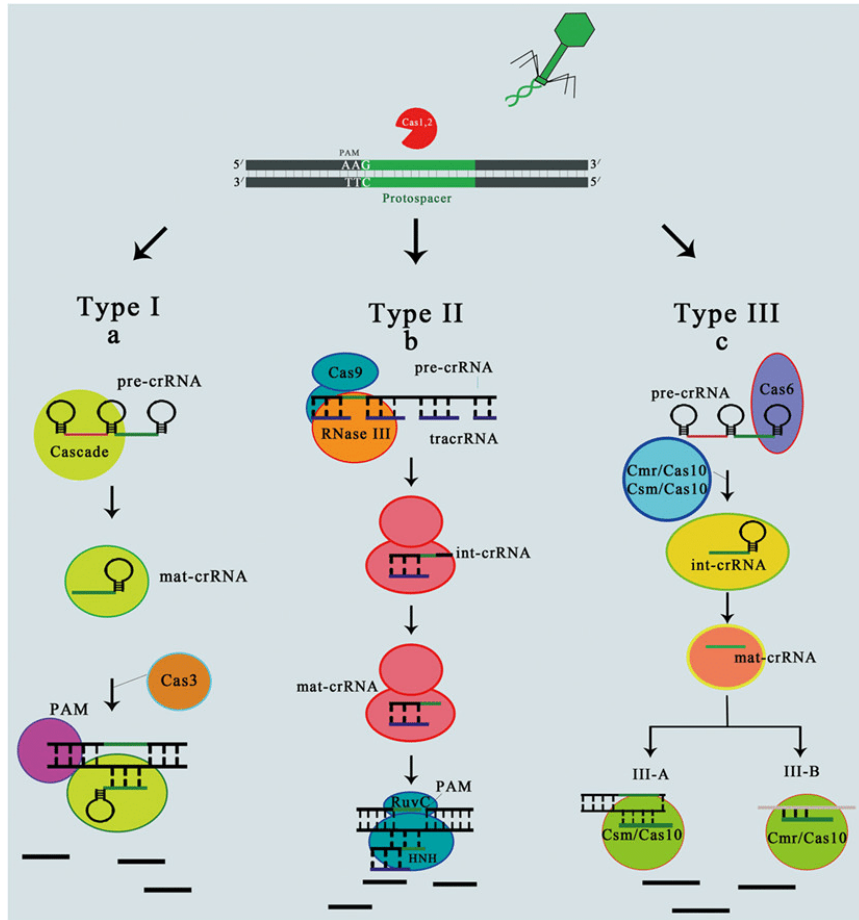


İlk defa *E. coli*'de keşfedilen Tip 1 sistemi içerisinde özellikle **Cas3** önemlidir. Kompleks içerisinde anti viral immünette etkin **Cse1, Cse2, Cas7, Cas5 ve Cas6** proteinleri yer alır.



Öte yandan, Tip2 sistemleri aynı amaç için tek bir büyük Cas proteini kullanır. İlk olarak *Streptococcus thermophilus*'da keşfedilen Tip2 sisteminde **Cas1, Cas2, Cas9** ve bazı durumlarda **Csn2** veya **Cas4** proteinleri iş görür. Bu sistemde bulunan kodlamayan trans-aktif edici crRNA (tracrRNA), crRNA ile hibridize olarak iskele yapısı oluşturur ve bu şekilde Cas9'un rehberlik etmesini kolaylaştırır. Cas9 adaptasyon aşamasına yardım eder, crRNA'nın işlenmesine katılır, crRNA ve tracrRNA'nın yardımıyla hedef DNA'nın kesilmesini sağlar.





Tip1 ve Tip2 sistemlerine ek olarak yakın zaman önce **Cas10** proteininin işlev gördüğü ve içerisinde başka Cas proteinlerinin de yer aldığı bir komplekse sahip olan yeni bir CRISPR/Cas sistemi belirlenmiş ve **Tip3** olarak tanımlanmıştır.

Tip1 ve Tip2 sistemleri DNA'yı hedef alırken, Tip3 CRISPR/Cas sistemi DNA ile birlikte RNA'yı da hedef alabilmektedir.





thank you

