

Kromatin İmmunopresipitasyon-Dizileme (ChIP Dizileme) Metodu ile Transkripsiyon Faktörü Bağlanma Bölgelerinin Saptanması

Detection of Transcription Factor Binding Sites by Chromatin Immunoprecipitation (ChIP Sequencing) Method

Sema Sırma-Ekmekci, Neslihan Abacı, Çağrı Güleç, Duran Üstek

Genetik AD, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü,
İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

ÖZET

Kromatin İmmunopresipitasyon (ChIP) dizileme transkripsiyon faktörlerinin genom boyunca bağlanma bölgelerinin saptanması, histon modifikasyonları ve kromatin modifiye edici proteinlerin araştırılmasında kullanılabilir. Bu makalede bu uygulamalardan sadece transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin tespitinde ChIP dizileme yönteminin uygulanması tartışılacaktır. Transkripsiyon faktörlerinin genom boyunca bağlanma bölgelerinin saptanması, evrimin, embriyonik gelişimin ve hastalıkların gelişimine neden olan biyolojik süreçlerin altında yatan transkripsiyon düzenleyici ağların anlaşılması için son derece önemlidir. ChIP dizileme metodunda bir transkripsiyon faktörünün bağlandığı DNA parçacıkları ChIP ile elde edilir ve yüksek verimli (high-throughput) dizileme uygulanarak dizilenir. Son yıllarda geliştirilmiş olan ChIP dizileme yönteminin önceki yöntemlere göre birçok avantajı bulunmasına rağmen hala çözülmesi gereken bazı zorluklar vardır. Bu makalede bu zorluklardan ve uygulanması gereken stratejilerden bahsedilecektir.

Anahtar kelimeler: ChIP dizileme, yeni nesil dizileme, transkripsiyon faktörleri bağlanma bölgeleri

ABSTRACT

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) sequencing is used in identifying transcription factor binding sites and in investigating histone modifications and chromatin modifying proteins. In this review, the focus is the use of ChIP sequencing to identify transcription factor binding sites is focused. Identification of genome-wide binding sites of transcription factors are highly important for understanding of transcriptional regulatory networks underlie biological process causing the development of diseases, evolution and embryonic development. In ChIP sequencing method, DNA fragments to which a transcription factor is binds is obtained from ChIP and are sequenced by using high-throughput sequencing. Although ChIP sequencing method has many advantages over the previous method, there are still challenges that are essential to solve. In this review, these challenges and the strategies that should be applied are discussed.

Keywords: ChIP-seq, ChIP-sequencing, next generation sequencing, transcription factor binding sites

ChIP dizileme yöntemi

ChIP dizileme, genom boyunca DNA protein etkileşimlerinin haritalanmasında kullanılan bir yöntemdir.

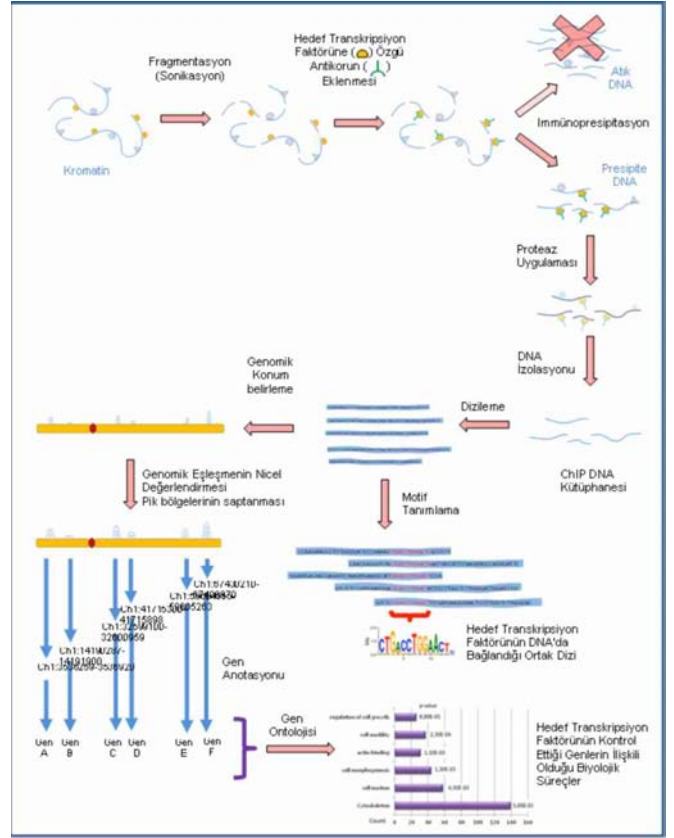
Transkripsiyon faktörlerinin genom boyunca bağlanma bölgelerinin analizi düzenleyici mekanizmaların anlaşılması ve yeni düzenleyici yolların bulunması için gereklidir. Ayrıca transkripsiyon faktörü bağlanma motiflerinin daha doğru olarak belirlenmesini ve bioinformatik analizlerde kullanılmak üzere bağlanma bölgelerinin tahmini için daha doğru ve çok fazla miktarda veri elde edilmektedir.

Kromatin immunopresipitasyon-Polimeraz zincir reaksiyonu (ChIP-PCR) yöntemi transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerini saptamada kullanılan eski bir yöntemdir. ChIP-PCR yönteminde belli bir bölgenin aday olarak belirlenmesi gerekmektedir. Transkripsiyon faktörünün bağlandığı tahmin edilen bölgeye ait dizi bilgisi gerektiğinden, incelenen transkripsiyon faktörünün ancak belli bir genin promotör bölgesine bağlanıp, bağlanmadığı test edilebilir. Microarray teknolojisinin geliştirilmesiyle “ChIP on Chip” yöntemi kullanılmaya başlanmıştır. Fakat “ChIP on Chip” yönteminde array çözünürlüğü kullanılan prolarla sınırlıdır ve hibridizasyon aşaması spesifik olmayan bağlanmalara neden olur (4,10). Daha yeni bir yöntem olan “ChIP-PET” (pair-end ditags) yöntemiyle de transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerini genom boyunca analiz etmek mümkündür (1). Fakat bu yöntemde hedef bölgeler Sanger dizileme ile analiz edildiğinden dolayı çok sayıda dizi analizi gerektirmektedir. Bu nedenle zor ve yüksek maliyetli bir yöntemdir. Son zamanlarda kullanılmaya başlanan yoğun paralel dizileme yöntemi ile tüm bu zorlukların aşılması mümkün olmaktadır. ChIP sonucu elde edilen kromatin materyalinin yüksek verimli paralel dizi analizi, ChIP-dizileme olarak adlandırılmış olup, ilk kez Solexa dizileme sistemi kullanılarak, uygulanmaya başlanmıştır (12). ChIP dizilemenin en önemli avantajı genom boyunca analize olanak vermesidir. “ChIP on Chip” deneylerinde çok fazla sayıda prob kullanılabilmesine rağmen, çok büyük olan memeli genomu için çok pahalıya mal olmaktadır (4). Ayrıca ChIP dizileme, “ChIP on Chip” yöntemine göre az miktarda DNA gerektirir (10ng) (10) ve az amplifikasyon yeterli olduğundan, PCR aşamasından kaynaklanan spesifik olmayan sonuçlar daha azdır.

Bütün bu avantajlarına rağmen, ChIP dizileme yöntemi bazı deneysel ve bioinformatik zorluklarından dolayı hala tam olarak olgunlaşmış bir teknoloji değildir (10).

Yöntemin Özeti

ChIP dizilemede, spesifik transkripsiyon faktörlerinin kromatinde bağlandığı DNA fragmentleri immunopresipitasyon ile elde edildikten sonra yeni nesil dizileme yöntemi ile dizilenir (Şekil 1).



Şekil 1. ChIP dizileme yönteminin şematik olarak anlatımı

Kromatin IP (ChIP) Yöntemi:

Fiksasyon: Hücreler formaldehitte muamele edilerek proteinlerin DNA'ya çapraz bağlanması (*crosslink*) sağlanır. Bu bağlanma, ilerleyen aşamalarda proteinlerin bağlı oldukları DNA'dan ayrılmalarını engellemek için gereklidir.

Fragmentasyon: Fiksasyondan sonra kromatin fragmentasyonu yapılır. Fragmentasyon sonikasyonla ya da enzimatik yolla yapılabilir. DNA fragmentlerinin çoğunun boyu 150-600bp arasında olmalıdır (5).

ChIP: Fragmentlere ayrılmış kromatin materyali incelenecek transkripsiyon faktörüne özgü antikör ile muamele edilir. Protein A veya G agaroz, sefaroze boncuklar veya son yıllarda geliştirilmiş olan magnetik boncuklar eklenerek, protein-DNA komplekslerinin antikörler aracılığıyla boncuklara bağlanması sağlanır. Yıkama işlemlerinden geçirilerek, antikörle bağlanmayan protein-DNA kompleksleri uzaklaştırılır. Antikörlere bağlanan DNA-protein komplekslerinden proteinler enzimatik olarak uzaklaştırılarak, serbest kalan DNA saflaştırılır.

Her ChIP reaksiyonunda spesifik antikörün yanı sıra negatif kontrol olarak IgG antikörü, pozitif kontrol hedef geni bilinen genel bir transkripsiyon faktörüne özgü antikör (RNA polimeraz

II antikor gibi) kullanılır. Negatif, pozitif ve hedef antikor ile elde edilen üç çeşit immünopresipite (IP) DNA ve fragmente edilmiş ancak her hangi bir antikor ile presipite edilmemiş DNA (input DNA, IN), ChIP işleminin düzgün gerçekleşip, gerçekleşmediğini anlamak için PCR ile test edilmelidir. PCR işlemi, pozitif kontrol transkripsiyon faktörünün hedefi olduğu bilinen bir genin promotörüne özgü primerlerle yapılır. Anti-IgG antikorunun kullanıldığı negatif kontrolden elde edilen IP DNA'sı ise, nonspesifik bağlanma olasılığını dışlamak için kullanılır. Tüm kontrollerin düzgün çalıştığı doğrulandıktan sonra dizileme işlemine geçilir.

Dizi Analizi

Dizileme protokolleri kullanılan cihazlara göre değişmektedir. Fakat genel olarak ortak olan basamaklar aşağıda bahsedilmektedir.

ChIP sonunda elde edilen DNA örneğinden öncelikle kütüphane hazırlanır. DNA parçalarının uçlarına adaptör diziler eklenir ve bu dizilere özgü primerler ile dizilenir. Bunun için aşağıdaki üç basamak uygulanır:

1. Kütüphane hazırlanması

DNA fragmentlerinin boyu ChIP reaksiyonu sonrası 150-600bp arasında olduğundan kütüphane hazırlanırken fragmentasyon yapılmaz. 10-100ng DNA örneği kullanılır (10). Kütüphane hazırlama kullanılan dizileme platformlarına göre farklılık göstermesine rağmen temel olarak uç tamiri, adaptör eklenmesi, jelde fragmentlerin büyüklüğüne göre ayrılması ve jelden saflaştırma basamaklarını içerir.

2. PCR

PCR işlemi, ChIP DNA fragmentlerinin uçlarına eklenmiş olan adaptörlere özgü primerlerle gerçekleştirilir. Fazla amplifikasyon spesifik sinyallerin kaybına neden olacağı için PCR reaksiyonunda çok amplifikasyon yapılmamalıdır.

3. Dizileme reaksiyonu

Kütüphaneler tek yönlü dizileme (single end sequencing) veya çift yönlü dizileme (paired end sequencing) ile dizilebilir. Her iki metod kullanılabilmesine rağmen çift yönlü dizileme stratejisinde her iki iplikten daha fazla ve doğru dizi bilgisi elde edildiği için yüksek örtüşme (coverage) oranı sağlanması ve tekrar bölgelerinin genomik konum tespitinin (alignment) daha iyi olması gibi bazı avantajları vardır (5).

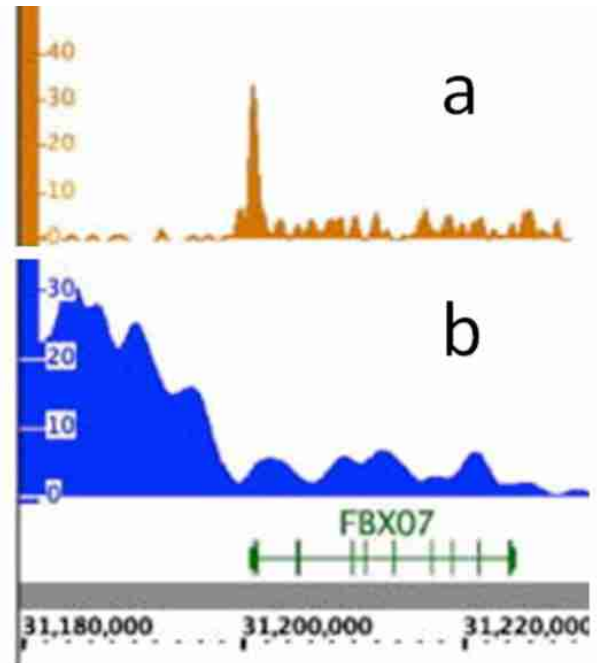
Bioinformatik Analiz

Veri analiz yazılımları piksel değerlerini ışımaya çeviren bir görüntüleme aracı (image-tool) ve ışımayı diziye çeviren baz dizisine dönüştürme aracını (base-calling tool) içerir. Baz dizisine dönüştürme sonrası potansiyel hataları düzeltmek, "de novo assembly" ve genomik konum tespitini kolaylaştırmak amacıyla alternatif yöntemler geliştirilmiştir. ChIP dizilemede ilk bioinformatik güçlük elde edilen okumaların kısa olmasından dolayı referans genoma haritalanması zorluğudur ve bu en

önemli basamaktır. Başarılı ChIP-dizileme deneyinde tipik olarak 2-20 milyon haritalanmış okuma oluşur (5, 8) ve bu dizilerin genomik konumunun doğru şekilde belirlenmesi en zor basamaktır.

ChIP dizileme verilerinden zenginleştirilmiş (enrichment) bölgeleri bulmak için pik çağırma (peak calling) araçları kullanılır. Bunun için birden fazla algoritma vardır. Aday piklerin belirlenmesinde en temel kriter arka plana (background) göre verdiği sinyallerdir. ChIP örneğinin sinyali ile kontrol (input DNA) örneğinin sinyali arasındaki oranın ölçülmesi pik'in doğrulanması için iyi bir yöntemdir fakat istatistiksel olarak yeterli değildir. 50 ChIP örneği ve 10 kontrol örneğinin karşılaştırmasından elde edilen sonuçlar 500 ChIP örneği 100 kontrol örneğinden elde edilen sonuçlardan istatistiksel olarak farklıdır (10).

Keskin ve geniş olmak üzere iki tip pik vardır (Şekil 2). Transkripsiyon faktörleri için genellikle keskin pik elde edilir ve bunların analizi için MACS (model-based analysis of ChIP-Seq data) gibi algoritmalar kullanılması daha uygun iken, histon modifikasyonları ve kromatin binding proteinlerden genellikle geniş pik elde edilir ve bunların analizi için SICER (spatial clustering approach for the identification of ChIP enriched regions) ve CCAT (control-based ChIP-Seq analysis tool) gibi programların kullanılması uygundur (Şekil 2) (5, 9).



Şekil 2. Keskin ve geniş piklerin görünümü. a. Keskin pikler, b. Geniş pikler
10. kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

Birden fazla bölgeye haritalanan okumalar (*multi-reads*) normal analizle atılır. Tekrar bölgelerine ait pikler bu şekilde atılmış olur.

Genomda çok sayıda bağlanma bölgesi olduğu durumda her bağlanma bölgesi için anlamlı derecede zenginleştirme elde etmek için dizilemenin çok sayıda olması gereklidir (deep sequencing). ChIP dizilemede diğer bir deneysel güçlük dizilemenin okuma derinliğini (*depth*) saptamaktır. Dizileme okuma derinliğini belirlemek için doyma noktasının (*saturation point*) bulunması lazımdır. Ne kadar çok sayıda okuma olursa olsun, belli bir okuma sayısından sonra bağlanma bölgelerinin sayısı kısıtlı kalır. Belli bir okuma sayısından sonra bağlanma bölgelerinin sayısı artık artmaz bu noktaya doyma noktası denir. Doyma noktası transkripsiyon faktörünün bağlandığı lokuslara bağlı olarak değişkenlik gösterir (5).

Zenginleştirilmiş bölgelerin saptanmasında da bazı güçlükler vardır. Örneğin genomda açık kromatin olduğu bölgeler fragmentasyona daha eğilimlidir, kopya sayısı mutasyonları ve polimorfizmler yanlış zenginleştirilmiş bölgelerinin elde edilmesine neden olur (3). Bunu önlemek için bazı algoritmalar geliştirilmiştir. QuEST ([www.http://mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/quest/](http://mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/quest/)) programında bu artefaktlarla gerçek bağlanma bölgelerinin ayrılması için dizilemenin yönü dikkate alınmıştır. Immunpresipite edilen DNA'nın her iki iplikten eşit oranda dizileneceği varsayılır. Bu durumda iki boynuzlu bir pik oluşur. Yalnızca bir yönde elde edilen pik artefakt olarak kabul edilir ve filtrelenir (11).

İki farklı hücre tipinde veya değişik koşullar altındaki iki hücrede histon modifikasyonu ve transkripsiyon faktörü hedef bölgeleri karşılaştırılacaksa aynı antikor kullanılsa bile background farklılık gösterebileceğinden normalizasyon yapılmalıdır. Bunun için DIME (*Differential identification using mixture ensemble*) yazılımı geliştirilmiştir. DIME iki koşuldaki ChIP reaksiyonunda zenginleştirilmiş bölgeleri kıyaslar (5). Bu gibi değişik pik çağırma algoritmaları ve yazılımları P değeri ve FDR (*false discovery rates*) hesaplarken farklı istatistiksel modeller kullanırlar (9).

ChIP dizilemede veri kalitesi iki metodun kombinasyonu ile belirlenir. Birinci metod uygun formata getirip “UCSC Genome Browser” ile ilgili bölgelerin analizi ve daha önce bildirilmiş hedeflerle kıyaslamadır. İkinci metod ise pik ya da zenginleştirilmiş bölgelerde dizi motiflerin araştırılmasıdır.

Aday pik bölgelerin belirlenmesinden sonra bağlanma motifleri çeşitli algoritmalarla belirlenebilir. En ideal sonuç istatistiksel olarak yüksek anlamlılık derecesine sahip tek bir motif saptamaktır. Fakat çoğunlukla birden fazla motif elde

edilir. Bu motiflerin doğrulanması için güvenilir bir bioinformatik metod olmadığından ancak deneysel olarak doğrulanabilir.

Yöntemi uygularken dikkat edilmesi gereken noktalar

ChIP-seq deneylerinin başarısını etkileyen faktörler

1. Kromatin fragmentasyonu: Fragmentasyon enzimatik yöntem veya sonikasyon olmak üzere iki şekilde yapılabilir. Enzimatik fragmentasyon micrococcal nükleaz ile yapılmaktadır. Histon modifikasyonu çalışmak için enzimatik yöntem tercih edilir. Transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerini saptamak için sonikasyon tercih edilmelidir. Çünkü mikroccal endonükleaz nükleozomların arasından hep belli bölgelerden kestiği için, transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesine denk geliyorsa bu bölgelerin saptanması mümkün olmayacaktır. Sonikasyon şiddeti ve uygulama süresinin her hücre tipi için optimize edilmesi gereklidir. Optimizasyon sırasında farklı sonikasyon koşullarında elde edilen fragment boyları agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmeli ve fragment boyu 150-600bp arasında olan sonikasyon koşulu seçilmelidir. DNA-protein çapraz bağlantılarını kıracağı için fazla sonikasyondan kaçınılmalıdır (5, 8)

2. Antikor: Antikorlarla ilgili iki temel problem ilgilenilen hedef'e zayıf reaktivite göstermesi veya DNA ile ilişkili diğer proteinlere çapraz-reaktivite göstermesidir. Ayrıca antikorum klonalitesi veya heterojenitesi de önemlidir. Monoklonal antikorlar proteindeki tek bir epitopu tanıdığından nonspesifik bağlanmaları azaltmak açısından yararlıdır fakat epitop kromatin ile veya başka proteinlerle maskelendiğinde düşük sinyal elde edilmesine neden olur. Bu açıdan poliklonal antikorların kullanılması yararlı olabilir. Fakat ChIP dizileme için en ideal olan eğer mevcut ise birden fazla antikor ile çalışmaktır. Bazı antikorlar sadece lokus'a özgü zenginleştirme yapabilir. ChIP PCR ile bu lokus amplifiye edilebildiği için antikor çalıştığı düşülmesine rağmen, başka lokuslar için zenginleştirme olmadığından ChIP dizileme için uygun değildir. Bir antikor bir kaç pozitif kontrol bölgesi için negatif kontrol bölgelerine göre 5 kattan daha fazla zenginleştirme gözleniyorsa ChIP dizileme için uygun olduğu söylenebilir (5). Antikorum spesifikliğini test etmenin en iyi yolu ise knockdown veya knockout modellerinde immunoblot analiz yapmaktır. Böylece spesifik olmayan bağlanmalar tespit edilebilir. Eğer immunoblot ile protein tespit ediliyorsa bu antikorum spesifik olmadığını, başka proteine bağlandığını gösterir (8).

Çalışılacak olan proteine özgü spesifik antikorum olmadığı durumlarda *epitop-tag* eklenen proteinler eksprese ettirilerek, iyi karakterize edilmiş *tag-spesifik* antikorlar kullanılabilir (2, 7). Fakat proteine eklenen tag'ın proteinin fonksiyonunu etkilememesi gerekir. (6, 7) Tag eklenmesinin proteinin bağlanma profilini değiştirip, değiştirmediği ise kesin olarak söylenemez.

Antikorun spesifikliği ve hassasiyetini belirlemek için ENCODE (*ENCyclopedia Of DNA Elements*) (<http://genome.ucsc.edu/encode/>) tarafından çalışma standartları ve kılavuzlar hazırlanmıştır. Bunun için immunoblot, immunofloresan analizleri yapılması gerektiği gibi daha ayrıntılı olarak hedef proteinin *knockdown* veya *knockout* modelleri ve immunofloresan sonrası kütle spektrometrisi, hedef protein veya hedef protein bir kompleksin yapısına katılıyorsa kompleksteki diğer üyelere spesifik antikorlarla immunopresipitasyon, *in vitro* yapılan bağlanma çalışmalarında belirlenen motiflerin doğrulanması ve eğer epitop-tag eklenen bir proteinle çalışılacaksa yine antikorun immunopresipitasyonla doğrulanması gereklidir. *ChIP-grade* olarak adlandırılan mevcut ticari antikorların hepsi ChIP dizileme için uygun olmayabilir. Test edilen 227 antikorun sadece 44'ü (%20) bu istenilen özellikleri karşılamıştır (8).

3. Kontrol: ChIP dizileme için önemli bir noktada uygun kontrolün belirlenmesidir. Kontrol olarak input DNA veya anti-IgG antikor ile elde edilen ChIP DNA'sı kullanılabilir. Anti-IgG antikor ile hedef transkripsiyon faktörüne özgü antikor aynı canlıdan elde edilmediği zaman spesifik olmayan bağlanmaları gidermek için anti-IgG antikor iyi bir kontrol olmayabilir (5).

Kromatin fragmentasyonunda açık kromatin bölgeleri daha kolay kırılır. Kromatinin yoğun olduğu bölgeler ise kırılmaya daha dirençlidir. Bu durum yüksek arka plan sinyali oluşumuna neden olur. Ayrıca DNA baz dizilimine bağlı olarak dizileme etkinlikleri her bölge için farklılık gösterebilir. Bu nedenlerden dolayı kontrol olarak input kullanımı daha uygundur. (8).

4. Tekrar örnekleri: Hücre kültürü şartları, ChIP ve kütüphane oluşturmadaki farklılıklar elde edilen bulgular arasında farklılıklar olmasına neden olabilir. Bioinformatik analiz bölümünde daha önce belirtildiği gibi örnek tekrar sayısı arttırıldığında elde edilen sonuçların değiştiği gösterilmiştir (10). Bu açıdan sonuçların doğruluğunu sağlamak için biyolojik tekrarların kullanılması son derece önemlidir.

ENCODE alışma standartlarında da en az iki biyolojik tekrar kullanılması gerektiği bildirilmiştir.

ChIP dizileme yöntemi ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar

alışmalar arasında örnek hazırlanması, sonuçların elde edilmesi ve işlenmesi konusunda pek çok farklılıklar vardır (10). Ayrıca ChIP sonucunda elde edilen bulgular o andaki o hücre tipindeki DNA-protein etkileşimlerini gösterir. DNA protein etkileşimleri dinamik bir süreç olduğundan tekrarında aynı sonuçlar bulunmayabilir.

ChIP dizilemenin standardizasyonu veri kalitesinin belirlenmesi çok sayıda çalışmadan elde edilen sonuçların

karşılaştırılması ve çoklu veri setleriyle bütünleştirici analizler yapılması için önemlidir. ENCODE ve modENCODE konsorsiyumları ChIP dizileme deneyleri için sürekli güncellenen kılavuzlar ve çalışma standartları geliştirmiştir. Hazırlanmış olan kılavuzlar antikor validasyonu, deneysel tekrarlar, dizilemenin okuma derinliği, veri kalitesi ile ilgilidir. ENCODE ve modENCODE konsorsiyumlarında 4 farklı organizmada (insan, fare, *C. elegans*, *D. melanogaster*) 100 den fazla hücre tipinde 140'dan fazla faktör ve histon modifikasyonu için 1000'den fazla ChIP dizileme deneyi yapılmıştır. Bütün veri setleri Encode (<http://encodeproject.org/ENCODE/>) ve modENCODE (<http://www.modencode.org/>) portallarinde kullanıma açık indirilip, görülebilir. Bu alışmalar sonucunda kılavuzlar, uygulamalar ve kalite ölçümleri geliştirilmiştir (8) Ayrıca ChIP dizileme ile elde edilen aday bölgelerin doğruluğu kantitatif PCR ile de kontrol edilmelidir.

Genom boyu transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin analizi transkripsiyon faktörlerinin iki genel tipi olduğunu desteklemektedir. Birinci tipi gene yakın bölgeye bağlanır ve genin ekspresyonunu düzenler. İkinci tipi ise genom boyu bağlanır ve bağlandığı bölgenin yakınındaki geni düzenlememektedir. Transkripsiyon faktörlerinin bütün bağlanmaları fonksiyonel değildir (13).

ChIP-dizileme bazı deneysel ve bioinformatik zorluklarından dolayı tam olgunlaşmış bir teknoloji değildir. Bu teknolojide özölmesi gereken birçok güçlük vardır. Bu zorluklardan biri de elde edilen piklerin aday genlerle ilişkilendirilmesidir. Bunun için araştırmacılar değişik parametreleri kullanmaktadır (örneğin transkripsiyon başlangıç bölgesine yakınlığı 20kb. içinde olanlar veya 10 kb. içinde olanlar veya transkripsiyon sonlanma noktasına yakınlığı 1kb içinde olanlar gibi) (13). Genlerin yoğun olduğu bölgelerde hangi genin aday olduğunu belirlemede zorluklar vardır. Tüm bu zorluklara rağmen ChIP dizileme birçok biyolojik sürecin ve hastalıkla ilişkili durumların özölmesinde büyük katkıları olacak bir metottur.

KAYNAKLAR:

1. Euskirchen GM, Rozowsky JS, Wei CL, Lee WH, Zhang ZD, Hartman S, Emanuelsson O, Stolc V, Weissman S, Gerstein MB, Ruan Y, Snyder M. Mapping of transcription factor binding regions in mammalian cells by ChIP: comparison of array- and sequencing-based technologies. *Genome Res.* 2007 17(6):898-909. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17568005>
2. Goldberg AD, Banaszynski LA, Noh KM, Lewis PW, Elsaesser SJ, Stadler S, Dewell S, Law M, Guo X, Li X, Wen D, Chappier A, DeKolver RC, Miller JC, Lee YL, Boydston EA, Holmes MC, Gregory PD, Grealley JM, Rafii S, Yang C, Scambler PJ, Garrick D, Gibbons RJ, Higgs DR, Cristea IM, Urnov FD, Zheng D, Allis CD. Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell.* 2010 Mar 5;140(5):678-91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20211137>
3. Hoffman BG, Jones SJ. Genome-wide identification of DNA-protein interactions using chromatin immunoprecipitation coupled with flow cell sequencing. *J Endocrinol.* 2009 Apr;201(1):1-13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19136617>
4. Kharchenko PV, Tolstorukov MY, Park PJ. Design and analysis of ChIP-seq experiments for DNA-binding proteins. *Nat Biotechnol.* 2008 Dec;26(12):1351-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19029915>
5. Kidder BL, Hu G ve Zhao K. ChIP-Seq: technical considerations for obtaining high-quality data. *Nature immunology* 12(10):918-922. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21934668>
6. Kim J, Chu J, Shen X, Wang J, Orkin SH. An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell.* 2008 Mar 21;132(6):1049-61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18358816>
7. Kolodziej KE, Pourfarzad F, de Boer E, Krpic S, Grosveld F, Strouboulis J. Optimal use of tandem biotin and V5 tags in ChIP assays. *BMC Mol Biol.* 2009;10:6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2644297/>
8. Landt SG, Mrinov GK, Kundaje A, Kheradpour P, Puli F et al. ChIP-seq guidelines and practices of the ENCODE and mod ENCODE consortia. *Genome research* 2012 1813-1831. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22955991>
9. Lui ET, Pott S, Huss M. Q and A: ChIP-seq Technologies and the study of gene regulation. *BMC Biology* 2010, 8:56. <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/8/56>
10. Park PJ. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nat Rev Genet.* 2009 Oct;10(10):669-80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19736561>
11. Pepke S, Wold B, Mortazavi A. Computation for ChIP-seq and RNA-seq studies. *Nat Methods.* 2009 Nov;6(11 Suppl):S22-32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19844228>
12. Smith AD, Xuan Z, Zhang MQ. Using quality scores and longer reads improves accuracy of Solexa read mapping. *BMC Bioinformatics.* 2008 Feb 28;9:128. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18307793>
13. Wederell ED, Bilenky M, Cullum R, Thiessen N, Dagpinar M, Delaney A, Varhol R, Zhao Y, Zeng T, Bernier B, Ingham M, Hirst M, Robertson G, Marra MA, Jones S, Hoodless PA. Global analysis of in vivo Foxa2-binding sites in mouse adult liver using massively parallel sequencing. *Nucleic Acids Res.* 2008, 36(14):4549-64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18611952>