

RNAi Teknolojisi ve Fitopatolojide Kullanım Alanları

Bengi Topkaya Kütük¹, Serkan Önder², Bayram Çevik³

¹Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Bitki Sağlığı Bölümü, 07160, Antalya

²Manisa Bağcılık Araştırma İstasyonu Müdürlüğü Bitki Sağlığı Bölümü, 45125, Yunusseme, Manisa

³Süleyman Demirel Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü, 32360, Çünür, Isparta

e-posta: btopkayakutuk@hotmail.com

Özet

Entansif olarak yapılan yetiştiricilikte yüksek verimli ürün alabilmek için hastalık ve zararlılar ile mücadele son derece önemlidir. Günümüzde hızlı ve etkili çözüm sağladığı için en çok tercih edilen mücadele yöntemi hala kimyasal mücadeledir. Ancak pestisitlerin bilinçsiz kullanımı sonucu insandan çevreye kadar birçok unsur olumsuz olarak etkilenebilmektedir. Pestisitlerin olumsuz etkilerini azaltmak, virüs ve virüs benzeri hastalık etmenleri gibi kimyasal mücadelenin mümkün olmadığı ajanlarla mücadele etmek ve yayılımını engellemek amacıyla; gen işlevlerinin araştırılması, bu işlevlerin susturulması veya bastırılması gibi yeni yaklaşımlar üzerine araştırmalar yapılmış ve RNA interferans (gen sessizleştirilmesi, RNAi) ortaya çıkmıştır. RNAi, istenmeyen yabancı genlerin elemine edilmesi ve aynı zamanda gen ekspresyonunun transkripsiyonel regülasyonunda hücrede kullanılan bir mekanizmadır. Gen sessizleştirilmesi hücreye dışarıdan gelen ve istenmeyen yabancı genlerin yok edilmesi ve hücredeki gen ifadesinin transkripsiyon sırasında ve sonrasında düzenlenmesinde kullanılmaktadır. RNAi fitopatolojide hastalıklara dayanıklı bitki geliştirmek amacıyla da yaygın olarak kullanılmaktadır. Virüse dayalı gen sessizleştirilmesi (VIGS) ise, RNA aracılı antiviral savunma mekanizmasını kendi yararına kullanan bir teknolojidir. Hastalık etmenlerinde korunmuş olarak bulunan genleri hedef alan RNAi'ların tasarlanıp sentezlenmesi, daha geniş spektrumlu dayanıklılık geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: RNAi, gen sessizleştirilmesi, fitopatoloji, virüs

RNAi Technology and Use of Areas in Phytopathology

Abstract

Fighting against plant diseases and pests is crucial for getting high efficient products in cultivation. Today, chemical pest control is still most preferable way in combating pests as it provides instant and effective solution. However, a vast number of conditions, from human to environment, can be negatively effected due to ignorant use of these pesticides. RNAi is a mechanism that is used in eliminating external genes and at the same time transcriptional regulation of gene expression in cell. Gene silencing is used to eliminate the external and undesired genes and to regulating gene expression during and after transcription. RNAi is generally used in phytopathology for developing virus resistant plants. Virus-based gene interference (VIGS) is a technology that uses RNA driven antiviral defence mechanism for its favor. Designing and synthesizing RNAis that are targeting protected genes in disease etmenleri, will provide opportunity to develop broad-spectrum resistance.

Keywords: RNAi, gene silencing, phytopathology, virus

Giriş

Virüslerin önemli hastalık etmeni ve diğer bitki hastalık etmenlerinden ayrıcalıklı olması nedeniyle yapılan araştırmalar ve modern tekniğin uygulamaya konulması sonucu, virüs hastalıklarının konukçusundaki etkinliği ve zararının diğer bitki hastalık etmenlerinden daha fazla olduğu kanıtlanmıştır (Anonim, 2005).

Virüsler hakkında yeterli bilgi edinmeden, bitki, insan ve hayvanların viral hastalıkları ile mücadele edilemeyeceği göz önünde bulundurulduğunda, ülkemizde bu konudaki eğitimlerde belirli aşamalar kaydedilmesine rağmen henüz istenilen seviyeye gelinememiştir (Anonim, 2005).

Çeşitli savaş yöntemleri bitki virüs hastalıklarının kontrolünde kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları şöyledir; enfeksiyon kaynaklarının ortadan kaldırılması, vektörlerden kaçınmak, dayanıklı bitki yetiştirilmesi, üretim materyallerinden virüslerin arındırılması, çapraz koruma ve biyoteknolojik yöntemler. Virüslere karşı doğrudan etkin ve koruyucu kimyasal yöntemlerin uygulanamaması, bu patojenlere karşı bitkileri korumada biyoteknolojik yöntemler pratik ve uygulanabilir olanakları sunmaktadır. Biyoteknolojik yöntemler kendi içerisinde, doku kültürleri ve protein mühendisliği olarak ikiye ayrılmaktadır.

Genetik mühendisliği ile bitkilere 1983 yılında ilk gen transferinin gerçekleştirilmesi ile günümüzde transgenik bitkiler üretilerek de

virüslere dayanıklılık sağlanmaktadır. Dayanıklılığın mekanizması ‘çapraz korunma’ olayına dayanmakta, ancak bitkiye gen aktarıldığı için bu gen yeni generasyonlara geçeceğinden, karşılıklı korunma olayında olduğu gibi bitkinin her yeni generasyonunda patojenin zayıf ırkı ile enfekte edilmesi gerekmemektedir. Virüslere dayanıklı transgenik bitkilerin geliştirilmesinde genellikle virus genomuna ait antisens RNA, replikaz genleri, örtü protein genleri, satellite RNA ve hasarlı genler, sıcak şok genleri, taşıyıcı protein genleri ve susturulmuş genler kullanılmaktadır.

Gen işlevlerinin araştırılması, bu işlevlerin susturulması veya bastırılması yöntemleri günümüzde moleküler biyoloji alanında en çok çalışılan konular olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu amaçla işlev bloklayıcı antikorlardan, oligonükleotidler, dominant-negatif mutasyonlar ve genlerin etkisizleştirildiği “knock-out” proteini hayvanların oluşturulmasına kadar pek çok değişik teknik kullanılmaktadır. Bu tekniklerin hepsi sahip oldukları avantaj ve dezavantajlar sayesinde bu alanda birçok ilerlemeye katkıda bulunmuştur. Son yıllarda bu tekniklere ek olarak gen ifadesinin durdurulması amacıyla kullanılan “RNA interferans” (RNAi) tekniği öne çıkmaya başlamıştır.

RNA sessizleştirilmesi ilk olarak, organizmaları RNA virüslerinden koruma mekanizması veya dönüştürülebilir elementlerin rastgele birleştirilmesini engelleyen mekanizma olarak tanımlanmıştır.

RNA interferans (RNAi), bir çok ökaryotik organizmada gen ekspresyonunun çalışmasını çift iplikçikçi RNA aracılığı ile engellenmesini sağlayan korunmuş bir mekanizmadır. Yani; bir hedef genin transkriptinin, sekans spesifik (diziye özgü) bir ilişki temelinde, çift zincirli RNA (dsRNA) ile durdurulması olayı olarak tanımlanır. Başka bir ifade ile; hücre içerisinde meydana getirilen ya da doğal olarak üretilen çift zincirli RNA molekülünün (siRNA), evrimsel olarak korunmuş bir dizi ardışık moleküler olay zinciri ile komplementeri olan mRNA’ya bağlanıp parçalanması sonucu gen anlatımının transkripsiyon sonrası susturulması işlemidir (Anandolakshmi ve ark., 1998).

Bu çalışma kapsamında; RNAi mekanizmasının anlaşılmasına yardımcı olacak teorik bilgiler ve son gelişmeler ele alınarak,

bitki virüsleri ile mücadelede RNAi kullanımının sağlayacağı faydalar üzerinde durulmaktadır.

Tarihçe

RNAi’nin bulunuşu bazı beklenmedik deneme sonuçları ile olmuştur. 1990 yılına, yukarı doğru regüle edici olarak aktivite gösteren genler, petunyalarda bitki renklerini değiştirmede kullanılan bir ekzogen transgenler olarak tanıtılmıştır. Bir genin diğerine göre daha çok ifade edilmesi sonucunda daha koyu renkli çiçekler beklenirken, bazı durumlarda çiçeklerde tamamen renk kaybı olduğu gözlemlendi. Botanikçi olan Napoli ve Stuitje gruplarının petunya bitkisinde yaptıkları rastlantısal bu gözlem, araştırmacıları yeni bir antisens teknolojisine yönlendirmiştir. Napoli ve arkadaşları bitkilerde ‘Chalcone Synthase’ (chs) geninin yukarı ekspresyonu konusunda bir rapor yayınlamışlardır. Pigmentasyonu katalizleyen enzimlerin etkilerini, gen (*chs* geni) ilave ederek artırmak istemişlerdir. Denemelerinde daha koyu renkte petunya çiçeği elde etmek isterken beyaz-mor alacalı ve beyaz renkte çiçekler elde etmişlerdir. Burada pigment üreten gen, güçlü bir promotörün kontrolü altındadır. Aslında co-supresyon olan fenomenin ilgili homolog geni baskılanmıştır. Yani, transgenlerin genlerin ifadesini etkilemesi ile chalcone sentezinin aktivitesi azalır ve kısmen beyaz renk elde edilir. Beyaz çiçek elde etme olayında, endojen genlerin ve transgenlerin her ikisi de aşağı regüle edilmişlerdir. Bu olguya, ‘bir genin diğerine üstün gelmesi’ şeklinde değinilmiş ve sonra Jogersen ve arkadaşları bunun sebebinin chalcone syntase geni (*chs*) içindeki dsRNA bölgesinin dejenerasyonunun bir sonucu olduğunu, bunun bir ‘Transkripsiyon Sonrası Gen Sessizleştirilmesi’ (PTGC) ile ilgili olabileceğini rapor etmişlerdir. Bitkilerdeki tüm bu başlangıç gözlemlerinden sonra, dünyadaki birçok laboratuvarıda bu olgunun başka organizmalarda meydana geliş sıklığı araştırılmıştır (Anonim, 2006).

1992 yılında, baskılama olarak adlandırılan olgu *Neurospora crassa* fungusunda gözlenmiştir. Bunun üzerine, bitki virologları transgenler tarafından RNA üretiminin engellenmesi nedeniyle oluşan virüs hastalıklarına karşı bitki dayanıklılığını geliştirmek üzerine çalışmışlardır. Bu olgu ‘Virüsle Uyarılmış Gen Sessizleştirilmesi’ (VIGS) olarak tanımlanmıştır.

1998 yılında, MIT'den Craig C. Mello ve Washington Carnegie Enstitüsü'nden Andrew Fire, dsRNA'nın *Caenorhabditis elegans*'a enjekte edilmesinden sonra, gen sessizleşmesi etkisinin olduğunu rapor etmişlerdir. Bu araştırmacılar, protein üretimine ne mRNA ne de antisens RNA enjeksiyonunun etkisi olduğunu; ama dsRNA'nın hedeflenen geni başarılı bir şekilde susturduğunu gözlemlemişlerdir. Çalışmanın sonucu olarak, yeni bir terim ismi olan 'RNAi' verilmiştir. RNAi mekanizması Science dergisi tarafından 2001'de yılın molekülü ve 2002'de son on yılın en önemli bilimsel hamlesi olarak seçilmiştir. Bu araştırma daha önce açıklanmayan bir ajanın tanımlanmasına olanak vermiş ve bunun için 2006 yılında Fire ve Mello, Fizyoloji ve Tıp Alanında Nobel Ödülü'ne layık görülmüşlerdir. Sonra bu olgu yassı kurtlardan, tripanosomlara ve sineklere kadar değişik organizmalarda çalışılmıştır. Son çalışmalar memelilerde de gen susturulması olayında RNAi'nin rol oynadığını göstermektedir. Ancak bu mekanizma birtakım sorunları da beraberinde getirmektedir. Özellikle siRNA'ların hücre içine gönderilmesi efektif bir biçimde olamamaktadır. Memeliler üzerinde yapılan ilk deneyler hayal kırıklığı yaratmıştır; çünkü dsRNA'nın tantımı, hücresel metabolizma değişikliğine öncülük eden dsRNA'nın tanımı bağışık yanıtı harekete geçirmiştir. Bu durumun önüne geçmek için, küçük RNAs'ler kimyasal olarak sentezlenmiş ve kullanılmıştır. Bu sonuç arzu edilen gen-spesifik sessizleştirmeyi ve RNAi'nin memeli hücrelerinde de çalıştığını belirlemiştir. Akabinde, küçük RNAs'lerin (siRNAs) RNAi sürecindeki RNA ayrıştırmasının aracı olduğu kaydedilmiştir. 2003 yılında, tedavi edici siRNAs'lar kobay farelerde hepatite karşı kullanılmış ve bunu takiben, memeli ve insan hücrelerinde büyük ölçekli taramalar yapılmıştır. 2004 yılında FDA (Food and Drug Administration), RNAi'yi ilk kez onaylı klinik deneyde kullanarak tasdik etmiştir. O tarihten beri çeşitli model sistemlerde, RNAi'nin tedavi edici amacını geliştirmek için bir çok araştırma yapılmıştır. Tarih cenveli, dönüm noktası olayların keşfi ve RNAi'nin geliştirilmesi için Fig'de temsil edilmiştir (Anonim, 2006).

RNAi Mekanizması

Bitkiler, tek hücreliler, mantarlar ve nematodlarda RNAi tek sarmallı RNA'dan çift sarmallı RNA uyarıcıları oluşturan bir RNA'ya

bağlı RNA polimerazdan (cRdRP) oluşmaktadır. RNAi, kromatin baskılamaya yoluyla veya hedef RNA'yı parçalamak suretiyle transkripsiyon sonrası gen susturma (PTGS) yoluyla transkripsiyonel gen susturmayı (TGS) uyarabilir. RNA müdahale yolları, çift sarmallı (dsRNA) RNA uyarıcılarını kullanarak bunları Dicer proteini ile parçalamak suretiyle 21-25 nükleotid uzunluğunda kısa susturucu RNA'lar (siRNA) oluştururlar (Waterhous ve ark., 2001).

RNA interferansı, istenmeyen yabancı genlerin (eksternal RNA'lar, viral genler, transpozonlar vb. gibi moleküler parazitler) elimine edilmesi ve aynı zamanda gen ekspresyonunun transkripsiyonel regülasyonunda hücrede kullanılan bir mekanizmadır ve oldukça komplike bir biyolojik regülatör olarak görev yapmaktadır.

Meyve sineğinde (*Drosophila melanogaster*) yapılan çalışmalar sonucunda, RNAas III familyası enzimin (DICER) ve nükleaz aktiviteli multiprotein kompleksinin (RISC = RNA-Induced Silencing Complex) bu işlemde iki önemli oyuncu olduğu belirlenmiştir (Kusaba, 2004).

İki iplikçikli RNA, Dicer enzimine bağlanır. RNAi yol açımı kullanan tüm organizmaların Dicer'a ihtiyacı vardır. Dicer, dsRNA'yı küçük interfere edici RNAi olarak adlandırılan siRNA'lara parçalar. Daha sonra siRNA'lar RNA ile uyarılan RISC kompleksine bağlanır. RISC küçük parçalara ayrılmış RNA iplik çiftlerinden birini alır. İki iplikçikten birini attıktan sonra ötekini üzerine bağlar. RISC'e bağlı iplik parçası da bir sonda gibi kendi şifresine uyan mRNA'ları arar. Üzerindeki baz dizilimine uyan mRNA ipliğini yakalayınca, RISC bu mRNA'yı paramparça eder. Böylece mesaj yerine ulaşamaz ve işlevi o proteini kodlamak olan gen susturulmuş olur. Yani protein sentezi transkripsiyon sonrası düzenlenir. Bu işleme 'transkripsiyon sonrası gen susturulması (PTGS)' adı verilir. (Savenkov ve ark., 2002).

RNAi mekanizmasının aşamaları şu şekildedir;

RNA'ya bağlı RNA polimeraz (RdRp=RNA dependent RNA polymerase) enzimi yardımı ile tek sarmallı RNA'dan çift sarmallı RNA'lar (dsRNA=double strand RNA) oluşur.

A) RNAi işlemini çift sarmallı RNA'lar başlatır.

B) Uzun dsRNA hücreye girdiğinde, DICER isimli enzim tarafından tanınır ve bölünür.

C) DICER'in bölmüş olduğu 21-23 nükleotidlik kısa susturucu RNA'lara siRNA denir.

D) siRNA, ana bileşeni Argonaute (Ago) proteini olan RISC ile birleşir. RISC, siRNA sarmalını birbirinden ayırır.

E-F) siRNA'nın geriye kalan iplikçığı RISC öncülüğünde hedef mRNA ile eşleşir ve bu RNA molekülünü içeriden keserek parçalar (Şekil 1).

RNA interferansın mekanizması beş temel işlem halinde özetlenebilir;

1. dsRNA tanıma ve tarama prosesi
2. dicer-RDE-1 (RNAi deficient-1) yani bir Rnase III familyası enzim eşliğinde çift zincirli dsRNA'nın tanınması ve kesilmesi
3. siRNAs üretimi: 21-23 nükleotid uzunluğunda RNA ların oluşması
4. siRNA-RISC kompleksi ikilisinin spesifik komplementer mRNA bölgesi ile birleşmesi
5. RISC içindeki ekzonükleazlar tarafından hedef mRNA'nın tahrip edilmesi ve RISC kompleksinin yeni bir işlem için başa dönmesi (Kadotani ve ark., 2003) (Şekil 2)

RNAi Teknolojisinin Fitopatolojide

Kullanımı

Bitkilerde Virüs Aracılığı ile Gen Sessizleştirilmesi

Viroidler ile RNA Virüse dayalı gen sessizleştirilmesi (VIGS), RNA aracılı antiviral savunma mekanizmasını kendi yararına kullanan bir teknolojidir. Mekanizma, değiştirilmemiş virüsler ile enfekteli bitkilerde belirli bir genoma karşı hedeflenmiştir. Bununla birlikte, konukçu geninden türemiş ekler taşıyan virüs vektörleriyle olan süreçte ek olarak karşılığı olan mRNA'lara karşı da hedeflenebilir. VIG, gen fonksiyonu için yapılan analizlerde ve yüksek verimli fonksiyonel genomik için adapte edilmiş bitkilerde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu zamana kadar en çok yapılan uygulamalar *Nicotiana benthamiana* üzerinde olmuştur; fakat yeni vektör sistemleri ve methodları Arabidopsis'i de içeren başka bitkilerde

kullanılmak üzere geliştirilmiştir (Zhang ve ark., 2006).

Sessizleştirilmesi

Viroidler dizilerinde kodlanmış protein ürünü içermemelerine rağmen, bitkilerde simptom oluşturma yetenekleri uzun zaman tartışma konusu olmuştur. Şimdi ise, RNA sessizleştirilmesinin bu süreç ile ilgili olduğu kanıtlanmıştır. Birincisi, viroid genomunda olan değişiklikler onun virülensini çarpıcı bir şekilde değiştirebilir. Burada ifade edilen durum, üretilen herhangi bir siRNA'nın hedef mRNA ile daha az birbirini tamamlayan ana çiftleşme yapmasıdır. İkinci olarak, siRNA'lar enfekteli bitkilerden izole edilen viroid genomlarındaki dizilere karşılık gelmektedir. Yani viroidler çift sarmallı RNA yardımıyla replike edildiklerinde, DICER enzimi tarafından hedef alınır ve RNA aracılığı ile sessizleştirilen kompleks üzerine yüklenen siRNA'lara bölünürler. Bu viroid siRNA'ları, bitkinin kendi mRNA'sı ile karşılıklı gelebilecek ana dizileri içerebilir ve klasik viroid simptomlarının neden olduğu translasyonun bozulmasını veya inhibasyonunu başlatabilir (Lindbo ve ark., 2006).

Sonuç ve Öneriler

RNAi hücreye dışarıdan gelen ve istenmeyen yabancı genlerin yok edilmesi ve hücredeki gen ifadesinin transkripsiyon sırasında ve sonrasında düzenlenmesinde kullanılan oldukça karmaşık bir mekanizmadır. RNAi, sitoplazmadaki hedef mRNA'nın sekans spesifik parçalanmasını sağlar. Bitkilerdeki RNAi sistemi, birçok RNAi tetikleyicisine farklı yollar kullanılarak cevap verir.

Bitki RNA susturma yollarının biyokimyasal mekanizmalarının ortaya çıkarılması ile yoğun çalışmalar yapılmasına ve büyük bir aşama kaydedilmesine rağmen henüz tam anlamıyla belirlenmemiştir. Dizi spesifik bir mekanizma olması ve dar spektrumlu bir dayanıklılık sağlamasından dolayı, genetik varyasyonlardan çabuk etkilenmektedir. Bu teknolojinin on yıl gibi kısa bir geçmiş olması rağmen, fitopatolojide hastalıklara dayanıklı bitki geliştirmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır.

Normal bitki döngüsünü engellemeyen veya en az düzeyde etkileyen doku veya organ spesifik RNAi vektörlerinin geliştirilmesi gerekmektedir. miRNA gen yapısının ortaya çıkarılması, doku spesifik RNAi'lerin

geliştirilmesi için daha fazla seçenek sağlayacaktır.

RNAi yolunu baskılayan ve transgenleri yüksek düzeyde ifade eden vektörlerin geliştirilmesi, bu alandaki ilerlemeyi de beraberinde getirecektir.

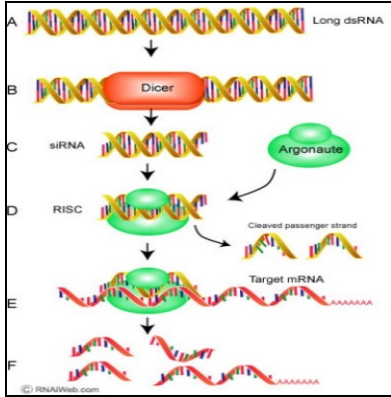
Hastalık etmenlerinde korunmuş olarak bulunan genleri hedef alan RNAi'ların tasarlanıp sentezlenmesi, daha geniş spektrumlu dayanıklılık geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

Kaynaklar

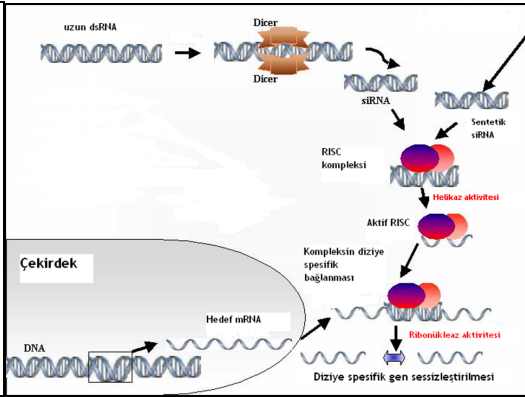
- Anandolakhmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallery, C.A., Smith, H.T., Vance, B.V., 1998. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 13079-13084.
- Anonim, 2005. www.pbs.org/wgbh/nova/sciencenow/3210/02.html. Erişim: Nisan 2009.
- Anonim, 2006. www.en.wikipedia.org/wiki/RNA_interference. Erişim: Nisan 2009.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M., Kostas, S., Driver, S., Mello, C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA

in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391 (6669): 806-811.

- Kusaba, M., 2004. RNA interference in crop plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 15:139-143.
- Lindbo, J.A., Dougherty, W.G., 2006. A brief history of RNAi silence of the genes. *The FASEB Journal*. 20:1293-1299.
- Savenkov, E.I., Valkonen, J.P.T., 2002. Silencing of a viral RNA silencing suppressor in transgenic plants. *J. of General Virology*. 83: 2325-2335.
- Waterhouse, P.M., Wang, M.B., Lough, T., 2001. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411: 834-842.
- Zhang, X., Yuan, Y., Pei, Y., 2006. Cucurbit mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Arganoutel cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev*. 20: 3255-3268.



Şekil 1. RNAi mekanizmasının aşamaları (Napoli ve ark., 1990)



Şekil 2. RNAi mekanizmasının hücre içerisindeki yolu (Anonim, 2006)