



YAKIN DOĞU
ÜNİVERSİTESİ



YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
DENEYSEL SAĞLIK BİLİMLERİ ARAŞTIRMA MERKEZİ
DESAM



GENOMİK ANALİZLER

Mahmut Çerkez Ergören, PhD

Uygulamalı Hücre Kültürü Kursu

3-4 Haziran 2016

Lefkoşa, KKTC

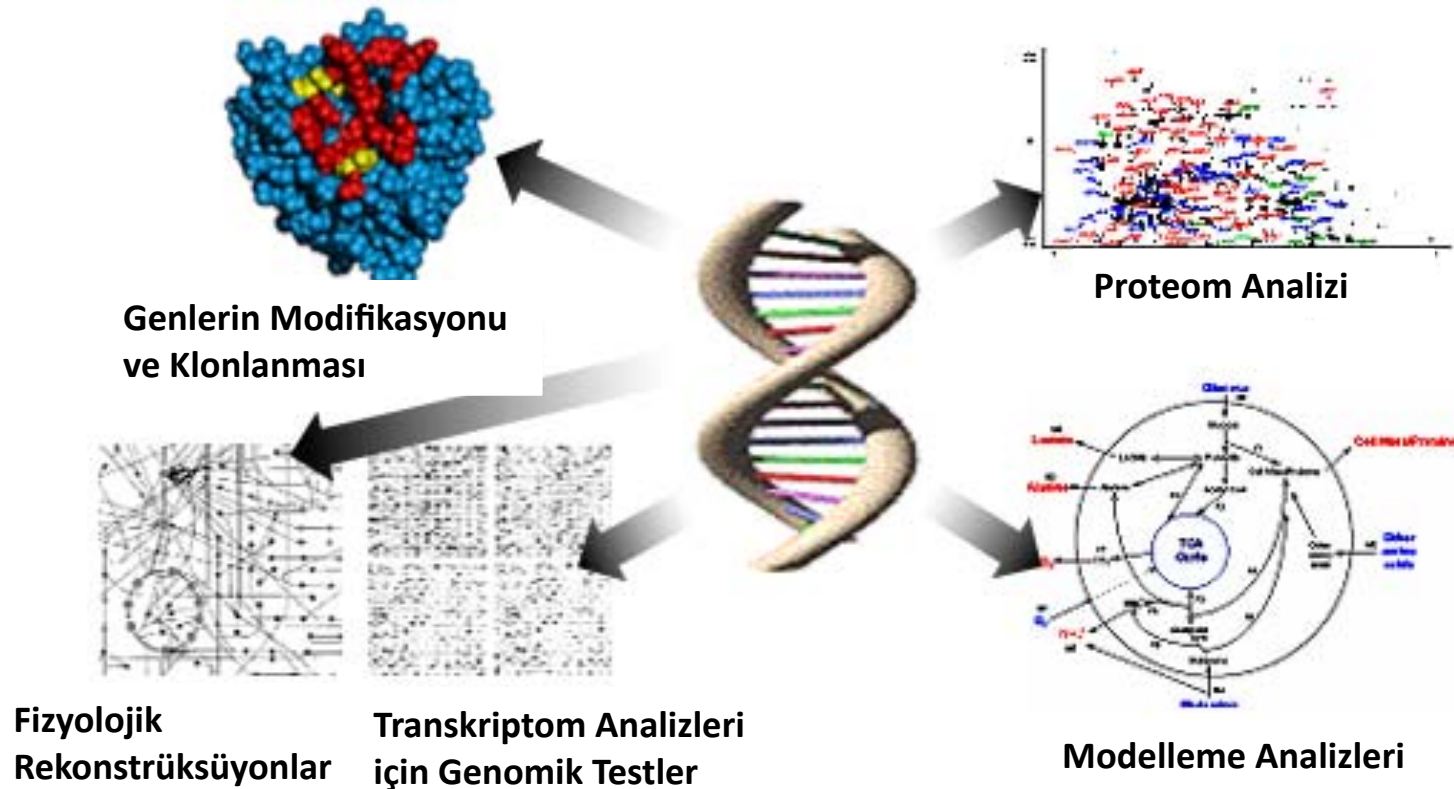
Genomik/ Proteomik Analizler

-omiks (*ing. -omics*): Biyolojide çalışılan alanı refere eder, örneğin; genomiks, proteomiks.

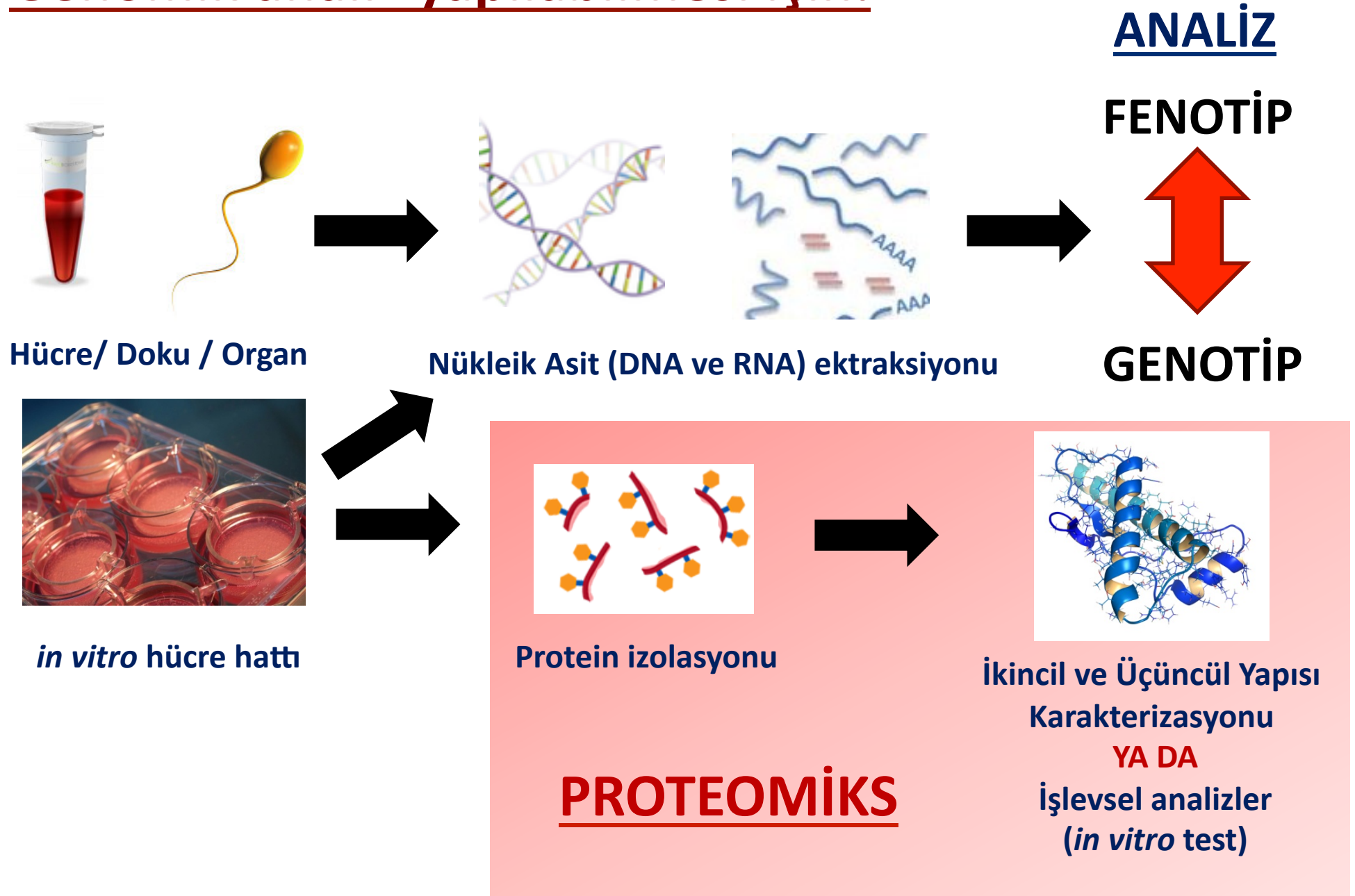
-om (*ing. -ome*): Çalışma alanların hedeflerini gösterir, örneğin; genom, proteom.

Genomiks: Organizma genomlarının çalışılması.

Proteomiks: Protein yapı ve işlevlerinin geniş ölçekte çalışılması.



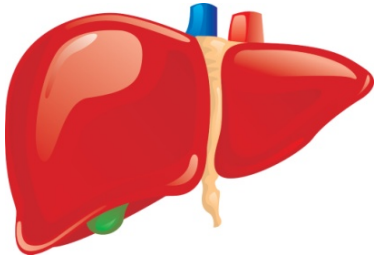
Genomik analiz yapılabilmesi için:



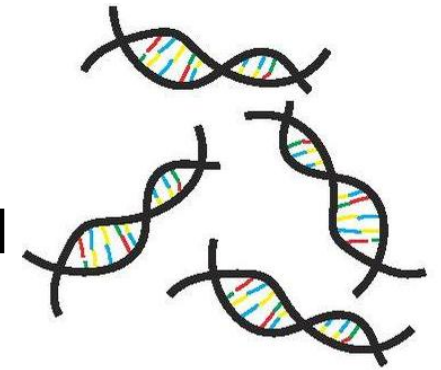
Hücre genom dizi analizinde iş akışı:



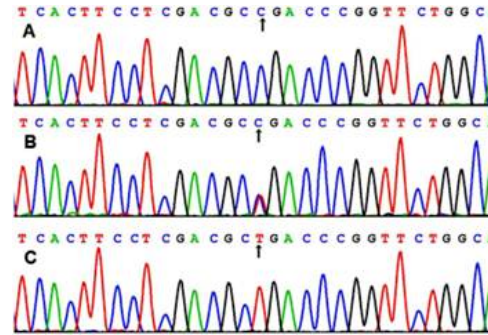
in vitro hücre hattı



Doku / Organ



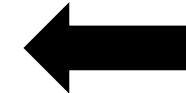
DNA ekstraksiyonu



Genotipleme : Dizi analizi

SNP/ CNV
Hücre tipi kimliklendirmesi
Genom modifikasyonu

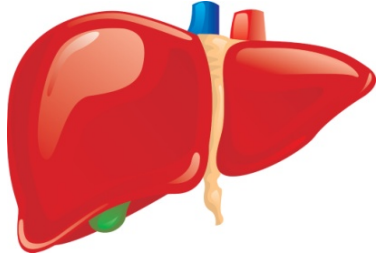
ANALİZ



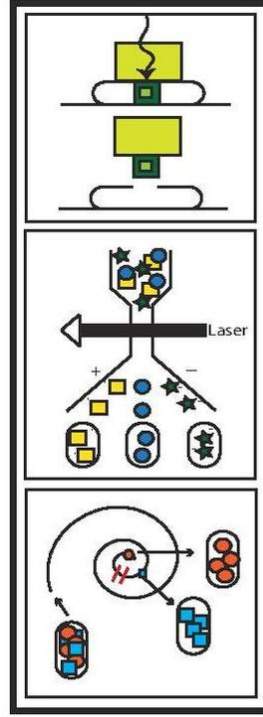
TEK hücre genom dizi analizinde iş akışı:



in vitro hücre hattı



Doku / Organ



Lazer Yakalama
Mikrodisseksiyon
(LCM)

veya

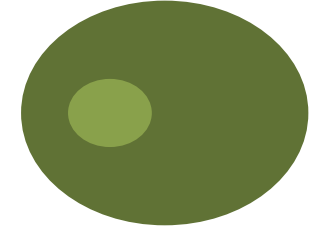
Flow sitometri

veya

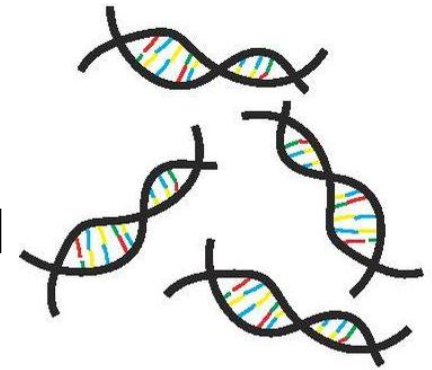
Floresan Aktive
Hücre Ayırma
(FACS)

veya

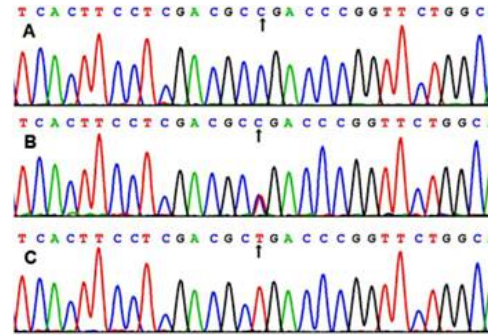
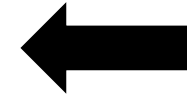
Mikrofluidler



Tek hücre izolasyonu



DNA ekstraksiyonu



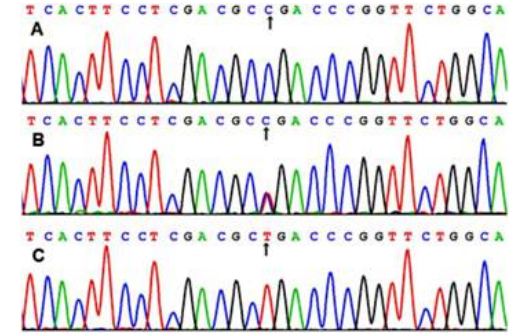
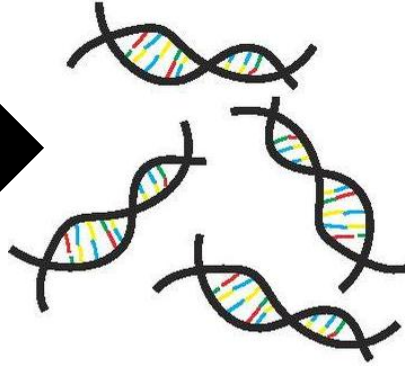
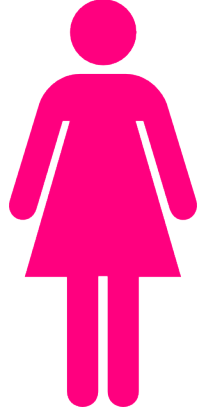
Genotipleme : Dizi analizi



SNP/ CNV
Hücre tipi kimliklendirmesi
Genom modifikasyonu

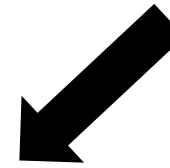
ANALİZ

Tüm genom haplotip analizler

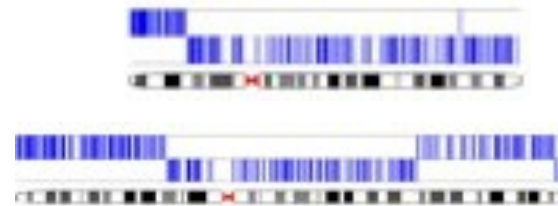


DNA ekstraksiyonu

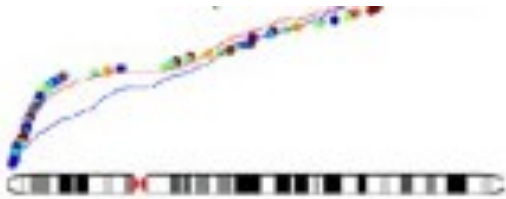
Genotipleme : Dizi analizi



Büyük ölçekli Germ-line
de novo mutasyon
tayini



"Mayotik yönlendirme"



Gen haritalama / SNP kimliklendirme /
Popülasyon çalışmaları



Ayda 1
yumurta



Her bir
ejakulatta 10^6
sperm

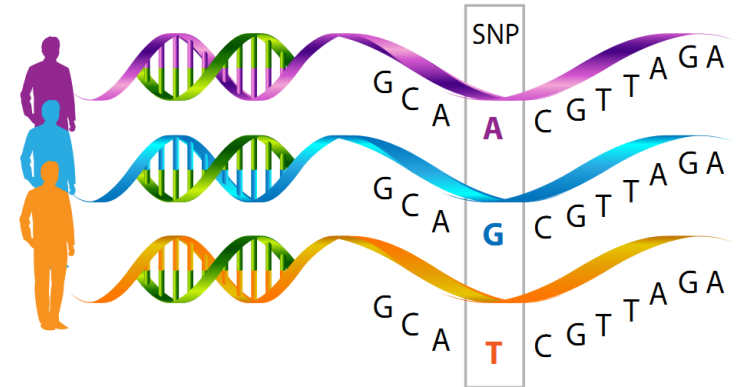
Genotipleme

- Moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak bireyin DNA dizisinin incelenmesi, başka bireylerle ya da referans DNA dizisi ile karşılaştırarak, bireyin genotip farklılıklarını belirleme işlemidir.
- Bireylerin ebeveynlerinden kalıtılan **alelleri** gösterir.

Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nükleotid Polimorfizm – SNP)

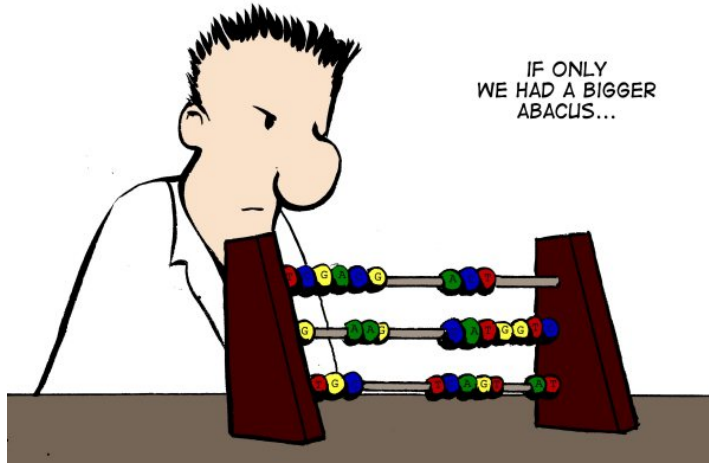
Aynı türün genomları arasındaki varyasyon çeşitlilikleridir.

1. İnsan genomlarındaki genom değişiklikleri kişilere göre değişmelerine rağmen etkileri yoktur.
2. Diğer değişiklikler fenotipi, vücut yapısını belirleyen normal değerleri, metabolizmayı, pigmentasyonu vb etkileyebilir ve her kişiyi özel yapar.
3. Bazı varyantlar **patojeniktir**.

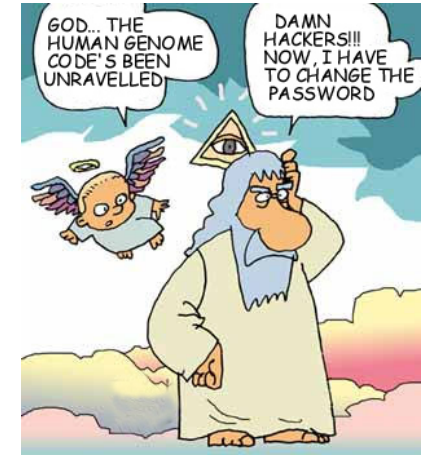
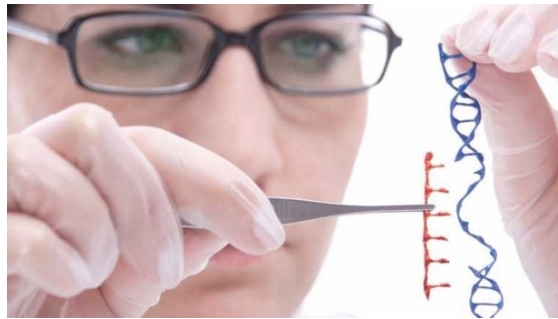


6 milyondan fazla SNP kimliklendirildi.

**Her 500 bazda 0.5-10 kez gözlenebilirler.
~60,000 genlerin içinde**



3 milyar nükleotid
300 bin gen



İnsan Genom Projesi – 1990/2004

“The Language of God” Francis Collins

~33 bin gen

~ Genomda SNP’ler var



Uluslararası İnsan Haplotip Harita Projesi (HapMap) – 2005/-

11 farklı popülasyon

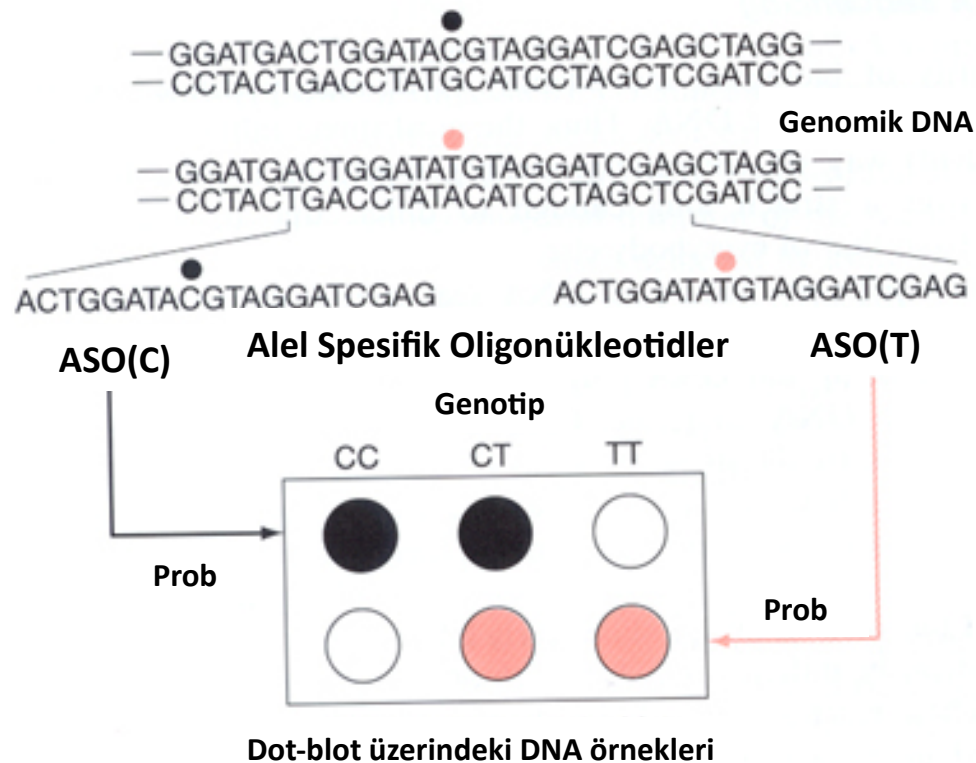
~21 bin gen

~ Her 50/100 bç 1 SNP

Genotiplemede Kullanılan Teknikler:

1. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)
2. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik Tanımlama (RAPD)
3. Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi Tanımlama (AFLPD)
4. **Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) / Gerçek Zamanlı – PCR (RT-PCR)**
5. **Alel-Spesifik Oligonükleotid Prob – Hibridizasyon**
6. **DNA dizi analizi**
7. **DNA mikroarray / SNP array**

Alel-Spesifik Oligonükleotid Prob – Hibridizasyon



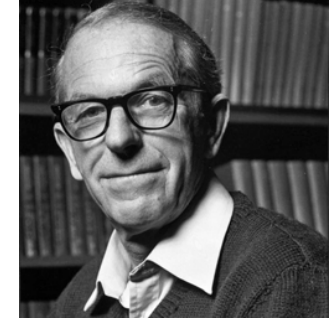
✓ Bilinen SNPlar.

✓ Ucuz.

✓ Radyasyon ya da floresan boya.

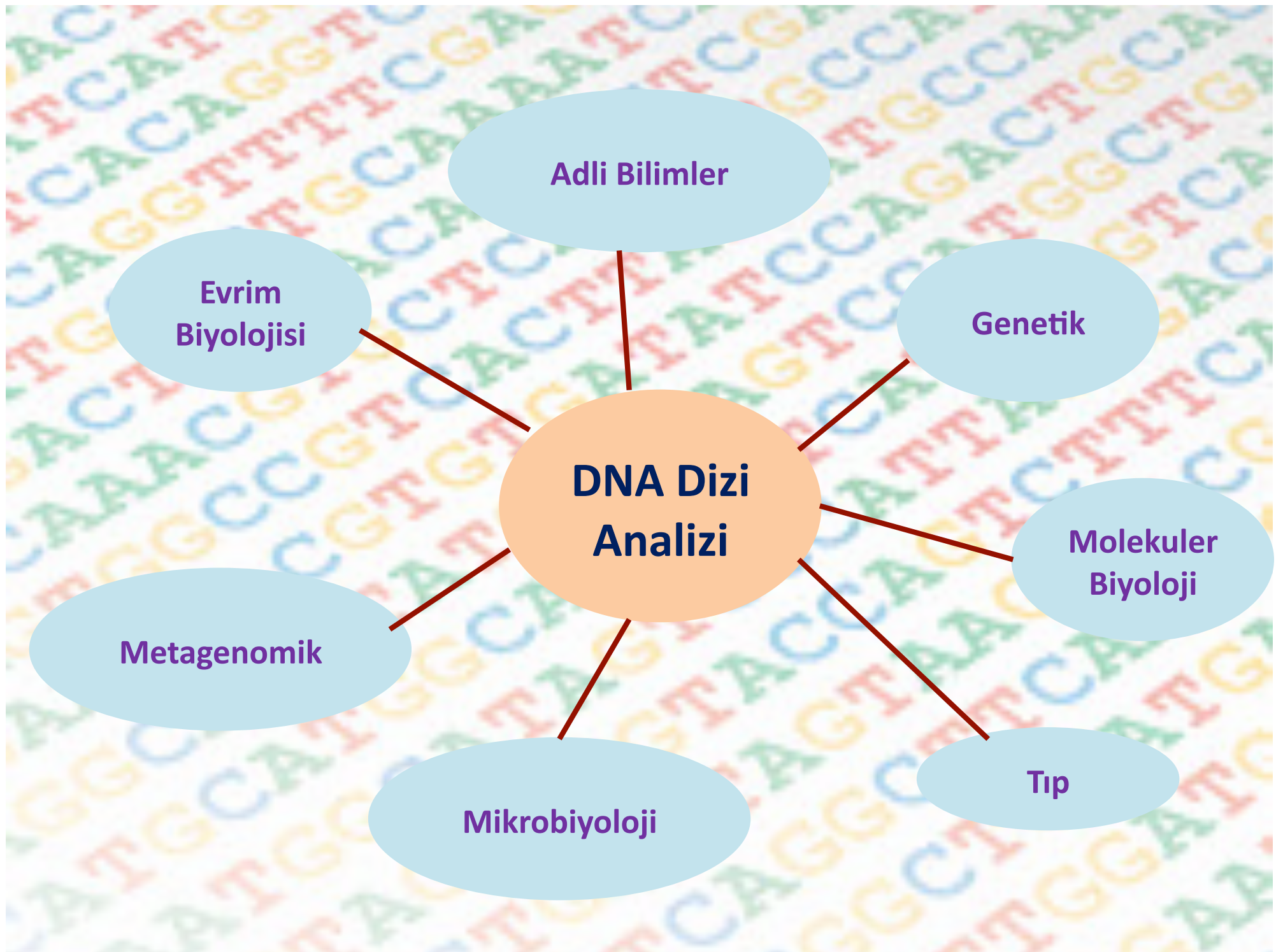
Dizi Analizi

- Verilen DNA fragmentinin nükleotid (adenin, guanin, sitozin, timin) sıralamasını belirleme işlemidir.



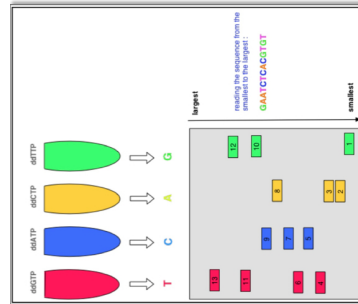
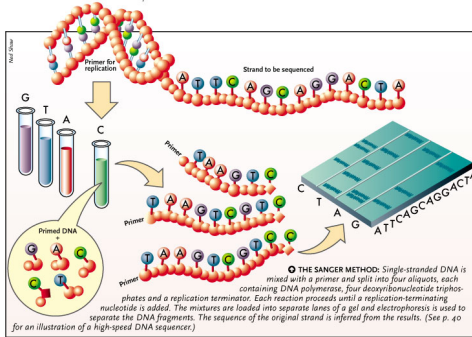
DNA dizi analizi neden önemlidir?

- ✓ Dizinin sıralanışını belirler, böylece organizmanın neden ve nasıl yaşadığı hakkında bilgi verir.
- ✓ Bireylerin genleri, genetik bölgeleri (genler ya da operonlar), bir kromozomu ya da tüm genomu dizi analizleri ile belirlenebilir.
- ✓ Hayvanlar, bitkiler, bakteri vb gibi genetik bilgi taşıyan her kaynaktan elde edilen DNA veya RNA moleküllerinden nükleotid dizi analizi yapılabilir.

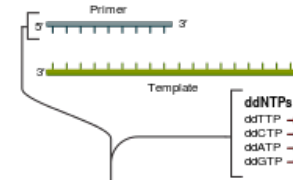


Dizi Analizi Yöntemleri

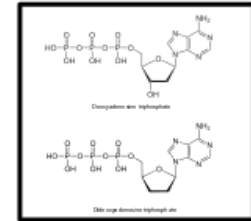
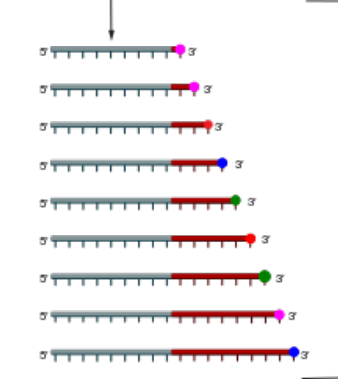
1. Sanger Dizi Analizi (Dideoksi DNA dizi analizi veya zincir sonlandırma)



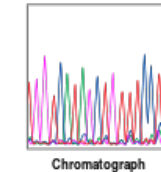
- ① Reaction mixture
- Primer and DNA template
 - DNA polymerase
 - ddNTPs with flouorchromes
 - dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP)



- ② Primer elongation and chain termination



- ③ Capillary gel electrophoresis separation of DNA fragments

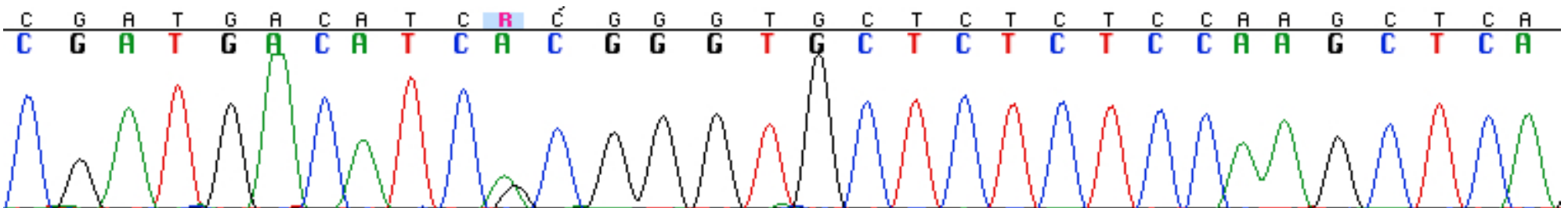


- ④ Laser detection of flouorchromes and computational sequence analysis

in vitro DNA replikasyonu esnasında DNA polimeraz tarafından zincir sonlandıran dideoksinükleotitleri rastgele seçerek dizi belirlemesine dayanmaktadır.

Sanger dizi analizi tekniği hala büyük ölçüde kullanılmaktadır.

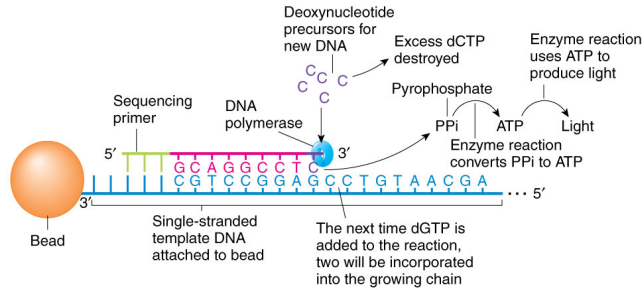
500 bç < diziler için ideal.



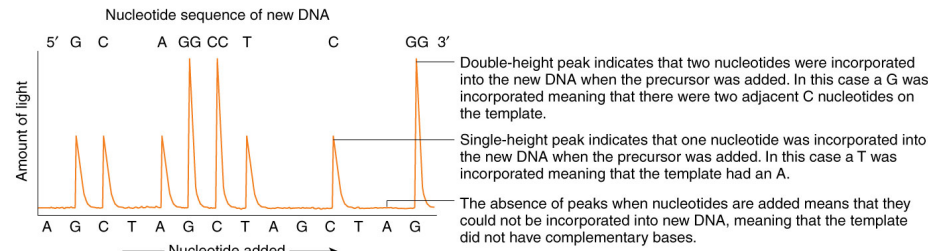
2. Pyrosekanslama

Dideoksi nükleotidleri ile zincir sonlandırma yerine “sentezle dizi analizi” yöntemine dayanır.

a) A pyrosequencing reaction



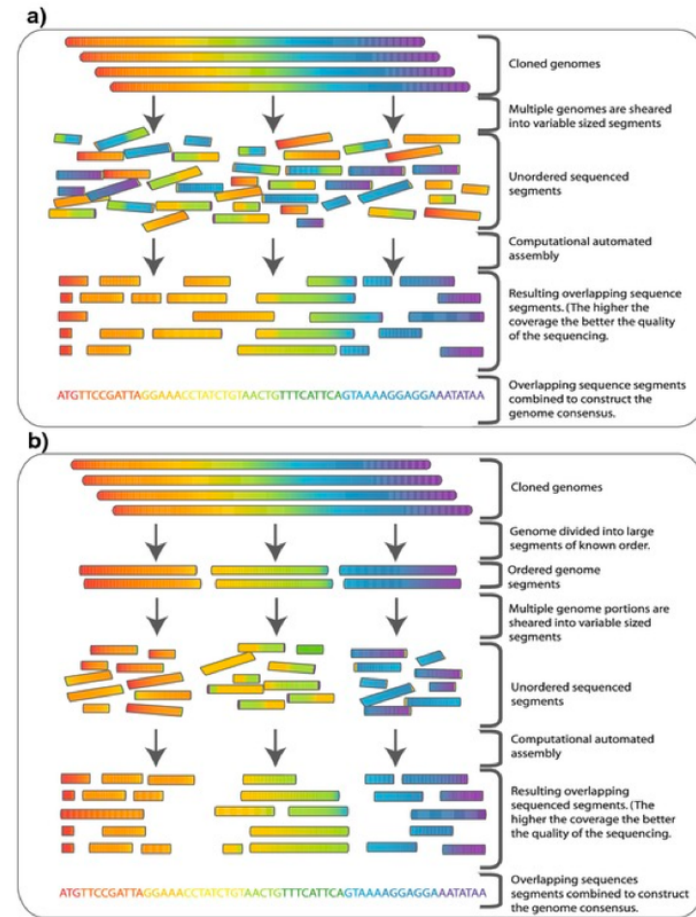
b) Pyrogram result of pyrosequencing



© 2010 Pearson Education, Inc.

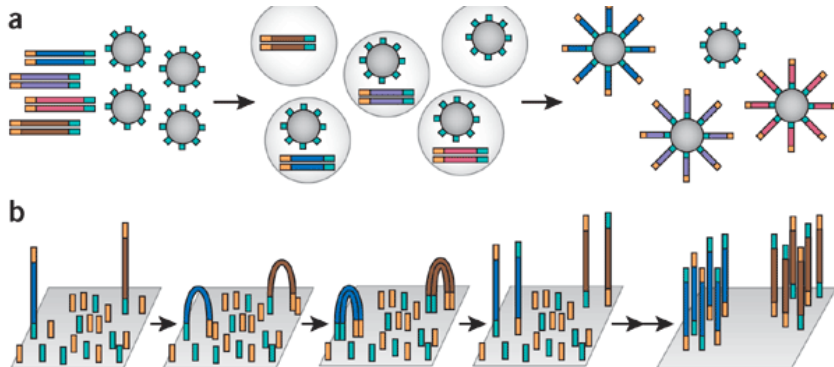
3. Shotgun dizi analizi

1000 bç -tüm kromozom analizi



4. Köprü PCR

Katı bir yüzeye bağlanan primerlerle güçlendirilmiş "DNA kolonileri" ya da "DNA kümelenmeleri" dizi analizi formudur.



5. Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing – NGS)

- **Varyasyon profilendirilmesi**
 - Genetik varyasyon
 - Transkript varyasyon
 - Epigenetik varyasyon
 - Metagenomik varyasyon
- **Keşif**
 - Yeni genomlar
 - Yeni genler
 - Yeni transkriptler
 - Küçük/ uzun non-coding DNA

Yeniden-sekanslama bir bireye ait genom analizi, aynı türün farklı bireylerindeki genetik varyasyonları temsil etmediği için gereklidir.

Bugün

RNA Dizi analizi (RNASeq)

- Kodlayan veya kodlanmayan bölgelerdeki transkript profilendirilmesi

Epigenomik

- Tüm genom protein-DNA etkileşimi
- Gen regülasyonunun kalıtsal ve geri dönüşümlü ifadesi

Yeni Nesil Dizileme Metodları

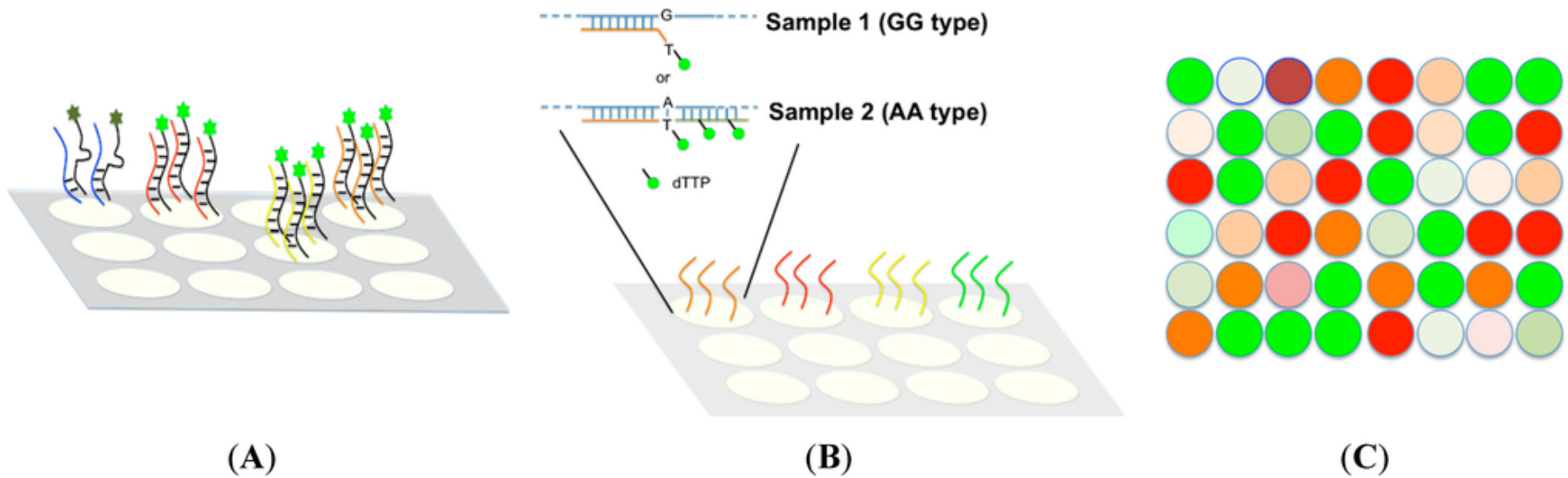
1. Massively parallel signature sequencing (MPSS)
2. Polony sequencing
3. 454 pyrosequencing (bead microreactor)
4. Illumina (Solexa) sequencing
5. SOLiD sequencing (2 base encoding)

Genel Özellikleri

- A. Genomik DNA'nın rastgele fragmentasyonu
- B. Boncuk ya da düzlemsel katı yüzey destekler kullanılarak tek tek DNA fragmentlerinin immobilizasyonunu sağlamalı.
- C. PCR kullanarak DNA fragmentlerinin katı yüzeyde amplifiye etmek ve böylece polimeraz kolonileri oluşturmak.
- D. Dizi analizi ve floresan ya da kemilüninesans kullanarak her döngüden sonra in situ sorgulamak/ kontrol etmek.

DNA mikroarray (DNA-chips, Gene-Chips, SNP-chips)

- ✓ Silikon, cam veya naylon tabaka üzerinde sabit konumlarda bilinen kısa komplementer DNA oligonükleotitleri sırayla yerleştirirler.
- ✓ Oligonükleotidler deneysel olarak belirlenirler ve (1) microspotlama ya da (2) bir çip üzerinde sentezlenirler.
- ✓ Kullanıcı tanımlı SNP çipleri ticari olarak temin edilebilir, ve > 400,000 farklı probu içerebilir.



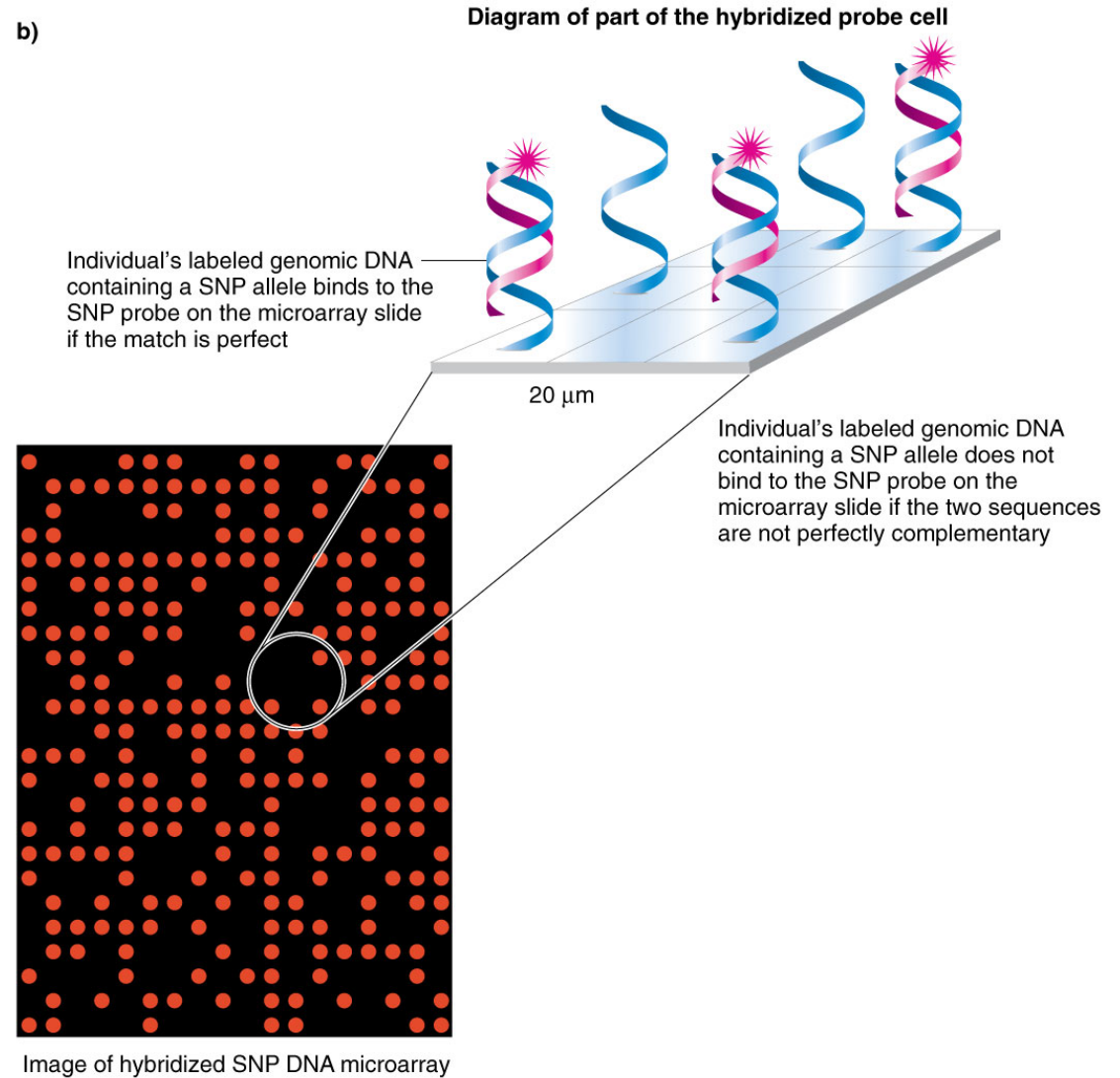
Genlerin **ekspresyon** seviyelerini ölçmek ya da bir genomda birden fazla gen bölgesinde **genotipleme** kullanılır.

Her bir DNA probu (veya oligo) 10-12 pikomol özel DNA dizisini içerir.

cDNA örneği hibridizasyon için kullanılan bir gen ya da başka DNA elemanının kısa parçası olabilir.

Prob-hedefleyerek hibritlemede hedef nükleik asit sekanslarının göreceli olarak belirlemek için -gümüş- veya kemilüminesans etiketleme ile tespit edilir.

b)



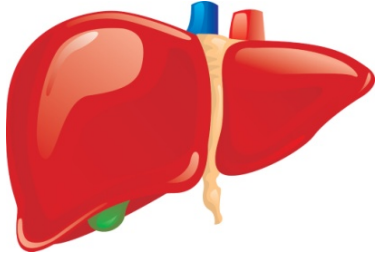
DNA Mikroarray Uygulama Alanları:

- 1) Gen Ekspresyon Profilendirilmesi**
- 2) Komperatif Genom Hibridizasyon (CGH)**
- 3) GeneID**
- 4) Kromatin immünopresipitasyon on Chip**
- 5) DamID**
- 6) SNP deteksiyonu**
- 7) Alternatif Kesim Deteksiyonu**
- 8) Füzyon Gen Array**
- 9) Tiling Array**

RNA dizi analizinde iş akışı:



in vitro hücre hattı



Doku / Organ

RT & İkinci-zincir
sentezi



RNA

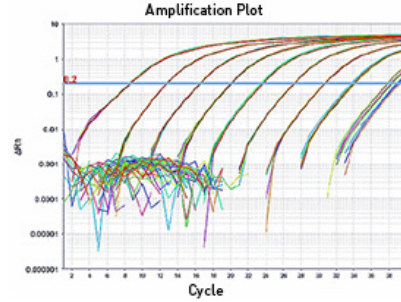


cDNA

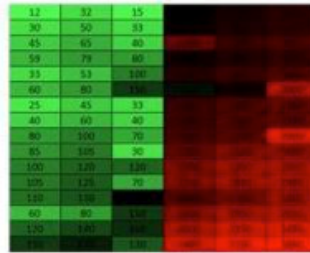
PCR



Çoğalmış cDNA



Real Time Konfirmasyon



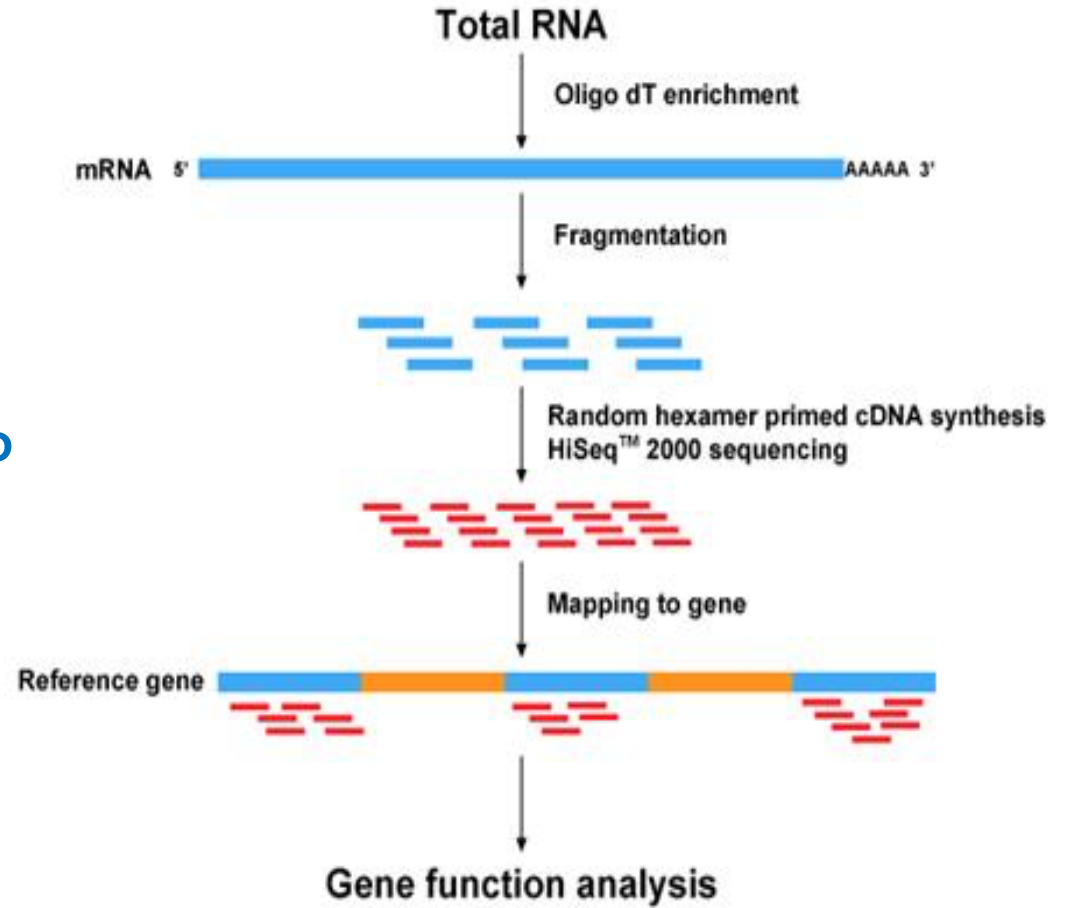
Ekspresyon Profilleri

CAAGTTCCTACAGCTA
AGTCCATGCCCATCCG
AATCGGACTTCAGCCT
GACCTAAGCCATCAGA
AATCCTAGCATCCAGC
ACCGTTACATCAACAC
ATTCGATAACGACCAI
CATGCCATTGACGATI

Dizi Analizi

RNA dizi analizi uygulamaları:

- Gen ekspresyonu
- SNP keşfi
- Post-transkripsiyonel SNP
- Ko-ekspresyon yolları



Hedef Bölge Seçimi

PCR Amplifikasyonu

Dizi Analizi
(Shortgun ya da Yüksek verimlilikli)

Genom Anotasyon

DNA dizi analizi

Protein Tahmini

Yolaklar

Komperatif Analiz

GELECEK ... Genom Düzenleme

Hedeflenen **nükleazların** rekombinasyon vektörleri kullanarak ya da kullanılmayarak uygulanmasına “**genom düzenleme**” denir.

Genom düzenleme araçları, *in vitro* ve *in vivo* olarak **hedeflenen mutasyonların elde edilmesinde, gen yer değiştirmesinde** ve **gen düzeltilmesinde** kullanılabilir.

Nükleaz aktivitesinin sekansı spesifik ve DNA 'ya bağlanabilmesi için, istenilen bölgeye özgü DNA-bağlama proteinleri kullanılabilir (DNA-binding).

Bu proteinler:

(1) Zinc-finger proteinleri (ZFPs)

(2) Transkripsiyon aktivatörü benzer efektör (TALE) (transcription activator-like effector) proteinleri

(3) Kümelenmiş düzenli ara boşluklu kısa palindromik tekrarlar (CRISPR/Cas) (Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats)

FDA onayı alındıktan sonra ...

ZFNs klinik deneylerle test ediliyor.

TALEN ve CRISPR / Cas teknolojileri nispeten yeni ve henüz klinik uygulamalarda test edilmemiştir.

CRISPR / Cas İngiltere'de insan embriyo editing için onaylanmıştır.

Zinc Finger Nükleaz (ZFN)

3+ ZF Modül, her biri 3 bç
Nükleaz füzyonu

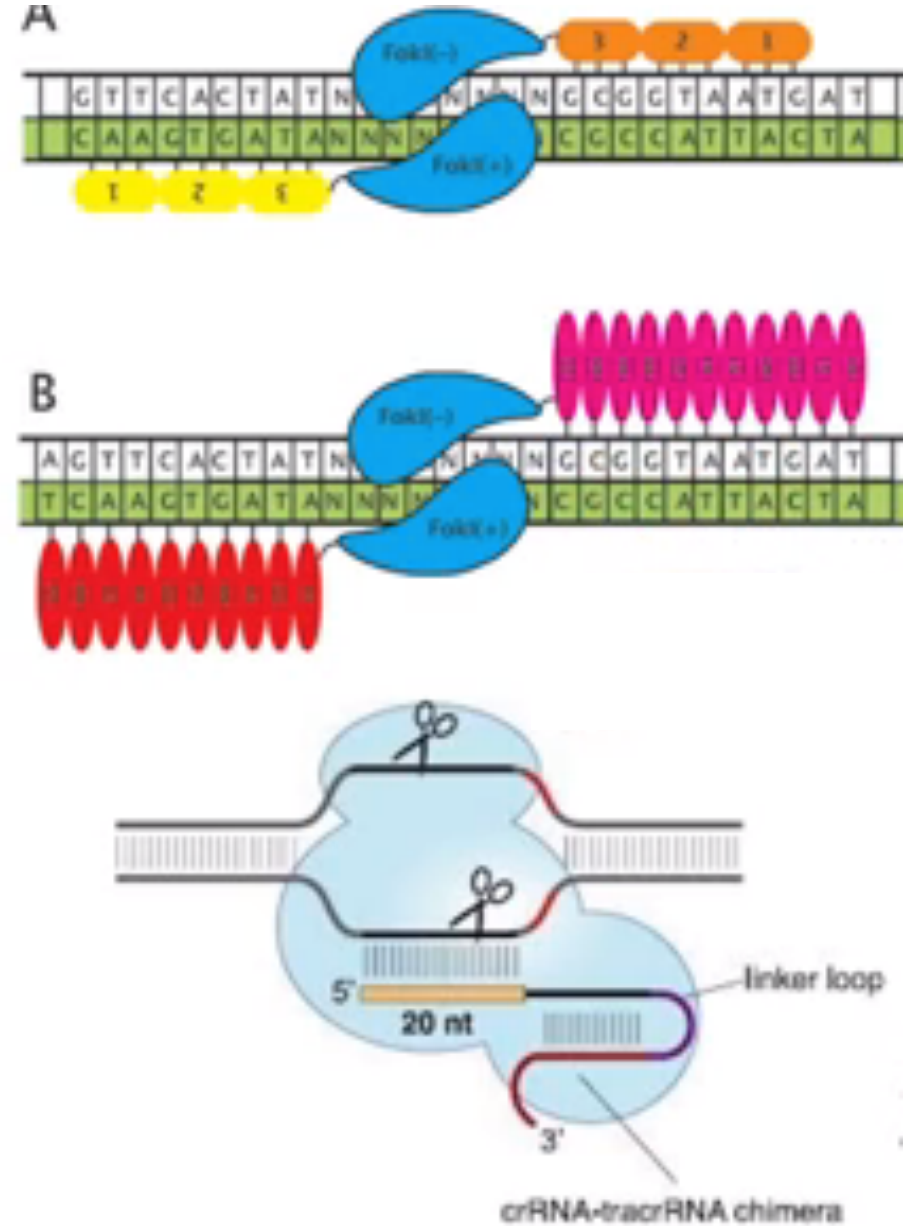
TAL Efektor Nükleaz (TALEN)

10+ TAL Modül, her biri 1 bç
Nükleaz füzyonu

CRISPR/Cas9

1 hedef RNA
Nükleaza bağlanma

<http://www.addgene.org/TALEN/guide/>
<http://rna.berkeley.edu/crispr.html>



CRISPR/Cas Sistemi

Clustered, Regularly-Interspaced, Short Palindromic Repeats (CRISPR)–Associated protein system (/Cas)

Virus ve plasmidlere karşı prokaryotik immün sistem.

S. pyogenes SF370 Tip II CRISPR lokusu 4 gen içerir:

I. Cas9 nükleaz

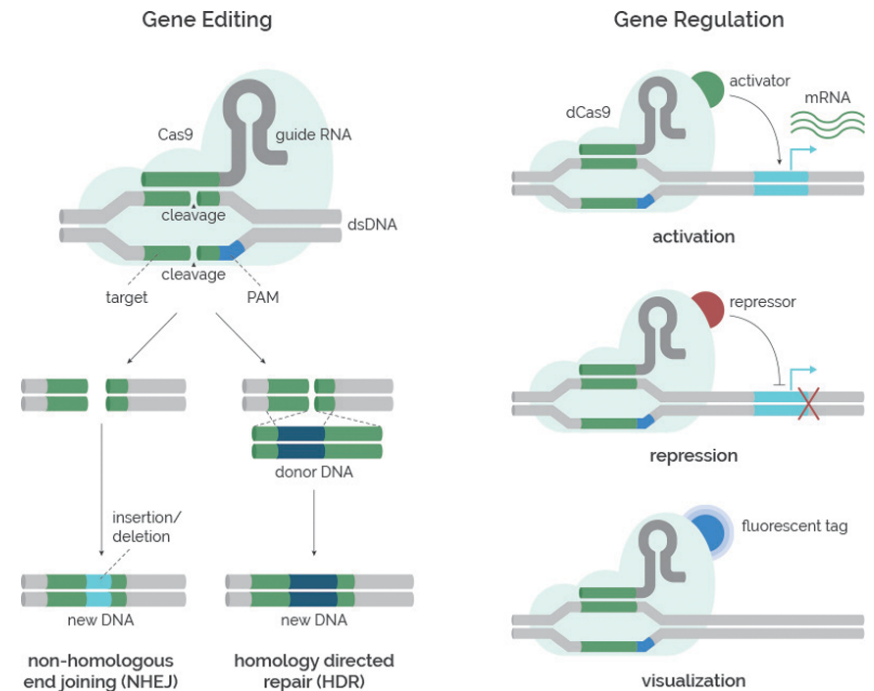
II. 2 non-coding CRISPR RNA (crRNA)

III. trans-aktivatör crRNA (tracrRNA)

IV. Prekürsör (oncu) crRNA (pre-crRNA)

özdeş doğrudan tekrarlar tarafından ara boşluklu nükleaz kılavuz

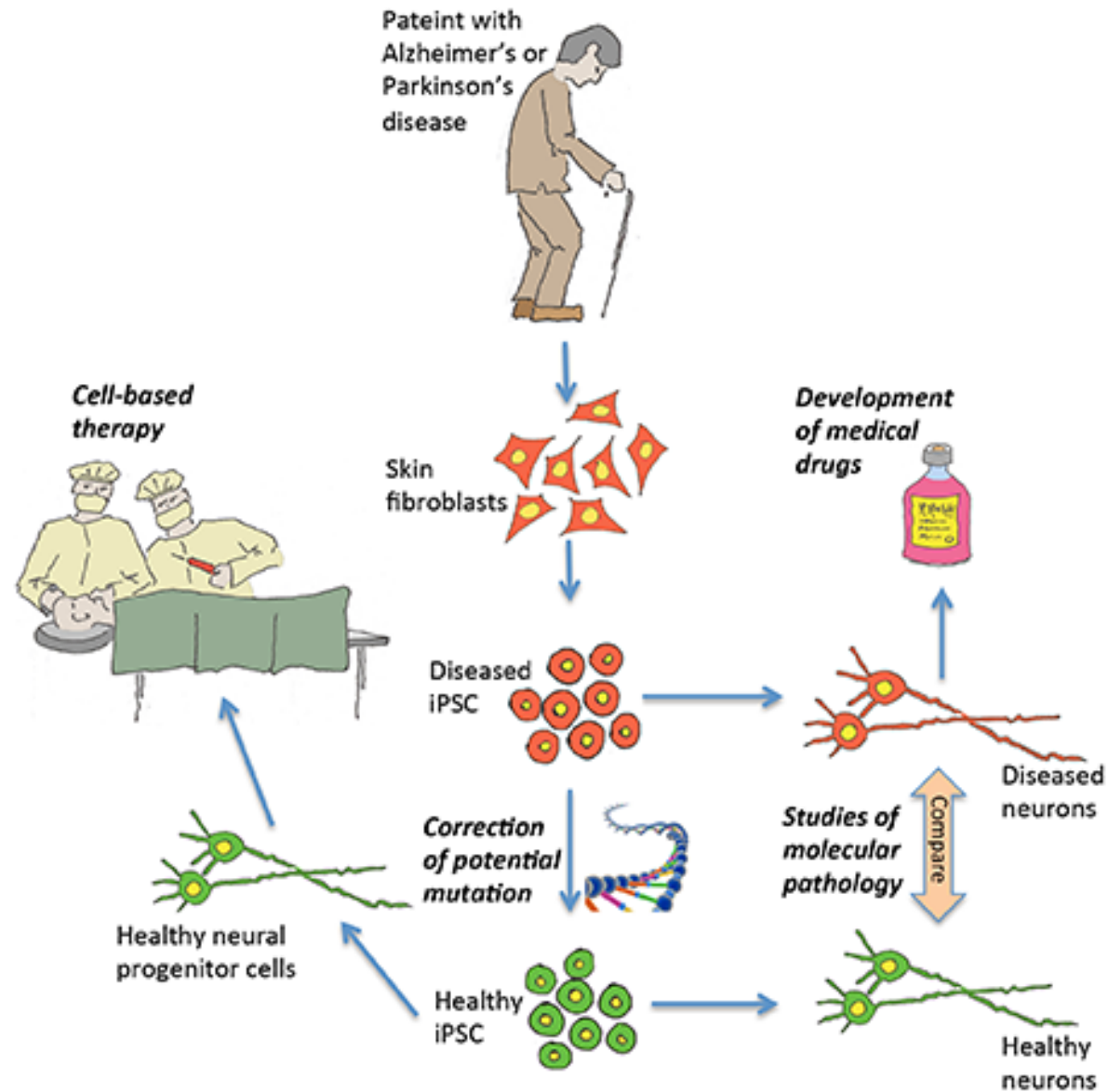
RNA bileşenleri, bu yabancı genetik dizileri DSB (double-strand break, çift-zincir kırıkları) oluşturmak için spesifik DNA dizilerine Cas9 endonükleazini yönlendirmektedir.



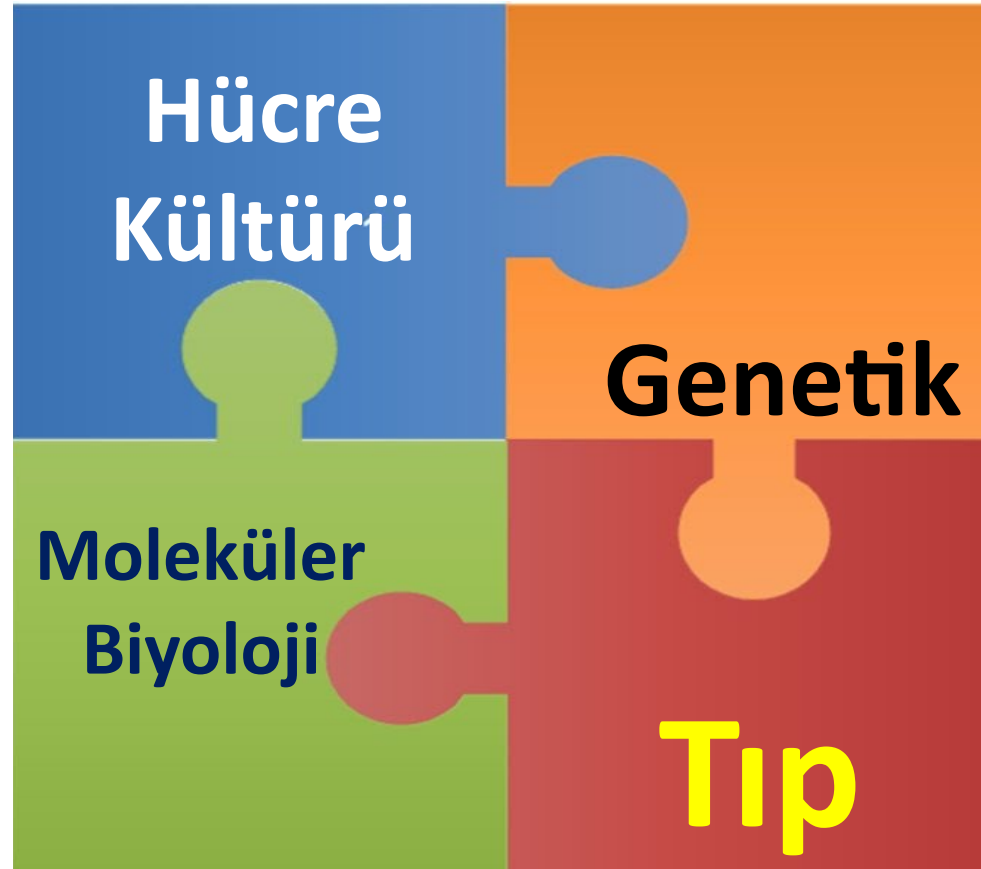
CRISPR/Cas9 Teknolojisinden Sonra Biyolojinin Son Adımı Tamamlanmış Oldu

- **DNA yapısı/ dizilenmesi**
- **PCR**
- **SNP tayini/ Ekspresyon çalışmaları**
- **Genom düzenleme**

Kök Hücre - CRISPR/Cas9 Genom Modifikasyonu



CRISPR / Cas9 +ESC veya iPSC = TEDAVİ





CRISPR gene-editing system unleashed on RNA

Cutting tool could be used to study RNA's role in disease.

Karen Weintraub

The CRISPR-Cas9 gene-editing complex, here shown editing DNA (in blue), has been modified to target RNA.

Researchers who discovered a molecular “scissors” for snipping genes have now developed a similar approach for targeting and cutting RNA. The new cutting tool should help researchers better understand RNA's role in cells and diseases, and some believe it could one day be useful in treatments for illnesses from Huntington's to heart disease.



RESEARCH ARTICLE | RNA EDITING

C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector

Omar O. Abudayyeh^{1,2,3,4,*}, Jonathan S. Gootenberg^{2,3,4,5,*}, Silvana Konermann^{2,3,4,*}, Julia Joung^{2,3,4}, Ian M. Slaymaker^{2,3,4}, David B.T. Cox^{1,2,3,4,6}, Sergey Shmakov^{7,8}, Kira S. Makarova⁸, Ekaterina Semenova⁹, Leonid Minakhin⁹, Konstantin Severinov^{7,9,10}, Aviv Regev^{2,6}, Eric S. Lander^{2,5,6}, Eugene V. Koonin^{8,†}, Feng Zhang^{1,2,3,4,†}

+ Author Affiliations

†Corresponding author. Email: zhang@broadinstitute.org (F.Z.); koonin@ncbi.nlm.nih.gov (E.V.K.)

* These authors contributed equally to this work.

Science 02 Jun 2016:

DOI: 10.1126/science.aaf5573



Peer Reviewed
← see details

Workshop:

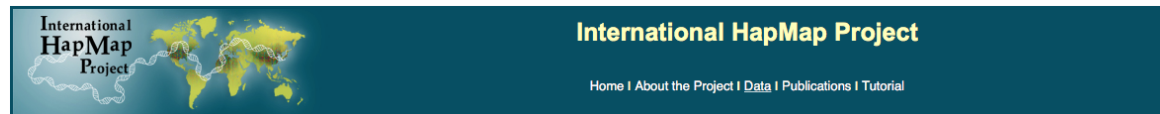
1. İstenilen gen bölgesinin nükleotid dizisine nasıl ulaşabiliriz?



2. DNA dizisindeki tekrarlı bölgelerin tespit edilmesi?



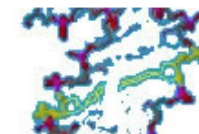
3. Hedef bölgedeki SNP tayini ve popülasyondaki önemi?

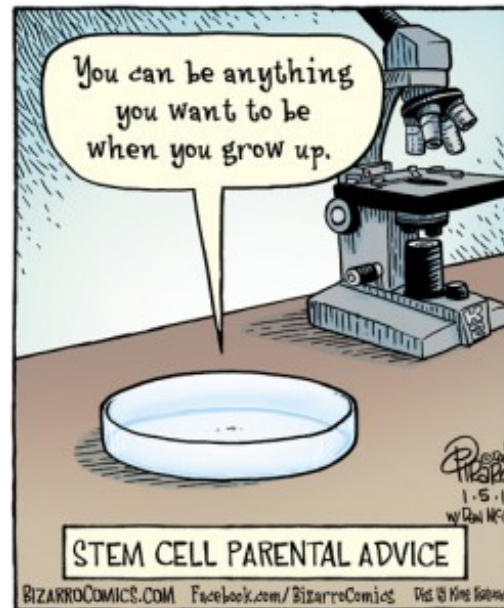
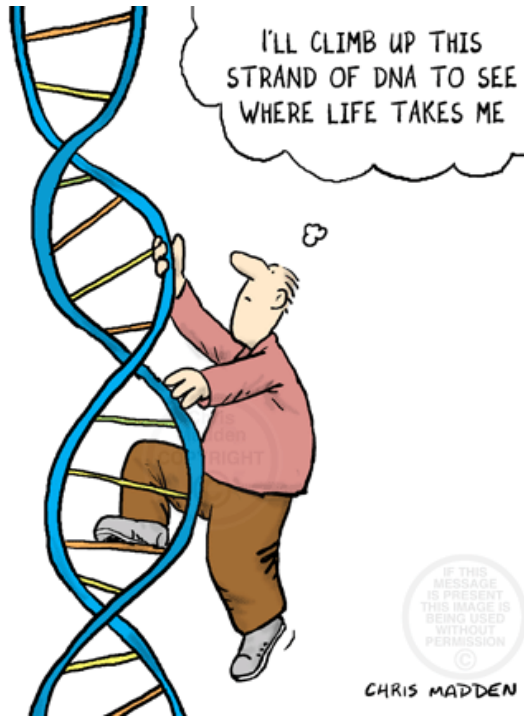


4. Hedef SNP'in hastalık yapıcı özelliklerinin araştırılması?



dbSNP
Short Genetic Variations





GENE THERAPY

