

Derleme Makale/ReviewArticle

Yeni Nesil Dizileme Teknolojisine Genel Bakış Overview of Next Generation Sequencing Technology

Cihan DARCAN^{1*}, Osman TÜRKYILMAZ²

Gönderme Tarihi: 02.12.2017

Düzeltilme Tarihi: 27.12.2017

Kabul Tarihi: 27.12.2017

Öz- DNA, RNA ve metilasyon dizilemesi için kullanılan yeni nesil dizileme teknolojileri bir çok bilim dalı üzerinde büyük etkiler oluşturarak bilimsel çalışmalara yeni bakış açıları kazandırmıştır. Yeni nesil dizileme büyük ölçekli dizileme kapasitesi ile Sanger dizilemesine kıyasla çok daha düşük maliyetlere sahiptir. Yeni nesil dizilemenin maliyet ve hız avantajları daha önceden neredeyse imkansız olarak düşünülen çalışmaların yapılabilir hale gelmesine olanak sağlamıştır. Bu gelişmeler yapısal ve işlevsel genomik anlayışımızı, temel genomikten entegre sistomiğe kadar değişen bir çok omik kavramı ile genişletmiştir. Bu derlemede genel olarak dizileme teknolojilerinden ve yeni nesil dizileme teknolojisinin kullanıldığı omik alanlardan bahsedilmektedir.

Anahtar Kelimeler- Yeni Nesil Dizileme, Yüksek Çıktılı Dizileme, Omik Bilimler

Abstract -Next-generation sequencing technologies for using DNA, RNA and methylation sequencing has made a great impact on many scientific disciplines and has given new perspectives to scientific studies. The next-generation sequencing has much lower cost than the Sanger sequencing with its large-scale sequencing capability. The cost and speed advantages of the next generation sequencing have made it possible to make work previously considered impossible studies. These developments have expanded our structural and functional genomics understanding with many omics area, ranging from basic genomics to integrated systemics. This review mainly discusses the sequencing technology and the application areas of the new generation sequencing technology.

Keywords- Next Generation Sequencing, High-Throughput Sequencing, Omics Sciences

I. GİRİŞ

Nükleik asit dizilemesi belirli bir DNA veya RNA molekülünde bulunan nükleotidlerin kesin sırasını belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Polinükleotid zincirlerindeki nükleik asitlerin dizilimleri canlıların kalıtsal özelliklerine ilişkin bilgileri içermektedir. Dolayısıyla bu dizileri belirlemek biyolojik araştırmalar için büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle yıllar boyunca araştırmacılar DNA dizilerini belirlemek için bir çok çalışma yapmıştır. İlk dizileme çabaları tek iplikli RNA bakteriyofajlarının genomları üzerine yoğunlaşmıştır. Bu genomların tamamlayıcı bir ipliğe sahip olmaması ve ökaryotik genomlara göre çok daha kısa olmaları nedeniyle dizilemek için oldukça elverişli olduğu düşünülmüştür [1]. 1976 yılında tek iplikli bir RNA virüsü olan bakteriyofaj MS2'nin tüm genomu dizilenmiştir [2]. 1977 yılında dizileme yöntemleri ile moleküler biyoloji biliminde dönüm noktası oluşturan iki makale yayımlanmıştır. Bunlardan birincisi Maxam-Gilbert yöntemi olarak bilinen DNA dizilerinin çeşitli kimyasal reaksiyonlar ile bölünmesi ve reaksiyon ürünlerinin jel elektroforezi ile ayrıldığı bir yöntemdir [3]. Diğer yöntem ise Sanger yöntemi olarak bilinen DNA dizisinin baz spesifik bir şekilde sonlandırılmasına neden olan dideoksinükleotidlerin kullanıldığı bir yöntemdir [4]. DNA dizilemesine atılan ilk büyük adım 2003 yılında tamamen biten ve 13 yıl süren İnsan Genom Projesi olmuştur. İnsan Genom Projesi Sanger dizilemesi olarak bilinen birinci nesil dizileme yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

İnsan Genom Projesinden sonra dizileme maliyetinin düşürülmesi ve dizileme süresinin kısaltılması amacıyla ABD Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından yeni dizileme teknolojilerinin geliştirilmesi teşvik edilmeye

^{1*}Sorumlu yazar iletişim: cihan.darcan@bilecik.edu.tr

¹Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Fen Edebiyat Fakültesi, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Bilecik, Türkiye

²İletişim: osmanturkyilmazz@gmail.com

²Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Bilecik, Türkiye

başlanmıştır. Bu çabalar sonuç vererek nanopor teknolojisine kadar giden yolun önü açılmıştır. Geliştirilen yeni nesil dizileme teknolojisi ile birlikte aynı anda milyonlarca dizileme işlemi paralel olarak çok düşük maliyetlerle yapılabilir hale gelmiştir. Paralel olarak dizileme yapabilme avantajı insan genomunun bir günden daha kısa bir sürede dizilenebilmesine olanak sağlamıştır. Yeni nesil dizilemedeki bu gelişmelere eş zamanlı olarak biyoinformatik araçların geliştirilmesi hem küçük hem de büyük araştırma gruplarının ilgilendikleri organizma için genom dizilerini, transkriptom bilgilerini ya da metilasyon bölgeleri gibi bir çok bilgiyi elde etmesini sağlamıştır [5].

Son on yılda düşük maliyetli ve yüksek çıktılı dizileme yapabilen bir çok yeni nesil dizileme platformu geliştirilmiştir [6]. Gelişen teknolojilerin birbirine benzerlik ve farklılıkları nedeniyle yeni nesil dizileme teknolojileri ikinci ve üçüncü nesil dizileme teknolojileri olarak ikiye ayrılmaktadır. Bu makalede temel olarak dizileme teknolojilerinden ve yeni nesil dizileme teknolojilerinin kullanıldığı omik alanlardan bahsedilmektedir.

II. 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 [7]. 1976 yılında benzer bir yöntem kullanılarak genomu 3569 nükleotid uzunluğunda olan bakteriyofaj MS2 dizilenmiştir [2]. 1977 yılında DNA dizileme için iki yöntem ortaya çıkmıştır: Maxam-Gilbert yöntemi ve Sanger yöntemi [3,4].

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 [3]. Fakat tehlikeli kimyasallar kullanılması ve Sanger'e göre daha yavaş bir yöntem olması nedeniyle Sanger yöntemi bilim adamları tarafından daha çok tercih edilir bir hale gelmiştir.

Sanger yöntemi, DNA dizileme teknolojisi için çığır açan bir buluştur. Zincir sonlandırma tekniği DNA iplikçiklerinin monomeri olan deoksiribonükleotidlerin (dNTP'ler) kimyasal analoglarının kullanılması ile gerçekleştirilmektedir [4]. Dideksinükleotidler (ddNTP'ler) DNA zincirinin uzatılması için gerekli olan 3' hidroksil grubundan yoksun oldukları için bir sonraki dNTP'nin 5' fosfatı ile bir bağ oluşturmazlar [8]. ddNTP'ler standart dNTP'ler ile belli bir konsantrasyonda karıştırılarak DNA uzatma reaksiyonunda kullanılırsa, rastgele zincir sonlanmaları olur ve mümkün olan bütün kombinasyonlarda DNA zinciri oluşturulur. Her bir ddNTP çeşidi için dört paralel reaksiyon gerçekleştirilerek jelde yürütme işlemi yapılır. Jel üzerinde daha küçük olan parçanın daha uzun mesafe alacağı göz önünde bulundurularak nükleotid dizisi belirlenir. Sanger yönteminin otomatize edilmesi ile beraber yaklaşık 30 yıl boyunca piyasaya hakim olmuştur ve altın standart olarak kullanılmıştır [9].

Birinci nesil DNA dizileme cihazları 1 kilobazdan (kb) biraz daha kısa okumalar yapabilmektedir. Daha uzun bölgelerin dizilenmesi için ise "shotgun dizileme" yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem ile önce dizilenmek istenen bölge parçalara ayrılmakta ve dizileme sonrasında tekrar birleştirilmektedir [10]. İnsan genom projesi shotgun dizileme yöntemi kullanılarak 3 yıllık bir sürede bitirilmiştir [11].

B. İkinci Nesil Dizileme

Son on yılda geliştirilen yeni dizileme teknolojileri hızlı bir şekilde çalışmalarda kullanılır hale gelmiştir. İnsan genomunun ilk kez dizilenmesi birinci nesil dizileme teknolojisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir [11]. Fakat sonraki dizileme teknolojileri geliştirilerek çok sayıda paralel dizileme tekniği ile yüksek hızlı ve düşük maliyetli hale getirildi. İlk ortaya çıkan ikinci nesil dizileme teknolojisi DNA sentezi sırasında DNA zincirine nükleotid eklenmesiyle ortama salınan pirofosfat'ın bir çeşit enzimatik reaksiyonlar sonucunda ortaya çıkardığı ışık şiddetine göre nükleotidin belirlenmesini sağlamaktadır. Pirodizileme adı verilen bu yöntem DNA polimerazın doğrudan etkisini gerektirdiği için sentez yoluyla dizileme (sequencing by synthesis) prensibine dayanmaktadır [12]. Bu teknoloji dizileme reaksiyonlarının paralel bir hale getirilmesi ile aynı anda dizilenen DNA miktarını büyük ölçüde arttırdıkları için dizileme teknolojisinin tarihinde bir dönüm noktası olmuştur [13].

Bu başarıdan sonra birçok paralel dizileme tekniği ortaya çıkmıştır. Her bir teknoloji avantajları ve dezavantajları nedeniyle piyasa üzerinde farklı etkiler göstermiştir. 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 ışına gerçekleştirir ve bu ışınlar yüksek çözünürlüklü kameralar ile kayıt altına alınarak dizi belirlenir [14]. İlk zamanlarında çok kısa okumalar (35 baz) yapılabiliyorken zamanla okuma büyüklükleri artırılarak daha uzun okumalar (300 baz) yapılabilir hale getirilmiştir. [15]

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 florasan işaretli oligonükleotidlerin ligasyonuna bakılır. Ligasyon sonrasında ise problemlerin işaretli olan ucu kesilerek döngü devam ettirilir [16]. Bu teknoloji Illumina makinelerinin elde ettiği okuma uzunluğu ve kapsam (covarege) değerlerini elde edemiyor olsa da baz başına düşen maliyet bakımından hala rekabet edebilmektedir [17]. Son göze çarpan ikinci nesil dizileme platformu ise Ion Torrent platformudur. Ion Torrent teknolojisi, florasan ya da lüminesans kullanmaması nedeniyle diğer yöntemlerden ayrılmaktadır. Bu teknoloji DNA sentezi sırasında hidrojen iyonlarının serbest bırakılmasından kaynaklanan pH'daki değişimi hesaplayarak dizileme yapmaktadır [18]. Ion Torrent teknolojisi her ne kadar homopolimer bölgelerinde hatalı okumalar yapıyor olsa da diğer yöntemlere göre çok hızlı dizilemeler yapabilmektedir [19].

DNA dizileme teknolojilerinde yapılan bu değişim DNA dizilemedeki zorlukları kaldırarak maliyeti düşürdüğü için genomik devrim olarak adlandırılabilir. Son yıllarda Illumina dizileme platformu piyasanın büyük bir kısmına hakim olarak ikinci nesil dizileme sistemleri içerisinde en başarılı sistem olarak adlandırılmaktadır [20].

C. Üçüncü Nesil Dizileme

Dizileme teknolojilerinin kuşaklara ayrılması konusunda büyük tartışmalar bulunmaktadır. Tek molekül dizileme (Single Molecule Sequencing) ve gerçek zamanlı dizileme üçüncü nesil dizileme sistemlerini daha önceki nesillerden ayıran basit farklardır. Üçüncü nesil dizileme ayrıca daha önceki teknolojilerden farklı olarak DNA amplifikasyonuna ihtiyaç duymamaktadır [21].

Üçüncü nesil dizileme teknolojilerinden biri olan tek molekül dizileme tekniği ilk olarak Helicos BioSciences tarafından geliştirilmiştir [22]. Bu teknolojinin Illumina teknolojisinden tek farkı köprü amplifikasyonuna ihtiyaç duymaksızın tek molekül üzerinden dizileme yapabmesidir. Bunun dışında Illumina teknolojisine benzer bir şekilde florasan işaretli dNTP'lerin, DNA polimeraz aktivitesi sırasında eklenmesi sonucunda ortaya çıkan ışına miktarına göre dizileme yapılmaktadır [23]. Nispeten yavaş ve pahalı bir teknoloji olmasına rağmen amplifiye edilmemiş DNA'yı dizilemeye olanak sağlayan bir teknolojidir [24].

Popüler olan üçüncü nesil dizileme teknolojilerinden birisi de Pacific Biosciences'in PacBio makinelerinde bulunan gerçek zamanlı tek molekül dizileme (Single Molecule Real Time) teknolojisidir [25]. 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. PacBio makineleri, 10 kb'yi aşan okumalar yapabildiği için *de novo* genom dizilemeleri konusunda büyük önem taşımaktadır [21].

Üçüncü nesil dizileme teknolojileri içerisinde geleceği en parlak görünen teknoloji nanopor dizilemedir [26]. 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 [27]. 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 platformlarında bu teknolojiyi kullanmaktadır [26]. Nanopor teknolojisinin her ne kadar hatalı okuma oranı yüksek olsa da DNA dizilemesi konusunda ezber bozan bir teknolojiyi temsil etmeleri, uzun okumalar yapmaları, daha önceki teknolojilere göre çok daha ucuz ve hızlı olmaları nedeniyle oldukça önemlidir [28].

D. İkinci ve Üçüncü Nesil Dizileme Yöntemlerinin Karşılaştırılması

İkinci nesil dizileme teknolojilerinin aksine üçüncü nesil dizileme teknolojileri DNA amplifikasyonuna ihtiyaç duymamaktadır. Üçüncü nesil dizileme teknolojilerinde ikinci nesil dizileme teknolojilerine kıyasla az miktarda başlangıç meteryali yeterlidir [21]. Üçüncü nesil dizileme yöntemleri, DNA polimerazın katalitik aktivitesi ve yüksek hızı sayesinde daha uzun ve hızlı okumalar yapabilmektedir. Bu iki dizileme sistemi

arasındaki diğer bir farklılık ise ikinci nesil dizileme yöntemlerinde RNA dizilemesi sadece cDNA dizilemesi ile gerçekleştirilebiliyorken bazı üçüncü nesil dizileme yöntemlerinde RNA doğrudan dizilenebilmektedir [29].

Ortaya çıkan veri bakımından karşılaştırıldığında her iki nesilde de büyük veri hacmi nedeniyle karmaşıklık vardır. İkinci nesil dizileme teknolojilerinde elde edilen verilerin analizinde temel sıkıntılar okuma uzunluklarından kaynaklanırken üçüncü nesil dizilemelerde genellikle okuma hatalarından kaynaklanmaktadır. Üçüncü nesil dizileme okumalarının ikinci nesil dizileme yöntemlerine kıyasla uzun olması nedeniyle *de novo* montaj sırasında birleştirilebilen okuma sayısı daha fazladır. Aynı zamanda üçüncü nesil dizileme okumaları ikinci nesil dizileme okumalarının hizalanması sırasında referans olarak kullanılabilir.

III. YENİ NESİL DİZİLEME ÇALIŞMA ALANLARI

A. Genom Dizileme

Dizileme teknolojilerindeki ilerlemeler genom dizilemenin daha kolay, daha ucuz ve daha hızlı bir şekilde yapılabilir hale gelmesine olanak sağlamıştır. Yeni nesil dizileme mikroorganizmalardan insanlara kadar bir çok genomu dizilemek için kullanılmıştır. Genom dizileme temel olarak üç basamaktan oluşmaktadır. İlk olarak genom çeşitli yollarla dizileme yapılacak olan platforma göre parçalara ayrılır. Bunun için çeşitli enzimler ya da sonikatör kullanılabilir. İkinci basamak ise elde edilen DNA parçalarının tek yönlü ya da çift yönlü olarak dizilenme işlemidir. Tek yönlü okumada dizileme cihazı her bir parçayı sadece bir ucundan dizilerken çift yönlü okumada ise her bir parçanın iki ucundan da dizileme işlemi yapılır. Genom dizilemenin üçüncü basamağı ise elde edilen verilerin analizidir [30]. Daha önce dizilenmemiş genomların dizilenmesinde okuma uzunlukları büyük önem taşımaktadır. Referans genom bulunmadığı durumlarda okumalar uç uca birleştirilerek genom elde edilmeye çalışılır. Bu yöntem *de novo* montaj olarak adlandırılmaktadır [31]. Fakat bu yöntem ile okumaların birleştirilmesi sırasında, özellikle tekrar bölgelerinde büyük sıkıntılar ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle okumaların uzun olması özellikle referans genomu bulunmayan örneklerde *de novo* montajı kolaylaştırmaktadır. Referans genomu olan örneklerde ise analiz aşaması daha kolaydır. Bütün okumalar referans bir genome hizalanarak birleştirilmektedir. Böylece genom dizilimi elde edilebilir [32].

Her ne kadar yeni nesil dizileme yöntemleri ile genom dizileme maliyetleri düşmüş olsa da bu yöntem rutin olarak kullanılmak için halen pahalı bir yöntemdir. Bu nedenle genom dizilimine alternatif olarak ekzom dizileme ve hedeflenmiş dizileme gibi alternatif yöntemler bulunmaktadır.

B. Ekzom Dizileme

Ekzom dizileme 2009 yılında genomun tüm protein kodlama bölgelerini (ekzonları) dizilemek amacıyla geliştirilen bir tekniktir [33]. Ekzom, genom içerisinde %2'den daha küçük bir alan kaplamasına rağmen, hastalıklara neden olan varyasyonların %85'lik kısmını taşımaktadır [34]. Ekzom dizileme genellikle hazır hibridizasyona dayalı zenginleştirme kitleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Her ne kadar hazır kitlerin tamamı ekzom dizileme için kullanılıyor olsa da tasarımları ve performanslarıyla birbirlerinden farklılıklar göstermektedir. Bazı kitler yalnızca protein kodlama bölgelerini içeriyorken diğer kitler kodlanmamış RNA'lar (mikro RNA'lar dahil), 5' ve 3' kodlanmayan bölgeleri de içermektedir [35].

Hastalığın hangi lokustan kaynaklandığı bilinmediği zamanlarda ekzom dizileme cazip bir seçenektir. Şimdiye kadar ekzom dizilme, 150'den fazla hastalığın geninin belirlenmesini sağlamıştır. Ancak ekzom dizileme ile elde edilen verilerin büyük bir kısmı, bir hastalıkla ilişkili olmadığı için verilerin yorumlanmasında zorluklar bulunmaktadır [36].

C. Hedeflenmiş Dizileme

Genom dizileme, özellikle tıbbi analizlerde yaygın olarak kullanılmak için halen pahalıdır. Bu nedenle sadece hedef bölgelerin dizilenmesi genom dizilemeye göre iyi bir alternatif oluşturmaktadır [37]. Hedeflenen bölge bir ekzondan genomun büyük bir bölümüne kadar değişebilmektedir. Küçük hedefler için genellikle PCR kullanılırken büyük hedefler için ise genellikle oligonükleotid problemler ile hibridizasyon yöntemi kullanılmaktadır [38, 39]. PCR tabanlı yöntem doğrudan DNA ile başlarken, hibridizasyon temelli yöntemlerde kullanılacak olan cihaza (platform) uygun kütüphanenin hazırlanması gerekmektedir.

Hedefe yönelik dizileme için PCR primerleri ya da problemler tasarlanarak kullanılabilir [38, 39]. Fakat tasarım yapmanın zorlukları nedeniyle farklı amaçlara yönelik ticari olarak üretilen bir çok hazır kit bulunmaktadır. Hazır kitler genellikle iyi performans gösterirken özel olarak tasarlanan paneller çoğu zaman optimizasyon gerektirmektedir. Hibridizasyon temelli yöntemler için tipik optimizasyon adımları, okuma uzunluklarının boyutunun ayarlanması ve eğer gerekli ise problemlerin yeniden tasarlanmasını içermektedir [40].

PCR temelli hedefe yönelik dizileme işlemlerinde, optimizasyon çalışmaları hibridizasyon temelli yöntemlere göre biraz daha zordur. İlk olarak primer tasarımı sırasında PCR ürünlerinin boyutunu kullanılacak platform göz önünde bulundurularak belirlemek gereklidir. Hedef bölgenin büyüklüğüne göre primer sayısı değişkenlik göstermektedir. Primer sayısı fazla olduğu durumlarda genellikle multipleks PCR tercih edilmektedir. Bu nedenle primerler arasındaki etkileşimlerin iyi bir şekilde hesaplanması gerekmektedir. Gerekli olan durumlarda reaksiyon sayısı artırılabilir ya da primerler yeniden tasarlanabilir.

Hedefe yönelik hazır kitleler için in vitro diagnostik (IVD) sertifikası o ürünün geçerliliği için resmi bir sertifikadır. Her ne kadar hazır kitlelere yoğun bir talep olsa da IVD sertifikası almak için gerekli ön testlerin maliyetinin çok yüksek olması nedeniyle bu sertifikaya sahip olan ürün sayısı çok azdır.

Hedefe yönelik dizileme yöntemlerinde diğer bir önemli nokta ise arzu edilen kapsam değerlerinin elde edilmesidir. PCR ile hedefe yönelik dizileme sırasında elde edilen kapsam değerleri amplikasyon miktarı ile doğru orantılıdır. Küçük hedef bölgeler için amplikasyon miktarı yüksek olurken primer sayısının arttığı büyük hedef bölgelerinde amplikasyon miktarı azaldığı için istenilen kapsam değerlerine ulaşmakta zorluk çekilmektedir. Bu nedenle optimizasyon aşamaları istenilen kapsam değerine ulaşmak için büyük önem arz etmektedir.

D. Transkriptomik ve RNA Dizileme

RNA dizileme (RNA-seq) bir organizmanın yaşam döngüsünün herhangi bir anında hücrelerindeki gen ekspresyon miktarını belirleyen yeni nesil dizileme yöntemidir [41]. Hücrelerde belirli koşullar altında bulunan transkript çeşitlerinin tamamına transkriptom adı verilmektedir. Sadece genom verileri genlerin fonksiyonlarının anlaşılması için yeterli değildir. Bu nedenle transkriptom verilerine ihtiyaç duyulmaktadır. RNA dizileme ile genom üzerinde ifade edilen bölgeler yüksek güvenilirlik ve duyarlılıkla nicel olarak belirlenebilmekte ve bu bölgelerin haritaları çıkarılabilmektedir .

İkinci nesil dizileme yöntemleri gerçekleştirilen ile transkriptomik çalışmalar, genomik dizileme yöntemlerine ek bir aşama eklenmesi ile gerçekleştirilmektedir. İlk olarak dizilenmek istenen RNA'lar ters transkripsiyon ile cDNA'ya dönüştürülmektedir ve daha sonra dizileme yapılacak platforma uygun büyüklüklerde parçalanarak dizilmektedir [42].

RNA dizileme daha yeni bir teknoloji olmasına rağmen kendisinden önce bulunan teknolojilere göre bir çok avantaj sunmaktadır. İlk olarak RNA-seq için canlıların genomik bilgilerine gerek yoktur. Yani daha önce genomik çalışması yapılmamış olan canlıların transkriptomik çalışmaları yeni nesil dizileme ile yapılabilmektedir. RNA-seq'in diğer bir avantajı ise tek bazda olan değişimin bile ayırt edilebilmesidir. Bu sayede RNA izoformlarının belirlenmesinde diğer yöntemlere göre çok daha büyük kabiliyete sahiptir. Aynı zamanda elde edilen RNA-seq verileri diğer yöntemlere göre çok daha hassas ve doğru bir şekilde elde edilmektedir [43].

E. Metagenomik ve Mikrobiomlar

Metagenomik, mikrobiyal bir topluluğun toplam genom içeriğinin incelenmesine verilen isimdir. Metagenomik çalışmalarda, toplam DNA/ RNA mikrobiyal popülasyondan kültürü yapılmadan izole edilerek dizilmektedir. Daha sonra bilinen türlerin belirlenmesi ve daha önce bilinmeyen türlerin keşfedilmesi için önceden bilinen dizilerle karşılaştırılmaktadır [44]. Mikrobiyal toplulukların izole edildiği ortamlardan bazılarında gıda, su, atıklar, çeşitli insan ve hayvan yerleşim alanları örnek olarak verilebilir. Bunların dışında hastaneler, yaygın olarak mikroorganizmaları içeren ve çok çalışılan ortamlardandır [45]. Yapılan ilk mikrobiyolojik çalışmalarda 16s rRNA genleri hedef alınmış, Roche ve Illumina platformları kullanılarak maden alanları, körfezler, denizler ve okyanusların yüzey sularını hedef alan yeni nesil dizileme mikrobiyal çalışmalarından farklı türler tanımlanmıştır [46].

İnsan vücudunda bulunan mikroorganizmaların tamamına mikrobiyom adı verilmektedir. Mikrobiyomdaki genlerin sayısının insan genomundaki genlerden 100 kat daha fazla olduğu tahmin edilmektedir [45]. Aynı zamanda bireyler arasındaki mikrobiyomların %80-90 oranında farklı olduğu tahmin edilmektedir. Bu bulgular kişiselleştirilmiş tıpta hastanın kişisel genomunu hedef alan yaklaşımların yerine mikrobiyomu hedef alan çalışmaların daha verimli olabileceğini göstermektedir. Mikrobiyomlar bağırsak, deri, vajina ve oral mukozayı da içine alan çeşitli anatomik habitatları içermektedir [47]. Yeni nesil dizilemedeki ilerlemeler ve analiz yöntemlerinin gelişmesi ile birlikte mikrobiyomların insan sağlığına etkilerini anlamak amacıyla yapılan çalışma sayısı gittikçe artmaktadır

F. Metilomik ve Epigenomik

DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmamasına rağmen, DNA üzerinde meydana gelen modifikasyonlarla gen ekspresyonunun düzenlenmesi epigenetik olarak adlandırılmaktadır. Epigenomik, bir hücredeki genetik materyalin üzerinde gerçekleşen epigenetik modifikasyonlarının tamamının çalışıldığı omik dalıdır [48]. Metilomik ise genom üzerindeki DNA metilasyonlarının analizleri ve bunların gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini inceleyen omik dalıdır [49]. DNA dizilerindeki metilasyonların kanser gibi bir çok hastalık ile ilişkili olduğu bilinmektedir [50].

Bakterilerin yaşadığı çevre şartları oldukça dinamiktir. Gen ifadesinin epigenetik düzenlenmesi, bakterilerin değişen çevre şartları ile mücadele etmelerine yardımcı olur. Bakteriler, gen ekspresyonunu düzenleyerek sıcaklık, pH ve ozmolarite gibi çevresel değişimlere cevap verirler [51]. Çevresel uyarılara göre düzenlenen gen ifadesi hayatta kalmak için oldukça önemlidir. Prokaryotlarda DNA'nın modifikasyonu özellikle DNA metilasyonu ile gerçekleştirilmektedir. Prokaryotlarda DNA metilasyonu, transkripsiyon, DNA onarımı ve replikasyon başlatma dahil olmak üzere bir çok fizyolojik işlem üzerinde etkilidir. Metilasyon dizileme çalışmaları prokaryotlarda bu mekanizmaların keşfedilmesinde büyük önem taşımaktadır.

Son yıllarda epigenetik değişikliklerin kanser oluşumu ve ilerlemesinde önemli etkenler olarak kabulü hızla artmıştır [50]. Genom bisülfid dizileme (WGBS) normal hücrelerdeki ve kanser hücrelerindeki metilasyon modellerinin belirlenmesini sağlamıştır. Genom metilasyon haritalaması, hemen hemen tüm kanser türlerinde yüzlerce gende anormal metilasyon bölgeleri olduğunu göstermiştir. CpG hipermetilasyonunun DNA tamir genlerini susturduğu ve tümör baskılayıcı genlerin regülasyonunu azalttığı yapılan çalışmalar sonucunda gösterilmiştir [52]. Hedefi bilinmeyen metilasyon çalışmalarında genom metilasyon dizilemesi araştırmacılara oldukça yararlı bilgi sağlamaktadır.

Otizm, diyabet ve müsküler distrofi gibi hastalıklar, genom üzerinde hastalıkla ilişkili onlarca bölgeye sahip olan multigenik bozukluklardır. Bu karmaşıklığa ek olarak çevre, beslenme ve egzersiz gibi dış etkenlerin de hastalıklar üzerinde etkileri bulunmaktadır. Epigenetik mekanizmaların, Otizm ve Rett sendromu gibi nörogelişimsel bozukluklarda da önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir [53]. Metabolik bozukluklar, genetik ve çevresel faktörler arasındaki karmaşık etkileşimlerden de etkilenir. Örneğin obezite ve tip2 diyabetle güçlü bir şekilde ilişkili olan bir karaciğer hastalığının (NAFLD) kalori alımı ve genetik yatkınlıklardan etkilenebileceği bilinmektedir. Hedeflenmiş metilasyon dizileme, bu gibi karmaşık hastalık araştırmalarında düşük maliyetli bir seçenek sunmaktadır.

IV. SONUÇLAR

Biyolojik çalışmalarda DNA dizileme büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle yaklaşık yarım yüzyıl boyunca bir çok bilim adamı DNA dizileme teknolojileri geliştirmek için bir çok çalışma yapmıştır. Dizileme işlemleri ilk olarak basit RNA hedeflerinin dizilenmesi ile başlamış olsa da sonrasında DNA dizileme yapılmaya başlamıştır. Yapılan çalışmalar ve girişimler sayesinde zor ve zahmetli olan dizileme teknolojilerinin yerine daha kolay uygulanabilir, daha hızlı ve maliyeti düşük olan teknolojiler ortaya çıkmıştır. Çok sayıda yeni teknoloji günümüzde orta ölçekli laboratuvarlar için ulaşılabilir hale gelmiştir. DNA dizileme teknolojisindeki ve elde edilen verilerin analiz edilebilir hale gelmesindeki gelişmeler genomik, transkriptomik, metagenomik ve epigenomik gibi bir çok çalışma alanının ortaya çıkmasına neden olmuştur.

Her platformun farklı avantajları ve kısıtlamaları bulunmaktadır. Bu nedenle araştırmacıların çalışmalarında maliyet, çalışma konusu, okuma uzunluğu, hata oranı ve kapsam değeri gibi bir çok değişkeni göz önünde bulundurarak bir dizileme platformu seçmeleri gerekmektedir. Aynı zamanda elde edilen verilerin analizi için de çalışma konusu ve dizileme platformunun uyumu büyük önem taşımaktadır. Bu konulara dikkat etmeden yapılan dizilemelerin analizi yanlış sonuçların elde edilmesine neden olabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Heather, J.M., Chain, B. "The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA", *Genomics*, vol. 107, pp. 1–8, 2016.
- [2] Fiers, W., Contreras, R., Duerinck, F., Haegeman, G., Iserentant, D., et al., "Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene", *Nature*, vol. 260, pp. 500–507, 1976.

- [3] Maxam, A.M., Gilbert, W., “A new method for sequencing DNA”, *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 74, pp. 560 – 564, 1977.
- [4] Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., “DNA sequencing with chain-terminating inhibitors”, *Proc Natl Acad Sci*, vol. 74, pp. 5463–5467, 1977.
- [5] Mardis, E.R., “The impact of next-generation sequencing technology on genetics”, *Trends in Genetics*, vol. 24, pp. 133-141, 2008.
- [6] Metzker, M., “Sequencing technologies — the next generation”, *Nature Rev. Genet.*, vol. 11, pp. 31–46, 2010.
- [7] Holley, R.W., “Structure of a ribonucleic acid”, *Science*, vol. 147, pp. 1462–1465, 1965.
- [8] Chidgeavadze, Z., Beabealashvili, R.S., “2', 3'-Dideoxy-3'-aminonucleoside 5'-triphosphates are the terminators of DNA synthesis catalyzed by DNA polymerases”, *Nucleic Acids Res*, vol. 12, pp. 1671–1686, 1984.
- [9] Artuso, R., Fallerini, C., Dosa, L., Scionti, F., Clementi, M., et al, “Advances in Alport syndrome diagnosis using next-generation sequencing”, *Eur. J. Hum. Genet.*, vol. 20, pp. 50-57, 2012.
- [10] Anderson, S., “Shotgun DNA sequencing using cloned DNase I-generated fragments”, *Nucleic Acids Res*, vol. 9, pp. 3015–3027, 1981.
- [11] Venter, J. C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., et al, “The sequence of the human genome”, *Science*, vol. 291, pp. 1304–1351, 2001.
- [12] Nyrén, P.I., Lundin, A., “Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis”, *Anal. Biochem*, vol. 509, pp. 504–509, 1985.
- [13] Margulies, M., Egholm, M., Altman, W., Attiya, S., “Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors”, *Nature*, vol. 437, pp. 376–380, 2005.
- [14] Voelkerding, K.V., Dames, S.A., Durtschi, J.D., “Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics”, *Clin. Chem*, vol. 55, pp. 641–658, 2009.
- [15] Heather, J.M., Chain, B., “The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA”, *Genomics*, vol. 107, pp. 1-8, 2016.
- [16] Schuster, S.C., “Next-generation sequencing transforms today's biology”, *Nat. Methods*, vol. 5, pp. 16-18, 2008.
- [17] Glenn, T.C., “Field guide to next-generation DNA sequencers”, *Mol. Ecol. Resour.*, vol. 11, pp. 759–769, 2011.
- [18] Rothberg, J.M., “An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing”, *Nature*, vol. 475, pp. 348–352, 2011.
- [19] Loman, N.J., “Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms”, *Nat. Biotechnol.*, vol. 30:pp. 434–439, 2012.
- [20] Greenleaf, W.J., Sidow, A., “The future of sequencing: convergence of intelligent design and market Darwinism”, *Genome Biol.*, vol. 15, pp. 303, 2014.
- [21] Schadt, E.E., Turner, S., Kasarskis, A., “A window into third-generation sequencing”, *Hum. Mol. Genet.*, vol. 19, pp. 227–240, 2010.

- [22] Thompson, J.F., Steinmann, K.E., “Single molecule sequencing with a HeliScope genetic analysis system”, *Curr Protoc Mol Biol.*, vol. 7, pp. 1-16, 2010.
- [23] Bowers, J., “Virtual terminator nucleotides for next-generation DNA sequencing” *Nat. Methods.*, vol. 6, pp. 593–595, 2009.
- [24] Pareek, C.S., Smoczynski, R., “Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing”, *J. Appl. Genet.*, vol. 52, pp. 413–435, 2011.
- [25] Rhoads, A., Au K.F., “PacBio sequencing and its applications”, *Genomics Proteomics Bioinformatics*, vol. 13, pp. 278-289, 2015.
- [26] Laver, T., Harrison, J., O’Neill, P.A., Moore, K., Farbos, A., et al., “Assessing the performance of the Oxford Nanopore Technologies MinION” *Biomol Detect Quantif*, vol. 3, pp. 1-8, 2015.
- [27] Kasianowicz, J.J., Brandin, E., Branton, D., Deamer, D.W., “Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 93:pp. 13770–13773, 1996.
- [28] Mikheyev, A.S., Tin, M.M., “A first look at the Oxford Nanopore MinION sequencer”, *Mol. Ecol. Resour.*, vol. 14, pp. 1097–1102, 2014.
- [29] Pareek, C.S., Smoczynski, R., Tretyn, A., “Sequencing technologies and genome sequencing”, *J Appl Genet*, vol. 52, pp. 413–435, 2011.
- [30] Grada, A., Weinbrecht K., “Next-generation sequencing: methodology and application”, *J. Invest. Dermatol.*, vol. 133, pp. e11, 2013.
- [31] Li, R., Wei, F., Tian, G., Zhu, G., He, L., et al. “The sequence and de novo assembly of the giant panda genome”, *Nature* vol. 463, pp. 311–317, 2010.
- [32] Pop, M., “Genome assembly reborn: recent computational challenges”, *Brief. Bioinform.*, vol. 10, pp. 354-366, 2009.
- [33] Ng, S.B., Turner, E.H., Robertson, P.D., Flygare, S.D., Bigham, A.W., et al. “Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes”, *Nature*, vol. 461, pp. 272–276, 2009.
- [34] van Dijk, E.L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., Thermes, C., “Ten years of next-generation sequencing technology”, *Trends Genet*, vol. 30, pp. 418-426, 2014.
- [35] Chilamakuri, C.S.R., Lorenz, S., Madoui, M.A., Vodak, D., Sun, J.C., et al., “Performance comparison of four exome capture systems for deep sequencing”, *BMC Genomics*, vol. 15, pp. 449, 2014.
- [36] Rabbani, B., Tekin, M., Mahdieh, N., “The promise of whole-exome sequencing in medical genetics” *J Hum Genet.*, vol. 59, pp. 5–15, 2014.
- [37] Rehm, H.L., “Disease-targeted sequencing: a cornerstone in the clinic” *Nat. Rev. Genet*, vol. 14, pp. 295-300, 2013.
- [38] Zheng, Z., Liebers, M., Zhelyazkova, B., Cao, Y., Panditi, D., et al. “Anchored multiplex PCR for targeted next-generation sequencing”, *Nat. Med*, vol. 20, pp. 1479–1484, 2014.
- [39] Mamanova, L., Coffey, A.J., Scott, C.E., Kozarewa, I., Turner, E.H., et al., “Target-enrichment strategies for next-generation sequencing”, *Nat Methods*, vol. 7, pp. 111–118, 2010.
- [40] Stoddard, J.L., Niemela, J.E., Fleisher T.A., Rosenzweig S.D., “Targeted NGS: A cost-effective approach to molecular diagnosis of PIDs”, *Front. Immunol.*, vol. 5, pp.531, 2014.

- [41] Oszolak, F., Milos, P.M., “RNA sequencing: Advances, challenges and opportunities” *Nat Rev Genet.*, vol. 12, pp. 87–98, 2011.
- [42] Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., “RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics”, *Nature Rev. Genet.*, vol 10, pp. 57–63, 2009.
- [43] Bybjerg-Grauholm, J., Hagen, C.M., Khoo, S.K., Johannesen, M.L., Hansen, C.S., et al., “RNA sequencing of archived neonatal dried blood spots”, *Mol Genet Metab Rep*, vol 10, pp. 33–37, 2017.
- [44] Gilbert, J.A., Dupont, C.L., Microbial metagenomics: Beyond the genome” *Annu Rev Mar Sci.*, vol. 3, pp. 347–371, 2011.
- [45] Weinstock, G.M., “Genomic approaches to studying the human microbiota”, *Nature.*, vol. 489, pp. 250–256, 2012.
- [46] Wylie, K.M., Weinstock, G.M., Storch, G.A., “Virome genomics: A tool for defining the human virome” *Curr Opin Microbiol.*, vol. 16, pp. 479–484, 2013.
- [47] Ursell, L.K., Metcalf, J.L., Parfrey, L.W., Knight, R., “Defining the human microbiome”, *Nutr Rev.*, vol. 70, pp. 38–44, 2012
- [48] Peter, A.J., Stephen, B.B., “The Epigenomics of Cancer”, *Cell.*, vol. 128, pp. 683-692, 2007.
- [49] Hirst, M., “Epigenomics: Sequencing the methylome”, *Methods Mol Biol.*, vol. 973, pp. 39– 54, 2013.
- [50] Esteller, M., “Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps”, *Nat Rev Genet.*, vol. 8, pp. 286-298, 2007.
- [51] Wion, D., Casadesus, J., “N6-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions” *Nature Rev. Microbiol.*, vol. 4, pp. 183–192, 2006.
- [52] Merlo, A., Herman, J.G., Mao, L., Lee, D.J., Gabrielson, E., et al., “5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers” *Nature Med.*, vol. 1, pp. 686–692, 1995.
- [53] Vijayakumar, N.T., Judy, M.V., “Autism spectrum disorders: Integration of the genome, transcriptome and the environment”, *J Neurol Sci.* vol. 364, pp. 167-176, 2016.