

YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMLERİNE YENİLİKÇİ YAKLAŞIMLAR: TRANSKRİPTOM KURSU



Genomik Araştırmalarda Yeni Nesil Dizileme ile Transkriptom 04.07.2024

Dr. Öğr. Üyesi Müge Gülcihan ÖNAL

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji AD.
&
Genkök Müdür Yardımcısı

İçindekiler

- Yeni Nesil Dizileme (YND/NGS) Nedir?
- Tarihçesi
- NGS platformları
- Transkriptom
- RNA-seq
- NGS ve Transkriptom Uygulamaları



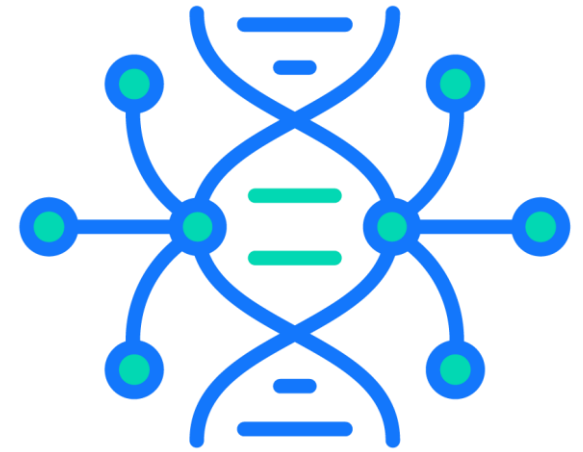
Yeni Nesil Dizileme Nedir?

- DNA ve RNA dizilemesi ve varyant/mutasyon tespiti için kullanılır. Büyük Paralel Dizileme veya İkinci Nesil Dizileme olarak da adlandırılıyordu.
- NGS, DNA fragmanlarını aynı anda sıralayabilen bir yöntemdir. Bu sayede, geleneksel dizileme yöntemlerine kıyasla çok daha hızlı ve ucuzdur. NGS sayesinde, tüm insan genomu sadece birkaç gün içinde dizilebilir hale gelmiştir.



-

- Son yıllarda geliştirilen yeni nesil DNA dizileme teknolojisi, **genetik/epigenetik düzenleyici ağların, kromatin yapısı, nükleer yapılanma ve genom varyasyonları** hakkında bilgi üretimini sağlayan önemli bir araç olmuştur.
- Yeni nesil DNA dizileme sistemleriyle **yüksek doğrulukla, ultra hızlı** olarak, dizileme yapılabilmektedir. Bu yöntemle elde edilen bir mikrobiyal genom dizisi araştırmacılara başka hiçbir deneysel yöntem ile elde edilemeyecek kadar zengin ve özgün bilgi sağlamaktadır.



YENİ NESİL DİZİLEME ÇALIŞMA ALANLARI

- Genom dizileme
- Ekzom dizileme
- Hedeflenmiş dizileme
- Transkriptomik ve RNA dizileme
- Metagenomik ve mikrobiyomlar
- Metilomik ve Epigenomik

DNA Sekanslamaları

- **Whole Genome Sequencing (WGS)**
 - Tüm genomu sekanslar
 - Mutasyonları ve hastalıkları tespit eder
 - Klinik ve diyagnostik amaçlı kullanılır
- **Targeted Sequencing**
 - Genomdaki belirli bölgeleri sekanslar
 - Daha hızlı ve fiyat-performans odaklı
 - Varyantları belirler
 - Daha küçük ve kontrol edilmesi kolay data sunar.
- **Whole Exosome Sequencing (WES)**
 - Tüm protein kodlayan bölgeleri sekanslar
 - Daha hızlı ve daha az maliyetli
 - Protein kodlayan bölgelerdeki varyasyonları
 - Hastalık teşhisinde
 - Kişiselleştirilmiş tedavi yöntemlerinde

RNA Sekanslamaları

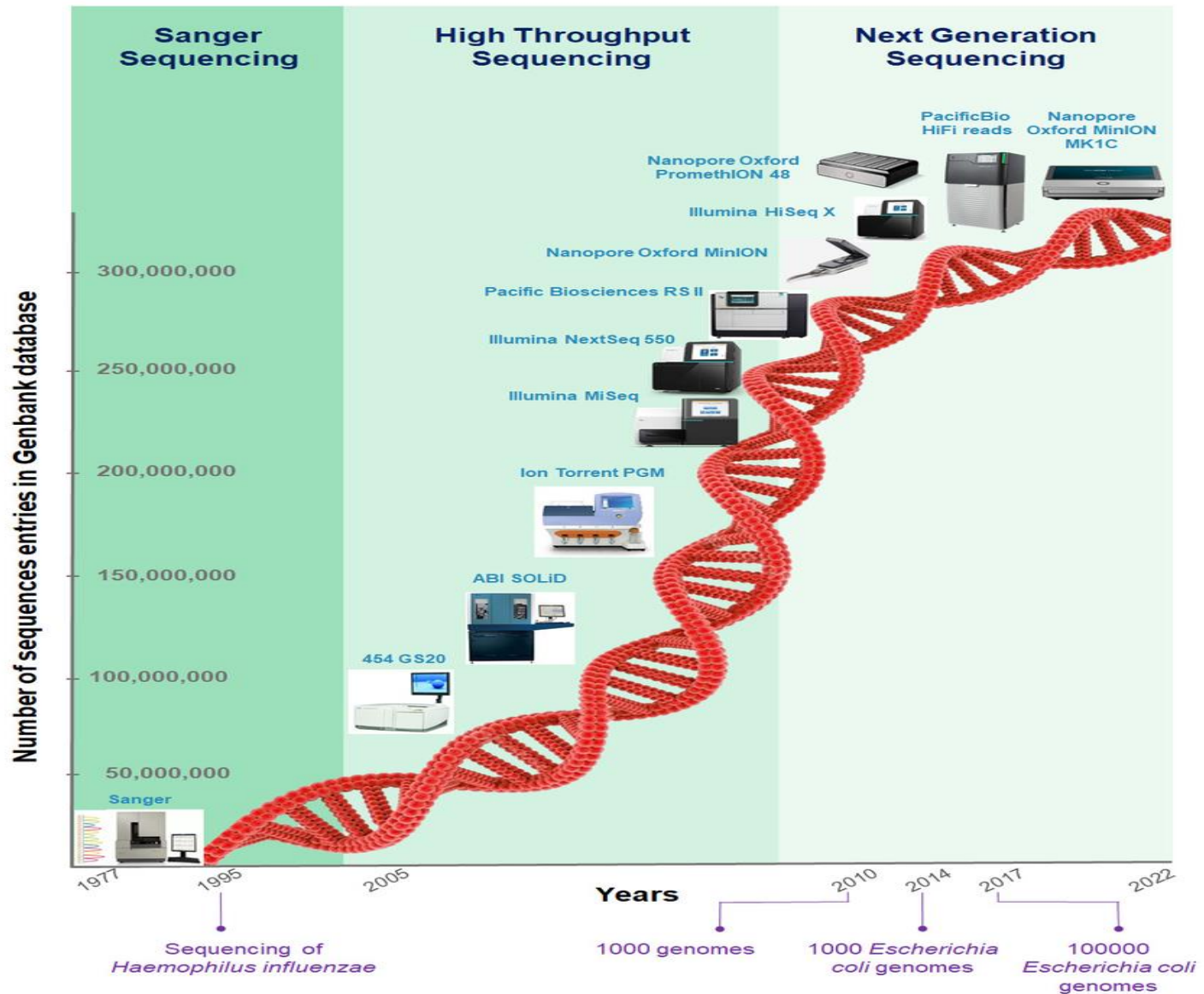
- **Whole Transcriptome Sequencing**
 - Tüm transkriptomu sekanslar
 - Gen ekspresyon seviyelerini belirler
 - Kodlanan ve non-kodlanan bölgeleri içerir
 - mRNA ekspresyonu, gendeki değişimler, gen füzyonu, SNP, alternatif splicing ve RNA modifikasyonlarını inceler.
- **Targeted gene expression with RNA-Seq**
 - Belirli bölgeleri sekanslar
 - Genellikle kodlama transkriptleri seçilir
 - tRNA, miRNA veya small RNA'lar da seçilebilir

Epigenomiks

Chip-Seq

- Protein bağlanma noktalarını tespit eder
- DNA-protein kompleksleri ile başlar
- Bağlanmamış oligonükleotitleri keser
- Protein spesifik antikorlar kullanır
- Protein bağlanma noktalarını belirler.
- **ATAC-seq ve DNase-seq**
- **Methyl-Seq**
 - Tüm genomu ve hedeflenen bisülfid DNA dizisini analiz eder

Tarihçesi



DİZİLEME TEKNOLOJİLERİ

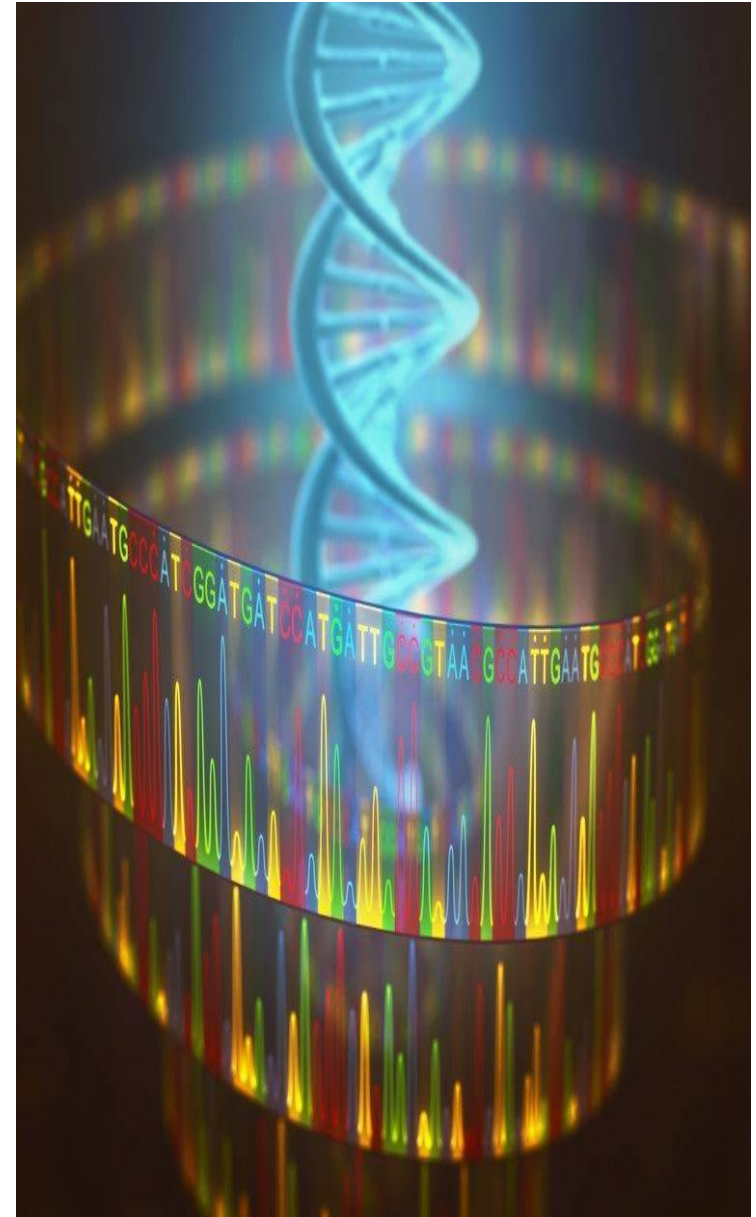
a) Birinci Nesil Dizileme

Watson ve Crick'in DNA'nın çift sarmal yapısını yayımlamasından on iki yıl sonra ilk polinükleotid dizisi belirlenmiştir. Bu nükleotid dizisi 77 baz uzunluğunda olan maya alanin tRNA'sıdır. Fakat kullanılan yöntemin zaman alması ve zahmetli olması nedeniyle dizinin belirlenmesi yıllar almıştır.

1976 yılında benzer bir yöntem kullanılarak genomu 3569 nükleotid uzunluğunda olan bakteriyofaj MS2 dizilenmiştir.

1977 yılında DNA dizileme için iki yöntem ortaya çıkmıştır: Maxam-Gilbert yöntemi ve Sanger yöntemi

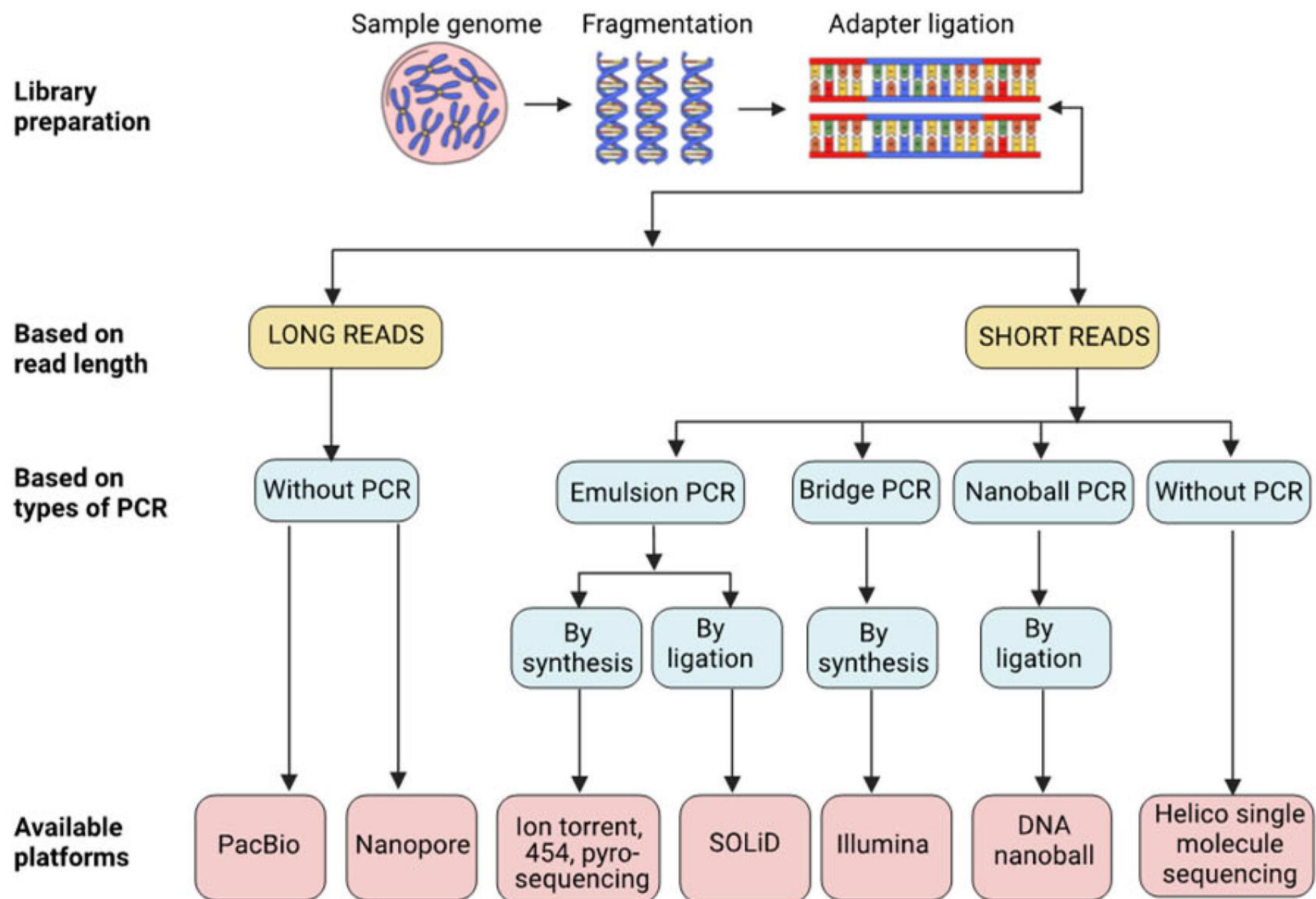
- Maxam-Gilbert yöntemi, kimyasallar kullanılarak farklı boyutlarda DNA parçalarını oluşturulması esasına dayanmaktadır.
- Dört farklı tüp içerisinde DNA'nın belli bazlardan kırılmasını sağlayan kimyasallar kullanılarak DNA parçaları elde edilir.
- Elde edilen DNA parçaları jelde yürütülür ve büyüklüklerine göre DNA dizisi belirlenir.



b. İkinci Nesil Dizileme

İlk ortaya çıkan ikinci nesil dizileme teknolojisi DNA sentezi sırasında DNA zincirine nükleotid eklenmesiyle ortama salınan pirofosfatın bir çeşit enzimatik reaksiyonlar sonucunda ortaya çıkardığı ışık şiddetine göre nükleotidin belirlenmesini sağlamaktadır.

Pirodizileme yöntemi DNA polimerazın doğrudan etkisini gerektirdiği için sentez yoluyla dizileme prensibine dayanmaktadır.



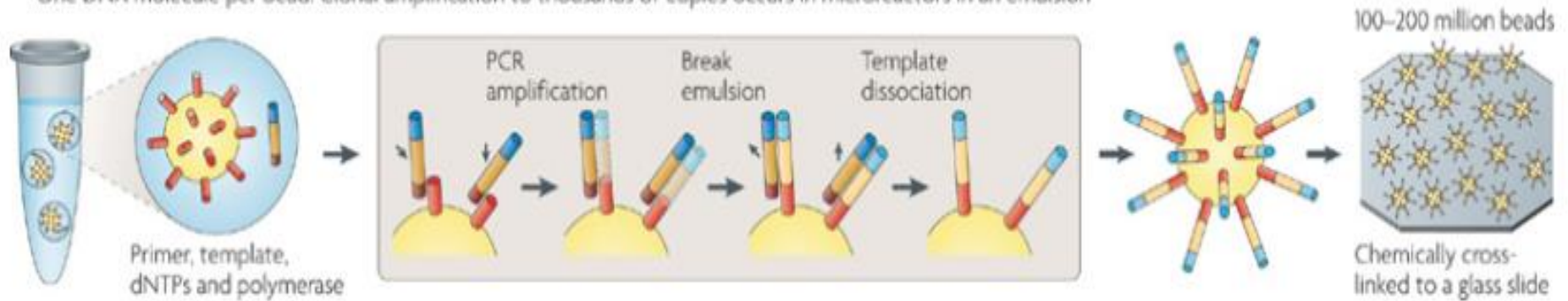


İkinci nesil dizileme teknolojileri pirodizileme teknolojisini kullanan 454 makinesi ile başlamış ve daha sonrasında Illumina tarafından satın alınan Solexa ile devam etmiştir. Solexa'da 454 teknolojisi gibi sentez yoluyla dizileme teknolojisi prensibine dayanmaktadır.

Katı yüzeye bağlanmış olan DNA iplikçiklerinin sentezi sırasında ortamda bulunan florasan işaretli dNTP'ler bir ışımaya gerçekleştirir ve bu ışımalar yüksek çözünürlüklü kameralar ile kayıt altına alınarak dizi belirlenir.

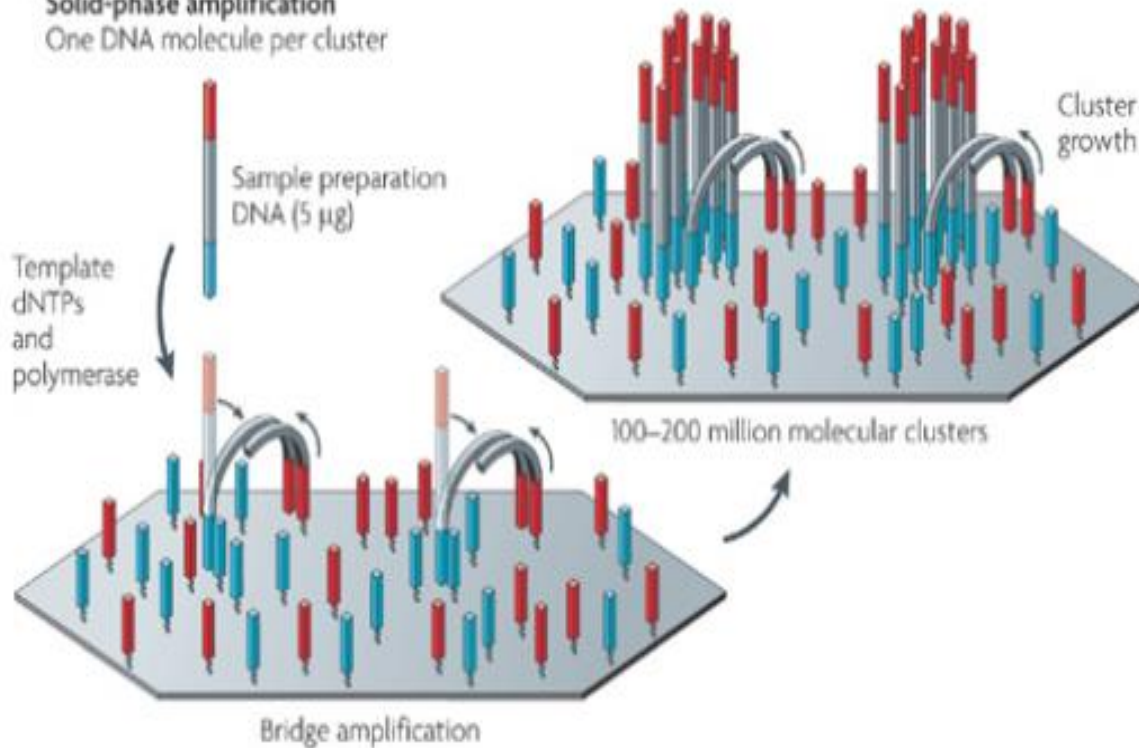
**a Roche/454, Life/APG, Polonator
Emulsion PCR**

One DNA molecule per bead. Clonal amplification to thousands of copies occurs in microreactors in an emulsion

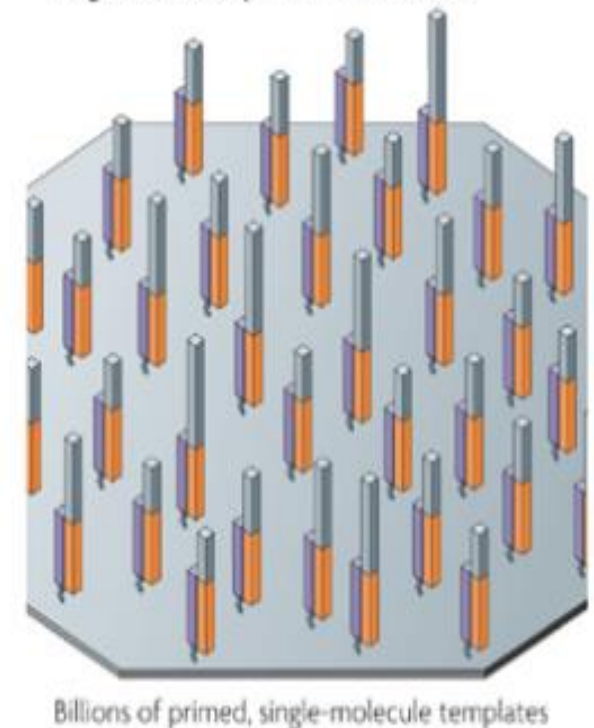


**b Illumina/Solexa
Solid-phase amplification**

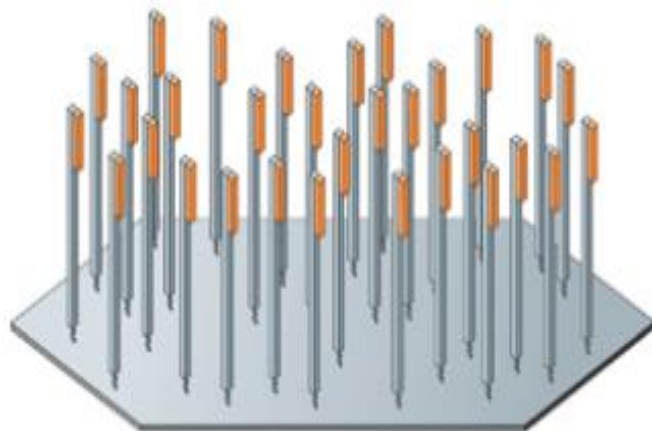
One DNA molecule per cluster



**c Helicos BioSciences: one-pass sequencing
Single molecule: primer immobilized**

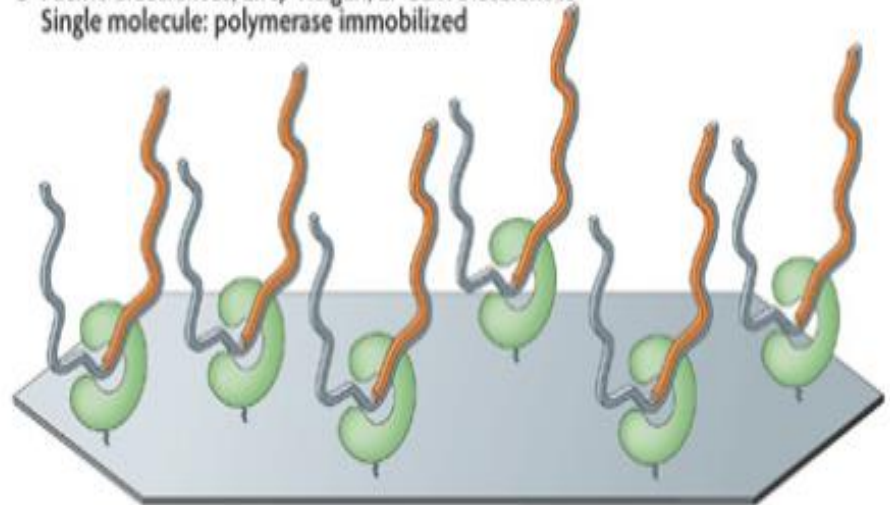


d Helicos BioSciences: two-pass sequencing
Single molecule: template immobilized



Billions of primed, single-molecule templates

e Pacific Biosciences, Life/Visigen, LI-COR Biosciences
Single molecule: polymerase immobilized



Thousands of primed, single-molecule templates

Bu iki dizileme teknolojisinden sonra üçüncü seçenek olarak Applied Biosystem tarafından **SOLiD** adı verilen bir teknoloji geliştirildi. Bu teknoloji sentez yoluyla dizileme değil ligasyon yoluyla dizileme prensibine dayanmaktadır.

DNA polimeraz yerine DNA ligaz enzimi kullanılır ve floresan işaretli oligonükleotidlerin ligasyonuna bakılır. Ligasyon sonrasında ise problemlerin işaretli olan ucu kesilerek döngü devam ettirilir.

Ion Torrent teknolojisi, floresan ya da lüminesans kullanmaması nedeniyle diğer yöntemlerden ayrılmaktadır. Bu teknoloji DNA sentezi sırasında hidrojen iyonlarının serbest bırakılmasından kaynaklanan pH'daki değişimi hesaplayarak dizileme yapmaktadır.

c. Üçüncü Nesil Dizileme

Tek molekül dizileme ve gerçek zamanlı dizileme üçüncü nesil dizileme sistemlerini daha önceki nesillerden ayıran farklardandır. Üçüncü nesil dizileme ayrıca daha önceki teknolojilerden farklı olarak DNA amplifikasyonuna ihtiyaç duymamaktadır.

Üçüncü nesil dizileme teknolojilerinden biri olan tek molekül dizileme tekniği ilk olarak Helicos BioSciences tarafından geliştirilmiştir. Bu teknolojinin Illumina teknolojisinden tek farkı köprü amplifikasyonuna ihtiyaç duymaksızın tek molekül üzerinden dizileme yapabilmesidir.

Bunun dışında Illumina teknolojisine benzer bir şekilde floresan işaretli dNTP'lerin, DNA polimeraz aktivitesi sırasında eklenmesi sonucunda ortaya çıkan ışımaya miktarına göre dizileme yapılmaktadır.

Üçüncü nesil dizileme teknolojilerinden birisi de **Pacific Biosciences'in PacBio** makinelerinde bulunan gerçek zamanlı tek molekül dizileme (Single Molecule Real Time) teknolojisidir.

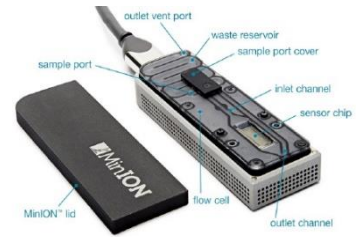
Gerçek zamanlı tek molekül dizileme teknolojisinde **Zero-mode waveguide (ZMW)** adı verilen nano yapıdaki boşluklar içerisinde DNA polimerazın aktivitesi gerçek zamanlı olarak izlenmektedir. Bu teknoloji ile dizileme işlemi DNA polimeraz hızı ile paralel olduğu için çok hızlı bir şekilde gerçekleştirilmektedir.

Nanopor teknolojisi, membran üzerine sabitlenmiş olan nano boyuttaki porlar içerisinde moleküllerin geçişi sırasında iyonik akımın ölçülmesi prensibine dayanmaktadır.

Değişen iyonik akımın ölçülmesi ile birlikte pordan geçen molekülün tanımlanması yapılabilmektedir. Pordan geçiş sırasında geçiş yapan molekül iyonik akımın azalmasına neden olmaktadır.

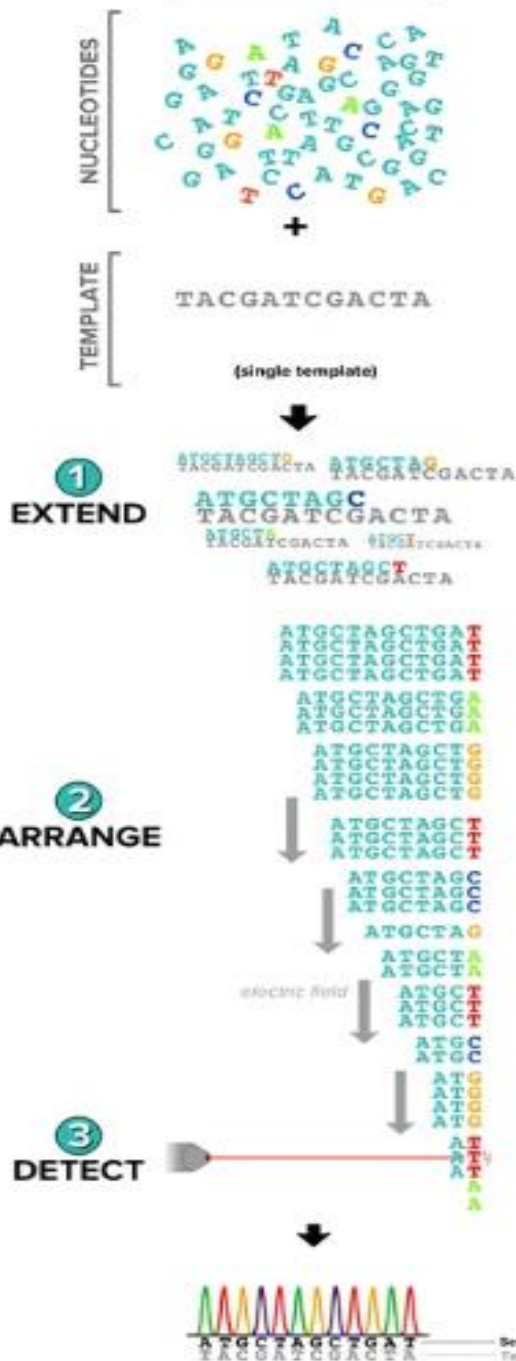
Her molekülün iyon akımı üzerindeki etkisinin farklı olması nedeniyle tanımlama yapılabilmektedir. Uygun boyutta porlar kullanıldığında her bir nükleotid iyonik akım üzerinde farklı değişimlere neden olduğu için değişim ölçülerek dizileme yapılabilmektedir.

Oxford Nanopore şirketi **MinION**, **PromethION** ve **SmidgION** platformalarında bu teknolojiyi kullanmaktadır.

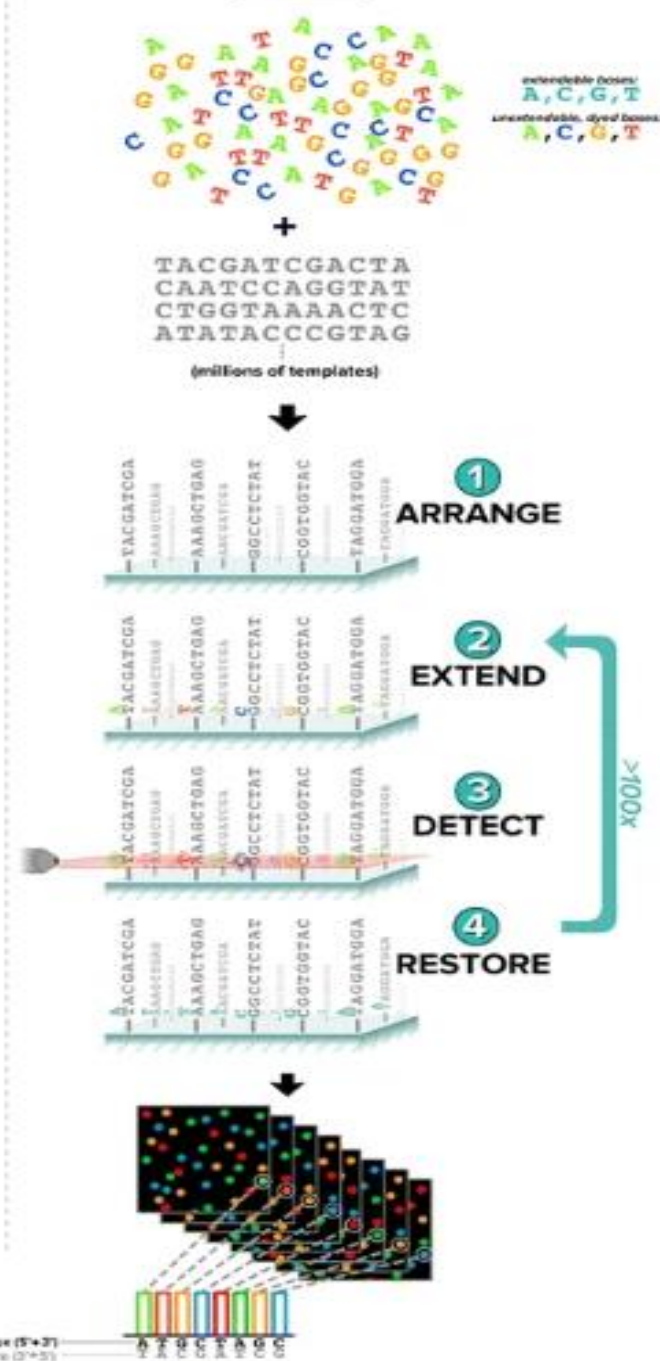


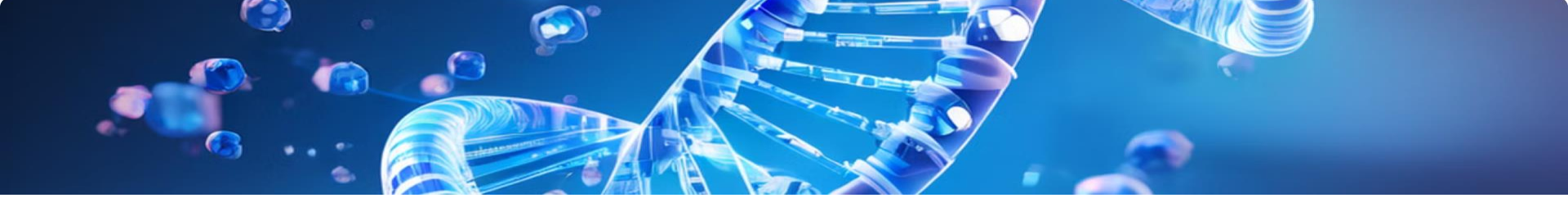
- DNA replikasyonunu hem Sanger hem de NGS'nin merkezindeki DNA dizileme stratejisine dönüştüren temel yenilik, uzatılamayan, floresanla etiketlenmiş modifiye edilmiş bazların kullanılmasıdır.
- A, T, G ve C için dört farklı renkte modifiye edilmiş baz vardır. Sanger dizilemesinde, bazların yalnızca küçük bir yüzdesi modifiye edilirken, NGS'de, mevcut tüm bazlar modifiye edilir.
- Her iki dizileme tekniğinde de, polimeraz kopyalanan ipliğe modifiye edilmiş bir baz dahil ettiğinde, yeni ipin uzaması durur; bu yeni sonlandırılmış ip, en son eklenen bazını yansıtacak şekilde renklendirilir.

SANGER:



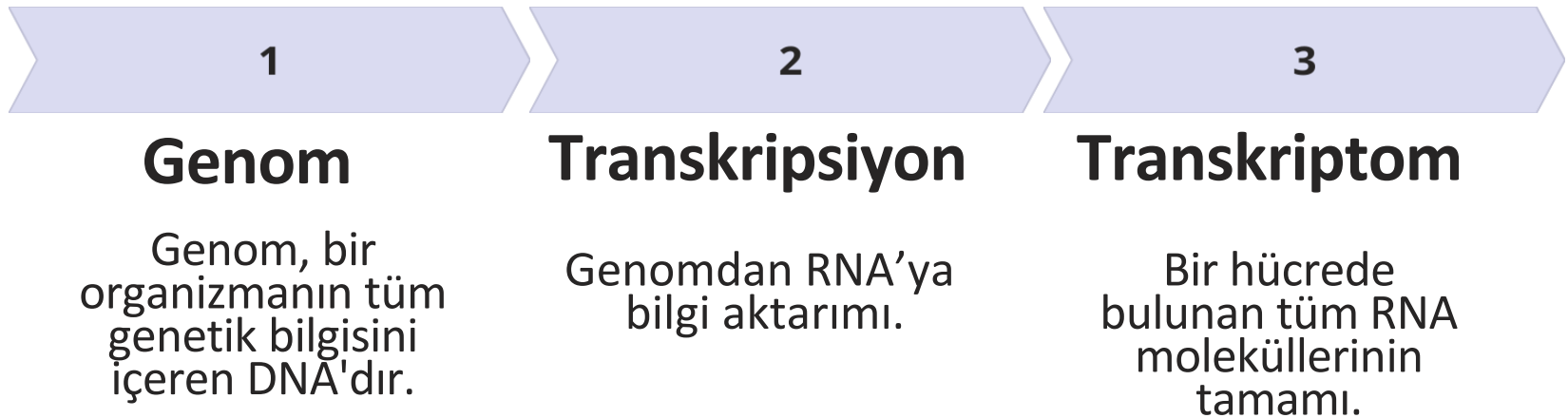
NGS:





Transkriptom ve Genom

Genom, bir organizmanın tüm genetik bilgisini içeren DNA'dır. Transkriptom, bir hücrede belirli bir zamanda aktif olan genlerin bir anlık görüntüsünü sunar.



TRANSKİPTOM

- Transkriptom dizileme, mRNA transkripsiyon-ekspresyon analizi, yeni genlerin keşfi, henüz genomu tamamıyla tanımlanmamış organizmalarda gen bölgelerinin tanımlanması, tüm gen dizisinin oluşturulması, tek nükleotid polimorfizmlerin belirlenmesi, insersiyon-delesyonlar ve splicing varyantların tespiti, allel spesifik ekspresyonlarının analizi ve kromozomal yeni düzenlenmelerin belirlenmesini kapsar.



Transkriptom'un Önemi

Transkriptom, hücresel süreçleri, hücre büyümesi, gelişme ve hastalık gibi çeşitli biyolojik olayları anlamak için kritik önem taşır. Gen ifadesindeki değişiklikler hastalıkların gelişimine yol açabilir.

1 Hücresel İşlevlerin Anlaşılması

Transkriptom, hücrelerin nasıl çalıştığını, nasıl etkileşime girdiğini ve çevrelerine nasıl tepki verdiğini anlamak için temel bilgiler sağlar.

2 Hastalıkların Teşhisi

Transkriptom analizi, hastalıkları teşhis etmek, prognozunu belirlemek ve kişiselleştirilmiş tedavi seçenekleri geliştirmek için kullanılabilir.

3 İlaç Geliştirme

Yeni ilaç hedefleri belirlemek ve ilaç etkinliğini değerlendirmek için transkriptom çalışmaları büyük önem taşımaktadır.

4 Biyoteknoloji Uygulamaları

Transkriptom analizi, tarımda, gıda üretiminde ve biyomalzeme geliştirmede önemli uygulamalara sahiptir.

Transkriptom Analizi Yöntemleri

Transkriptom analiz yöntemleri, RNA dizileme, mikrodizi ve kuantifiye edilmiş PCR gibi çeşitli teknikleri içerir. Bu yöntemler, RNA moleküllerinin miktarını ve türünü belirlemek için kullanılır.

RNA Dizileme

RNA'nın tam dizilimini belirlemek için kullanılan yüksek verimli bir tekniktir. Bu yöntem, transkriptomda bulunan tüm RNA moleküllerini analiz etmemizi sağlar.

Mikrodizi

Binlerce farklı genin ifade seviyelerini aynı anda ölçmek için kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem, farklı koşullar altında gen ifadesindeki değişiklikleri araştırmak için uygundur.

Kuantifiye Edilmiş PCR

Belirli genlerin ifade seviyelerini ölçmek için kullanılan hassas bir tekniktir. Bu yöntem, hastalıklar, çevresel faktörler veya ilaçların etkisi gibi çeşitli faktörlerin gen ifadesi üzerindeki etkisini araştırmak için uygundur.

Transkriptom Veri Analizi

Transkriptom verilerinin analizi, gen ifadesindeki değişikliklerin tanımlanması, farklı koşullar altında genlerin düzenlenmesinin anlaşılması ve biyolojik yolların incelenmesi gibi çeşitli amaçlar için kullanılır.

- 1 — Veri Ön İşleme**
Veri temizleme, normalleştirme ve kalite kontrolü gibi adımları içerir. Bu adım, doğru ve güvenilir sonuçlar elde etmek için önemlidir.
- 2 — Diferansiyel Gen İfadesi Analizi**
Farklı koşullar altında ifade seviyeleri önemli ölçüde değişen genleri belirlemek için kullanılır.
- 3 — Yol Analizi**
Gen ifadesindeki deęişikliklerin ilgili biyolojik yollar üzerindeki etkisini inceler.
- 4 — Fonksiyonel Zenginleştirme Analizi**
Gen setlerindeki genlerin biyolojik fonksiyonlarını ve ilgili yolları inceler.



Transkriptom Uygulamaları

Transkriptom araştırmaları, tıp, biyoloji, tarım ve çevre bilimleri gibi çeşitli alanlarda geniş bir uygulama yelpazesi sunar.

Hastalık Tanısı

Transkriptom analizleri, çeşitli hastalıkları teşhis etmek ve hastalık prognozunu belirlemek için kullanılır. Örneğin, kanser türlerini sınıflandırmak ve tedaviye verilen cevabı tahmin etmek için kullanılabilir.

İlaç Geliştirme

Yeni ilaç hedefleri belirlemek, ilaç etkinliğini değerlendirmek ve yan etkilerini azaltmak için transkriptom çalışmaları büyük önem taşımaktadır.

Kişiselleştirilmiş Tıp

Transkriptom analizleri, hastalar için kişiselleştirilmiş tedavi seçenekleri geliştirmek için kullanılabilir.

Çevresel Monitöring

Çevresel kirleticilerin canlı organizmalar üzerindeki etkilerini değerlendirmek ve çevresel değişikliklere yanıt olarak gen ifadesindeki değişiklikleri anlamak için kullanılır.



Transkriptom Veri Depolama ve Paylaşımı

Transkriptom verileri, büyük miktarlarda veri ürettiği için özel depolama ve paylaşım sistemleri gerektirir. Veri paylaşımı, transkriptom araştırmalarının hızlandırılması ve çabaların birleştirilmesi için çok önemlidir.

Depolama Sistemleri

Gene Expression Omnibus (GEO), ArrayExpress, Sequence Read Archive (SRA)

Paylaşım Platformları

NCBI Gene Expression Omnibus (GEO), European Bioinformatics Institute (EBI) ArrayExpress, International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC)

Transkriptom ve Epigenetik

Epigenetik, DNA dizisinde değişiklik olmadan gen ifadesinde meydana gelen kalıtsal değişiklikleri inceler. Transkriptom, epigenetik mekanizmaların gen ifadesi üzerindeki etkisini anlamak için önemli bilgiler sağlar.

DNA Metilasyonu

DNA'daki belirli bazlara metil gruplarının eklenmesi. Bu değişiklik, gen ifadesini inhibe edebilir.

Histon Modifikasyonları

Histon proteinlerindeki değişiklikler, DNA'nın erişilebilirliğini etkileyerek gen ifadesini düzenler.

MikroRNA'lar

Gen ifadesini düzenleyen küçük RNA molekülleri. MikroRNA'lar, mRNA'lara bağlanarak bunların bozulmasına neden olabilir.



Transkriptom ve Hastalık Biyobelirteçleri

Transkriptom analizleri, hastalık biyobelirteçlerini belirlemek için kullanılabilir. Biyobelirteçler, bir hastalığın varlığını veya evresini gösteren biyolojik belirteçlerdir.

1 **Kanser Biyobelirteçleri**

Transkriptom analizleri, kanser hücrelerinde ifade seviyeleri artmış olan genleri belirlemek için kullanılır. Bu genler, kanser teşhisi ve prognozu için biyobelirteçler olarak kullanılabilir.

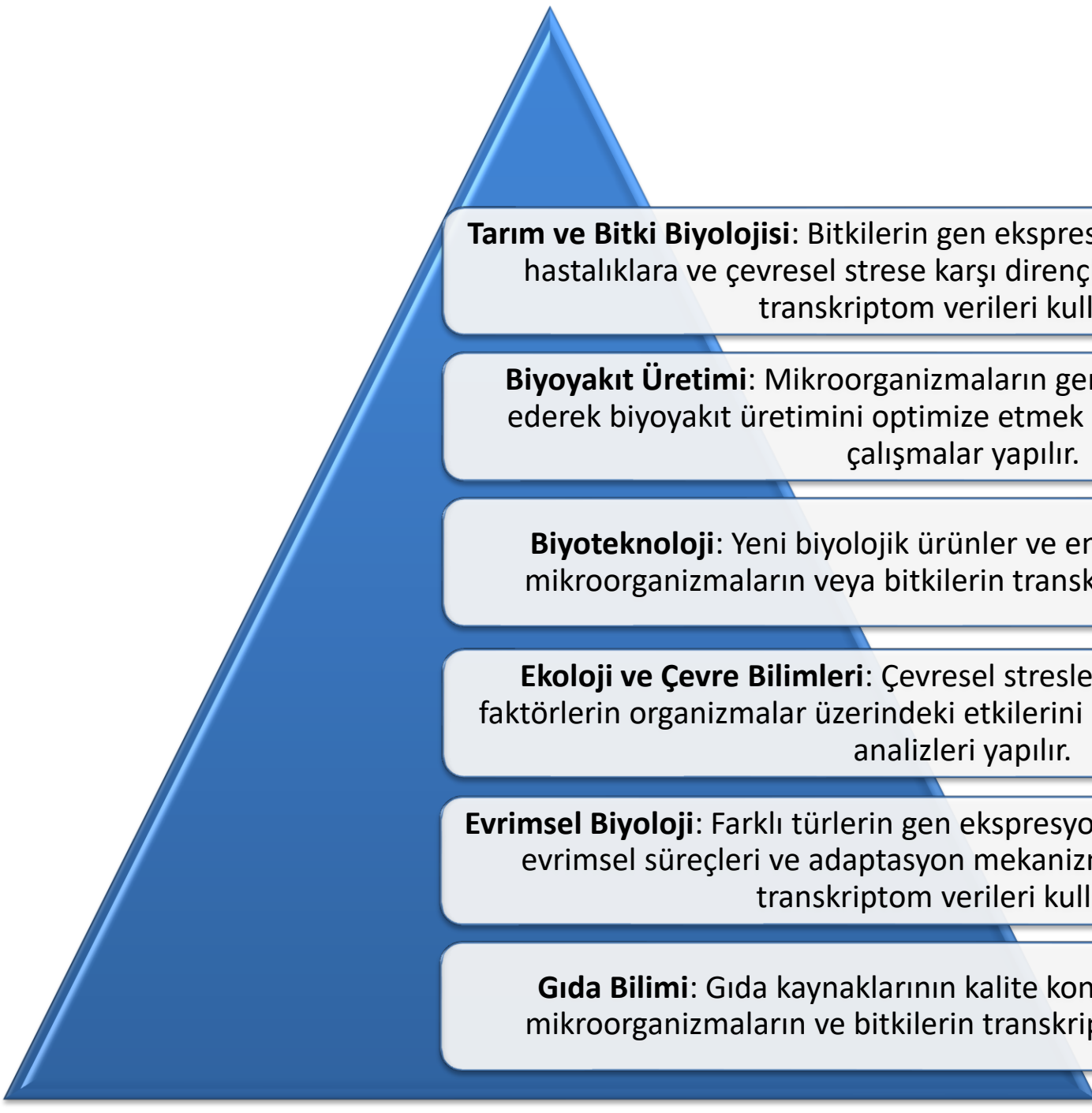
2 **Enfeksiyon Hastalıkları Biyobelirteçleri**

Transkriptom analizleri, enfeksiyon sırasında ifade seviyeleri değişen genleri belirlemek için kullanılabilir. Bu genler, enfeksiyonun teşhisi ve tedavisi için biyobelirteçler olarak kullanılabilir.

3 **Kalp Hastalıkları Biyobelirteçleri**

Transkriptom analizleri, kalp hastalığı riskinin veya ilerlemesinin göstergesi olabilecek genleri belirlemek için kullanılır.





Tarım ve Bitki Biyolojisi: Bitkilerin gen ekspresyon profillerini inceleyerek hastalıklara ve çevresel strese karşı dirençli türler geliştirmek için transkriptom verileri kullanılır.

Biyoyakıt Üretimi: Mikroorganizmaların gen ekspresyonlarını analiz ederek biyoyakıt üretimini optimize etmek amacıyla transkriptomik çalışmalar yapılır.

Biyoteknoloji: Yeni biyolojik ürünler ve enzimler geliştirmek için mikroorganizmaların veya bitkilerin transkriptomları analiz edilir.

Ekoloji ve Çevre Bilimleri: Çevresel streslerin, kirliliklerin ve diğer faktörlerin organizmalar üzerindeki etkilerini anlamak için transkriptom analizleri yapılır.

Evrimsel Biyoloji: Farklı türlerin gen ekspresyon profillerini karşılaştırarak evrimsel süreçleri ve adaptasyon mekanizmalarını incelemek için transkriptom verileri kullanılır.

Gıda Bilimi: Gıda kaynaklarının kalite kontrolü ve güvenliği için mikroorganizmaların ve bitkilerin transkriptomları analiz edilebilir.

Sonuç olarak...

Transkriptomlar, kişiselleştirilmiş tıp için güçlü bir araçtır ve hastalıkları teşhis, tedavi ve önlemede devrim yaratma potansiyeline sahiptir. Transkriptomların kullanımıyla ilgili bazı zorluklar olsa da, bu teknolojideki gelişmeler, daha etkili ve kişiselleştirilmiş bir tıp geleceğine yol açabilir.

