

Genetikten Genombilime Geçişte Transkriptom Analizleri

Doç.Dr. Hilâl Özdağ
AÜ Biyoteknoloji Enstitüsü

Mammals

-  **Homo sapiens** [NCBI 35]
[browse](#) | [what's new](#) | [Vega](#)
-  **Pan troglodytes** [CHIMP1]
[browse](#) | [what's new](#)
-  **Macaca mulatta** [Mmul 0.1]
[browse](#) | [pre!](#) site
-  **Mus musculus** [NCBI m34]
[browse](#) | [what's new](#) | [Vega](#)
-  **Rattus norvegicus** [RGSC 3.4]
[browse](#) | [what's new](#)
-  **Canis familiaris** [CanFam1.0]
[browse](#) | [what's new](#) | [Vega](#)
-  **Bos taurus** [Btau 1.0]
[browse](#) | [what's new](#) | [pre!](#) [Btau 2.0]
-  **Monodelphis domestica** [MonDom2]
[browse](#) | [pre!](#) site

Other chordates

-  **Gallus gallus** [WASHUC1]
[browse](#) | [what's new](#)
-  **Xenopus tropicalis** [JGI 3]
[browse](#) | [what's new](#)
-  **Danio rerio** [WTSI Zv5]
[browse](#) | [what's new](#) | [Vega](#)
-  **Takifugu rubripes** [Fugu 2.0]
[browse](#) | [what's new](#)
-  **Tetraodon nigroviridis** [TETRAODON 7]
[browse](#) | [what's new](#)
-  **Ciona intestinalis** [JGI 1.95]
[browse](#) | [what's new](#)

Other eukaryotes

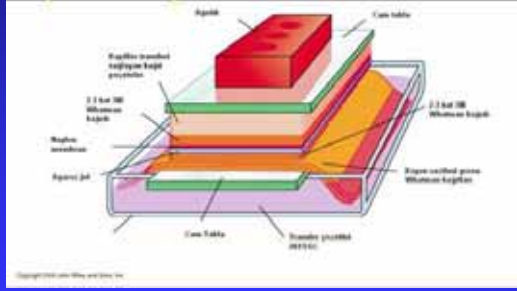
-  **Drosophila melanogaster** [BGDP 4]
[browse](#) | [what's new](#)
-  **Anopheles gambiae** [MOZ 2]
[browse](#) | [what's new](#)
-  **Apis mellifera** [Amel 2.0]
[browse](#) | [what's new](#)
-  **Caenorhabditis elegans** [WS140]
[browse](#) | [what's new](#)
-  **Saccharomyces cerevisiae** [SGcurrent]
[browse](#) | [what's new](#)



D N A'nın sabit ortama aktarımı

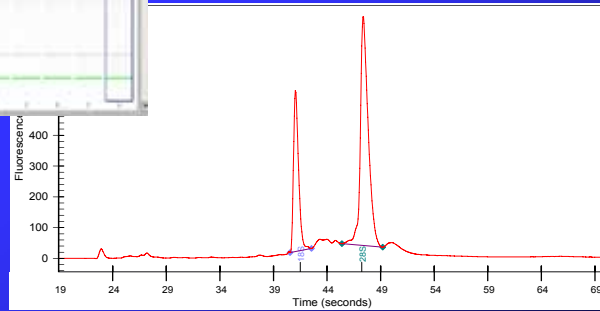
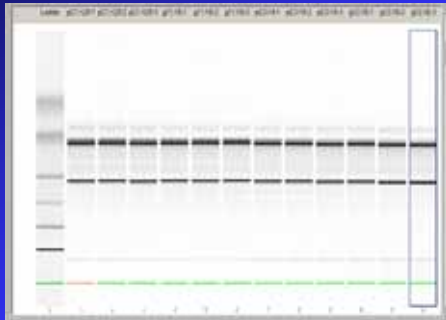
Southern Blot

(Edward M. Southern, 1975)



RNA

Nitelik ve Nicelik Tayini



mRNA Analiz Yöntemleri

- **Northern Blot (Tek gen analizi)**
- **RT-PCR (Tek gen analizi)**
- **Mikroarray (Genom boyunca analiz)**

NORTHERN BLOT

- **mRNA'lar boylarına göre jelde yürürler.**
- **mRNA'lar naylon membrana transfer edilir ve radyoaktif işaretli DNA probları ile hibridize edilir.**
- **İşlem hacmi düşük olan bu teknikte miktar tayini hassas değildir.**

RT-PCR

- Total veya polyA RNA üzerinden “reverse transcriptase” enzimi ile cDNA sentezlenir.
- Gen spesifik (ekzon) primerler ile PCR yapılır.
- Özellikle eş zamanlı PCR (Real Time PCR) cihazları ile yüksek hassasiyette miktar tayini yapılabilmektedir.
- İşlem hacmi northern blot’tan yüksek mikroarraylerden düşüktür.

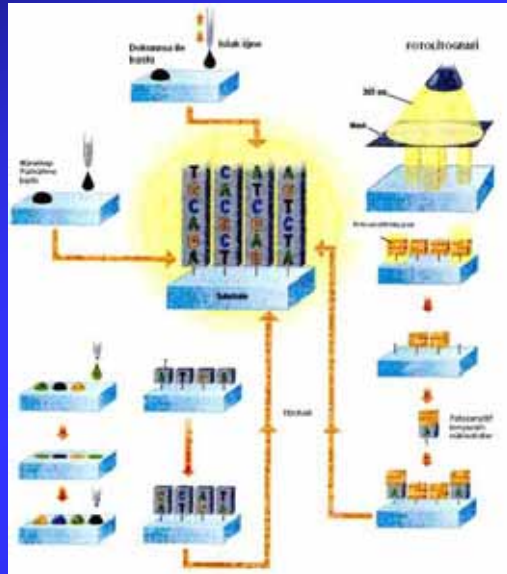
DNA Mikroarray DNA Mikrodizin

- **cDNA array:** 500-5000 bp uzunluğunda problemlerin cam yüzeylere basılması ile üretilir.
- **Oligo array:** 20-80 bp uzunluğundaki oligonükleotidlerin önce sentezlenip sonra çip yüzeyine immobilize edilmesi veya doğrudan çip üzerinde sentezlenmesi (fotolitografi) ile üretilir.

DNA Mikroarray DNA Mikrodizin

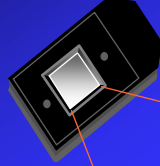
1) Prob (cDNA/oligo)	2) Cip üretimi (Probların cipe yerleştirilmesi)	3) Hedef (floresan işaretli örnek)	4) Deneç	5) Sonuç	6) Bilişim
oligonükleotid, cDNA	Fotolitografi, pipet, dokundurma, püskürtme (inkjet),	RNA, (mRNA⇒) cDNA	Hibridizasyon, yıkama, tarama	Floresans	İmaj işleme, WWW, biyobilişim, veri arama/tarama ve görüntüleme

DNA Mikroarray DNA Mikrodizin



Affymetrix

GeneChip Oligo Array

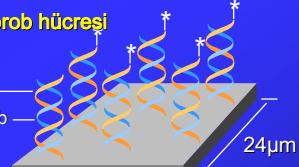


1.28cm

Hibridize olmuş oligo array'in görüntüsü

Hibridize olmuş prob hücresi

Tek zincirli, işaretlenmiş RNA hedef molekülü
Oligonükleotit prob



24µm

Özgül oligonükleotit probun milyonlarca kopyası

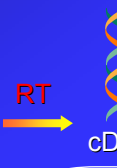
>200,000 farklı eşlenik prob

Affymetrix platformunda ifade analizi

polyA kontrolleri

Total RNA veya Poly (A)⁺ mRNA

AAAA



cDNA

Hedef örneğin hazırlanışı

İşaretli cRNA transkriptleri

bio bio bio bio

Fragment (Isı, Mg²⁺)

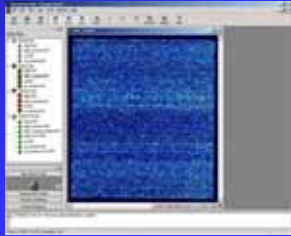
bio bio

bio

bio

İşaretli fragmentler

Hibridizasyon kontrolleri

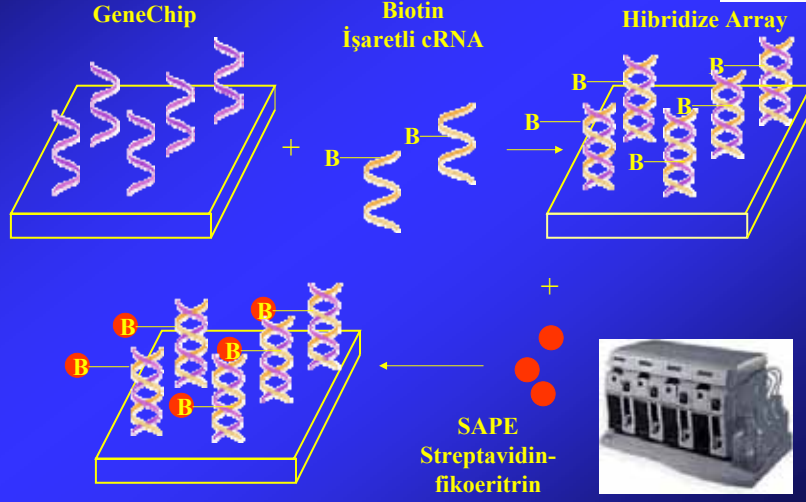


Tarama

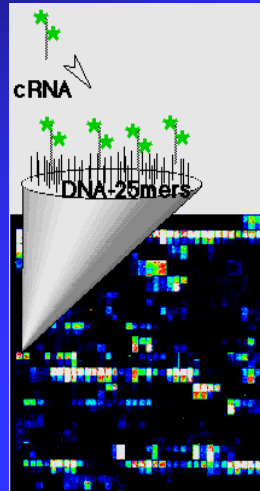
Yıkama & Boyama

Hibridize

Affymetrix platformunda hibridizasyon, boyama ve yıkama

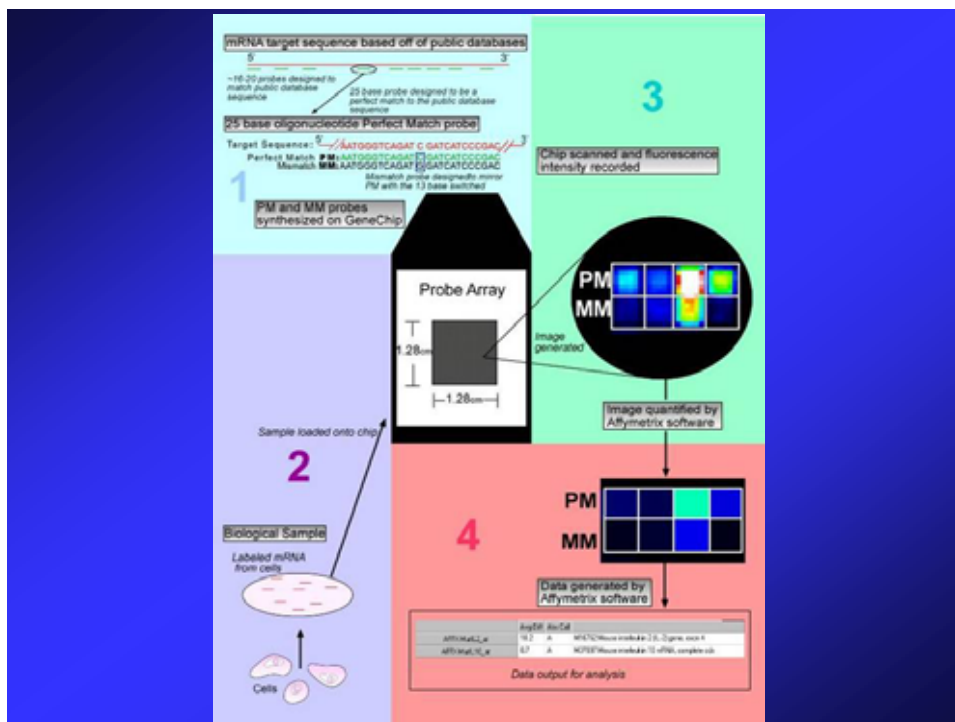
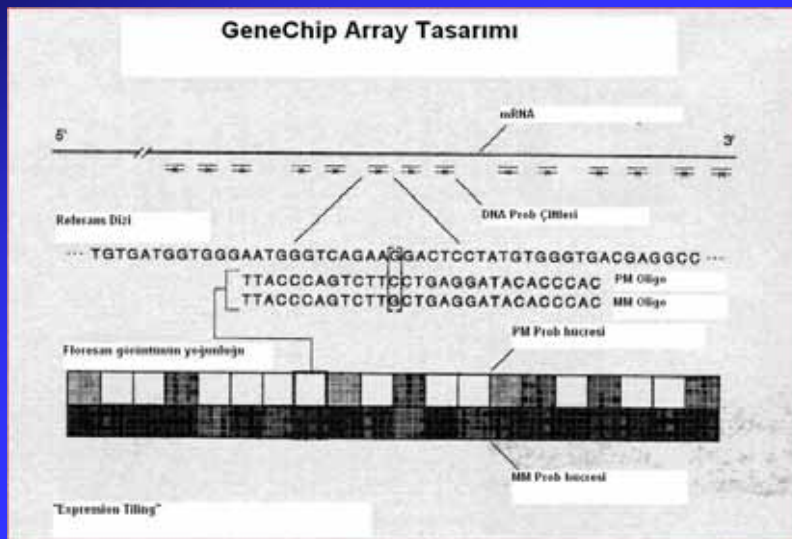


Affymetrix

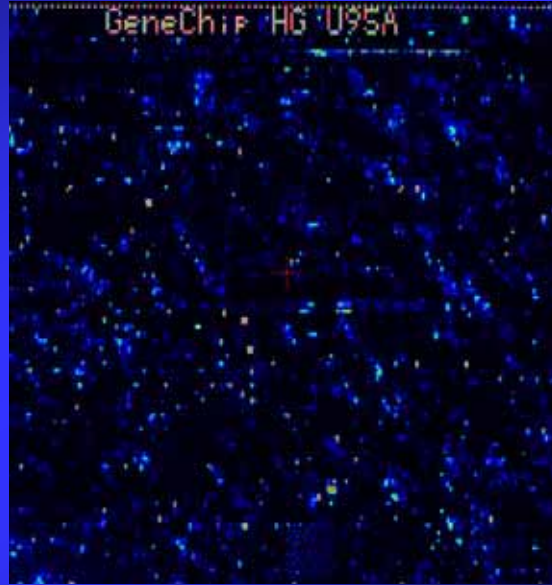


- Prob başına yaklaşık 100 piksel
- Bu sinyaller her bir prob hücresi için tek bir rakama indirgenir.
- Her bir gen 11-20 oligo tarafından temsil edilir.

Affymetrix

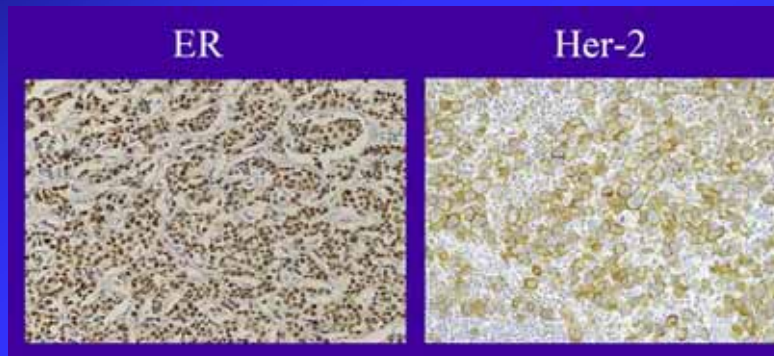


Affymetrix platformunda tarama



Kanserde Transkriptom Analizleri

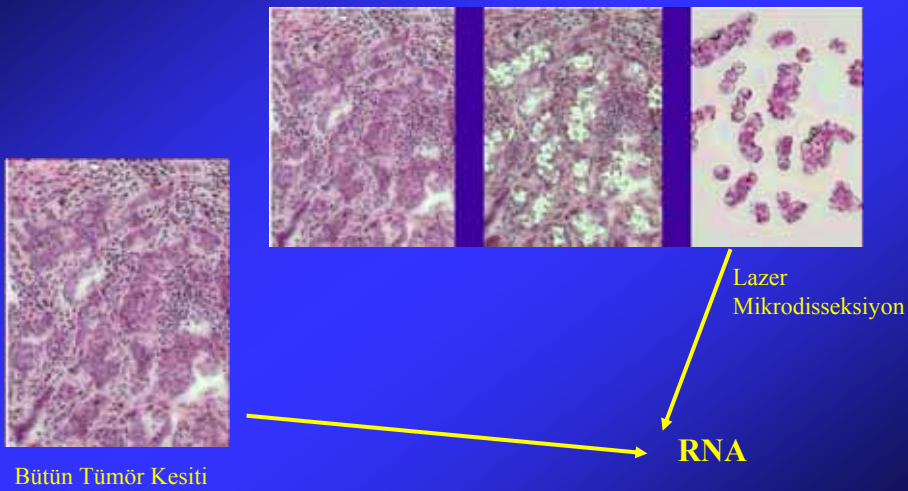
Klasik Moleküler Belirteçler



Kanserde Transkriptom Analizleri

- Klasik moleküler belirteçler kanser türlerinin doğru sınıflandırılmasında yetersiz kalmaktadır.
- ER varlığı tamoxifen tedavisine olumlu cevap için en güvenilir verilerden biri kabul edilmesine rağmen ER+ vakaların %30-40'ında tamoxifen etkisizdir veya tamoxifene karşı direnç gelişmektedir.

Kanserde Transkriptom Analizleri



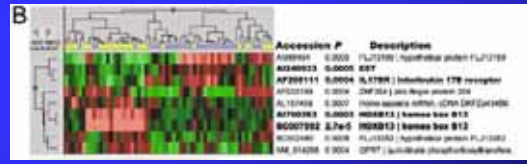
Kanserde Transkriptom Analizleri



Bütün Tümör Kesiti



Lazer Mikrodiseksiyon



A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen

Wang, Jun, et al. "Zinc-finger protein 707 and 705 predict clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen." *Nature* 415 (2002): 530-536. doi:10.1038/415530a.

CANCER CELL, JUNE 2004, VOL. 5, COPYRIGHT © 2004 CELL PRESS

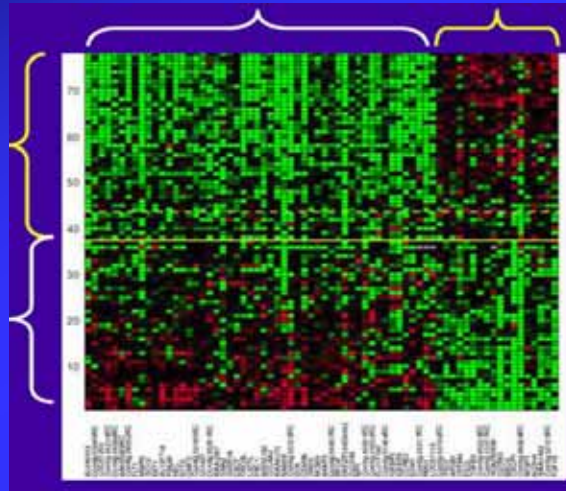
Kanserde Transkriptom Analizleri

Kötü prognoz ile korele genler

İyi prognoz ile korele genler

İyi prognoz ile korele hastalar

Kötü prognoz ile korele hastalar



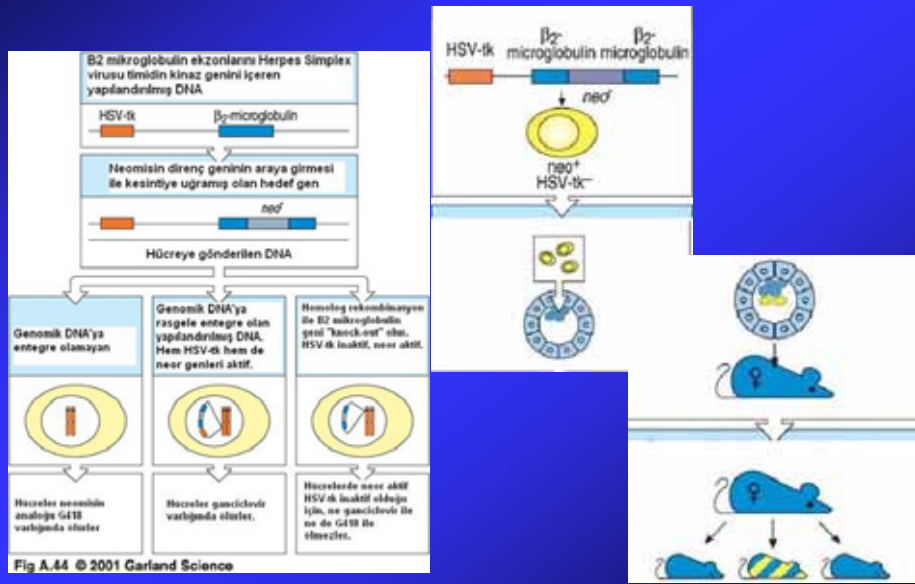
Van't veer et al, Nature 2002, 415: 530-536

Mikroarray kullanım amaçları

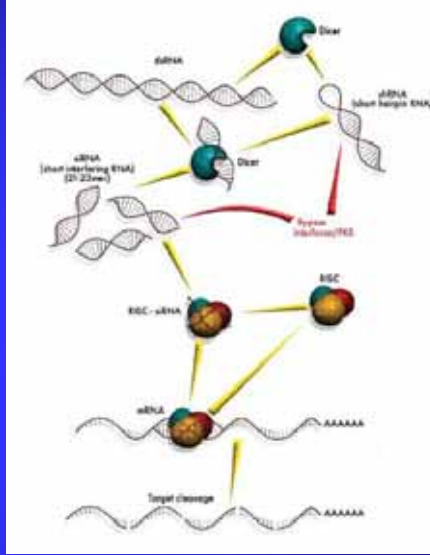
- **Hücre metabolizmasına global bakış**
 - Mikroarrayler vasıtasıyla bir hücreye yapılan bir uygulamanın hücreyi nasıl etkilediği hangi metabolik yolların uyarıldığı hangilerinin sustuğu uygulama öncesine göre kıyasla ortaya konabilir.
 - Benzer yaklaşımla hastalıkların metabolizme üzerine etkilerinin belirlenmesi ve tedavi için hedef moleküllerin saptanması amacı ile hasta ve kontrol gruplarında mikroarrayler ile global ifade analizleri yapılabilmektedir.
- **Tıbbi teşhis**
 - SNP mikroarraylerin de yardımı ile hastalığa veya hastalığa yatkınlığa neden olan genler saptanmaktadır.
 - 1999–6800 insan geni içeren bir mikroarray ile myeloid lösemi ile limfoblastik lösemi 50 adet ifade farklılığı gösteren gen yardımı ile birbirinden ayrıldı.
 - 2003- Meme kanseri altgruplarını saptayabilen 70 adet gen saptandı yapılan global transkriptom analizi ile.

Fonksiyonel Analiz

Genlerin Nakavt Edilmesi/Gene Knockout



Fonksiyonel Analiz siRNA



A.Ü Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı Fonksiyonel Genombilim Birimleri



**A.Ü Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez
Laboratuvarı
Genombilim Birimi**



**A.Ü Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez
Laboratuvarı
Proteombilim Birimi**



**A.Ü Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez
Laboratuvarı
Fonksiyonel Genomik Birimleri**



**<http://www.biotek.ankara.edu.tr/>
0312 2225826**