

# Moleküler Dizileme Teknolojileri

Dr. Güven Toksoy, PhD  
İstanbul Üniversitesi  
İstanbul Tıp Fakültesi  
Tıbbi Genetik AD

- Klasik dizileme
  - Sanger dizileme
  - Maxim Gilbert dizileme tekniği
- Yeni nesil dizileme teknolojileri

## 2. Nesil dizileme

**Illumina** (Reversible Dye Terminator)

**Ion Torrent** (native dNTP proton detection)

**Roche** (Pyrosequencing) (çekildi, teknoloji deđişikliđi ?)

**Solid ABI** (Ligation based) (çekildi)

## 3. Nesil dizileme (henüz rutinde yok 2-3 yıl)

**PacBio Real time sequencing** (*amplifikasyon gerekmiyor*)

**Helicos** (Reversible Dye Terminator) (*amplifikasyon gerekmiyor*)

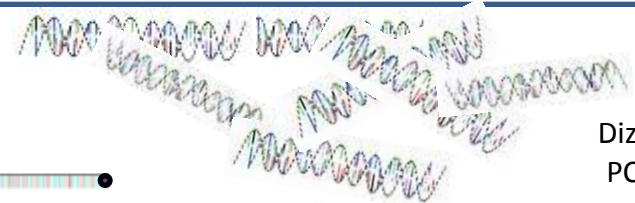
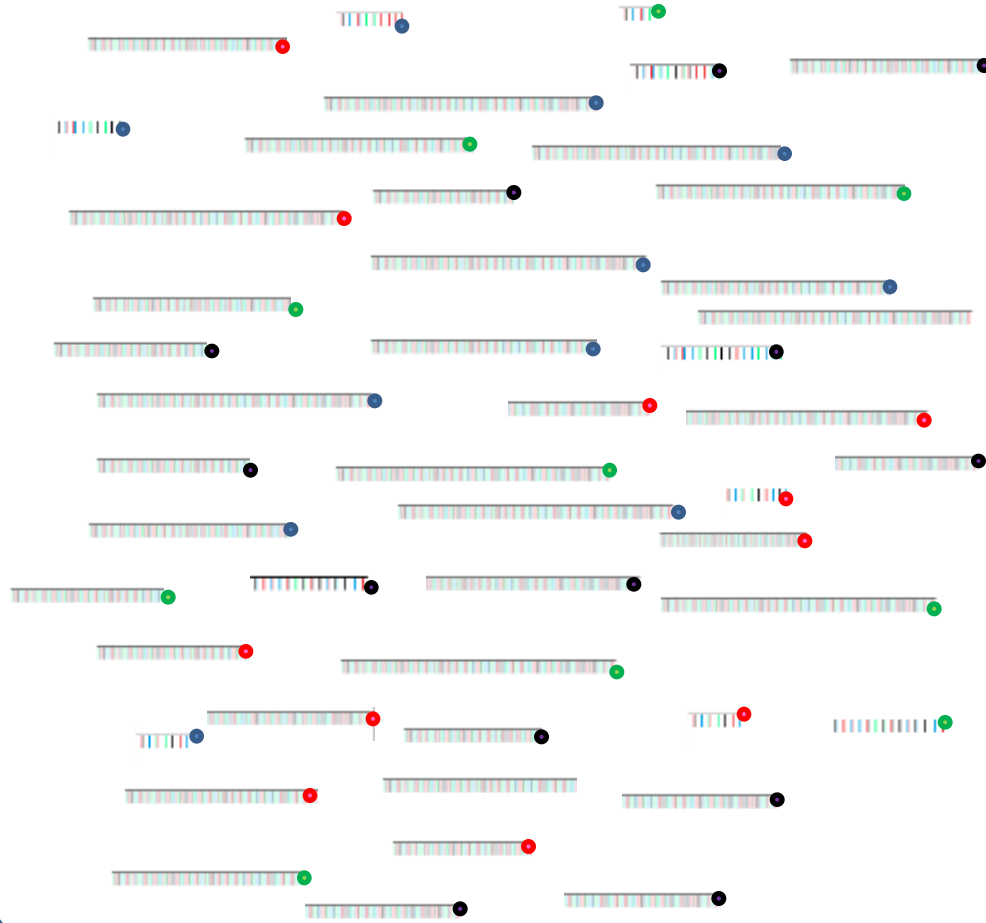
**Oxford Nanopore** (**porotic ion detection**) (*amplifikasyon gerekmiyor*)

# Karşılaştırma

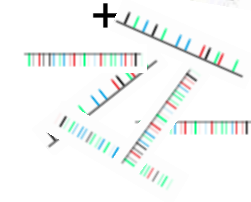
SANGER DİZİLEME	YENİ NESİL DİZİLEME (2. nesil)
Sınırlı büyüklük	Tüm genoma kadar
900-1000 bp	75-400 bp
Tüm dizi tek çıktı	Her bir hedef için çok kopya
Mozaiklik için yetersiz	Mozaiklik için uygun
Dizi başına ~5 USD (baz başına 5/1000USD)	Exom ~500 USD (500/30x10 <sup>3</sup> USD)
Motiften bağımsız yüksek özgünlük	Motife göre değişen özgünlük
Altyapı göreceli ucuz	Altyapı pahalı
Run maliyeti ucuz*	Run maliyeti pahalı*

# SANGER Dizileme

PCR



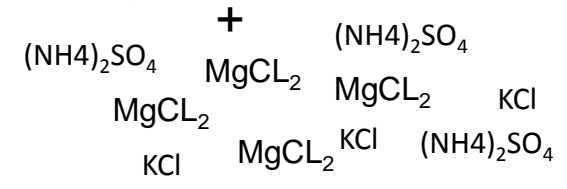
Dizilenecek PCR ürünü



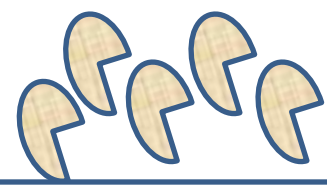
Dizilenecek hedef bölgeye uygun primer



İşaretili dNTP ve ddNTP karışımı



+



Polimeraz enzimi



# Yeni Nesil Dizileme

- Next generation sequencing (Yeni nesil dizileme)
- Deep sequencing (Derin dizileme)
- Massively parallel sequencing (Masif paralel dizileme)
- High-throughput sequencing (Yüksek kapasiteli dizileme)

## Second generation sequencing

**Illumina** (Reversible Dye Terminator)

**Roche** (Pyrosequencing) (??)

**Solid ABI** (Ligation based) (çekildi)

**Ion Torrent** (native dNTP proton detection)

## Third generation sequencing

**PacBio Real time sequencing** (*amplifikasyon gerekmiyor*)

**Helicos** (Reversible Dye Terminator) (*amplifikasyon gerekmiyor*)

**Oxford Nanopore (porotic ion detection)** (*amplifikasyon gerekmiyor*)

# İş akışı

Kütüphane  
hazırlanması  
(Library preparation)

DNA örnekleri fragmente edilir (ya da hedef fragmanlar elde edilir), fragmanların ucuna platforma özgün adaptörler takılır  
PCR ile amplifiye edilir (platforma spesifik ortamda)

Dizileme  
(Sequencing)

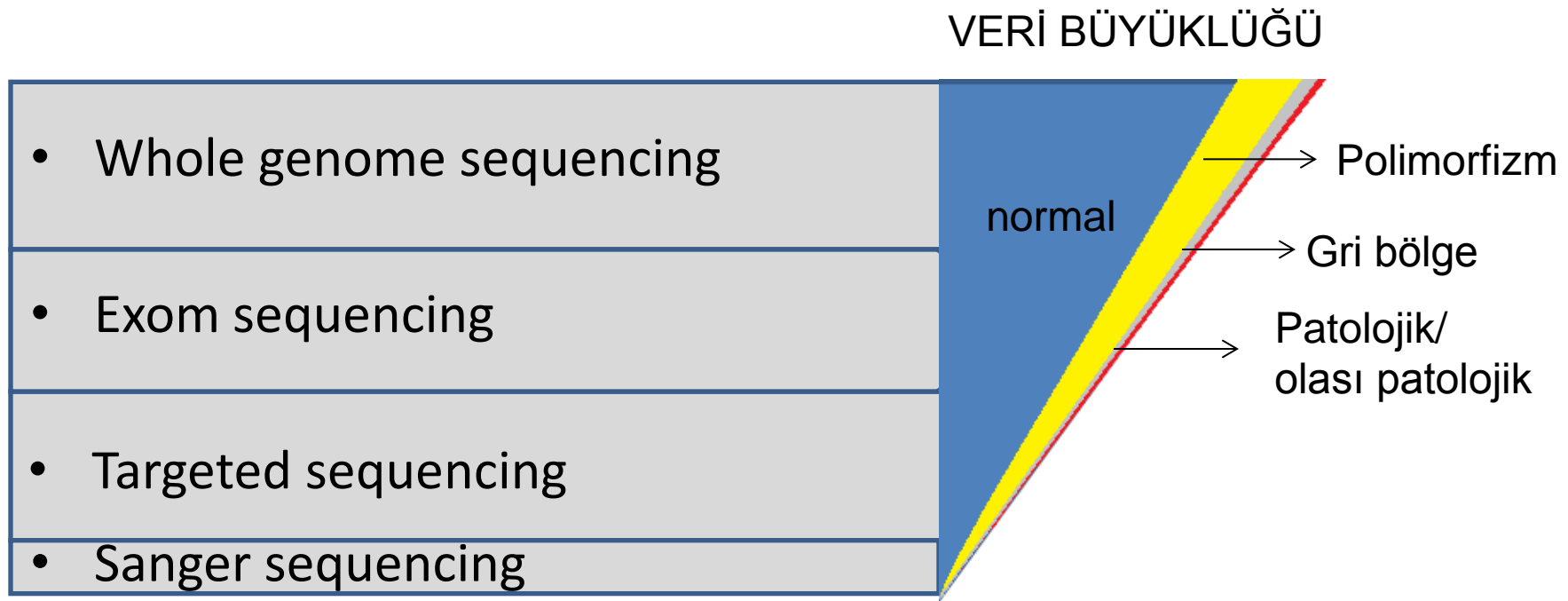
Yeni nesil dizilemede DNA sentezi ve okuma işlemi aynı anda gerçekleşir ve eşzamanlı olarak bir çok dizileme yapılır (Massively parallel sequencing)  
(kısa okuma ve hatalı okumanın ana nedeni de bu işlem sırasındaki desenkronizasyondur)

Veri analizi  
(Data analysis)

RAW data analizi, dizilerin filtrelenmesi, assambling, varyasyon analizi, biyoinformatik analiz

# Terimler

- De novo sequencing
- Resequencing
- Targeted sequencing
- Shotgun Targeted sequencing

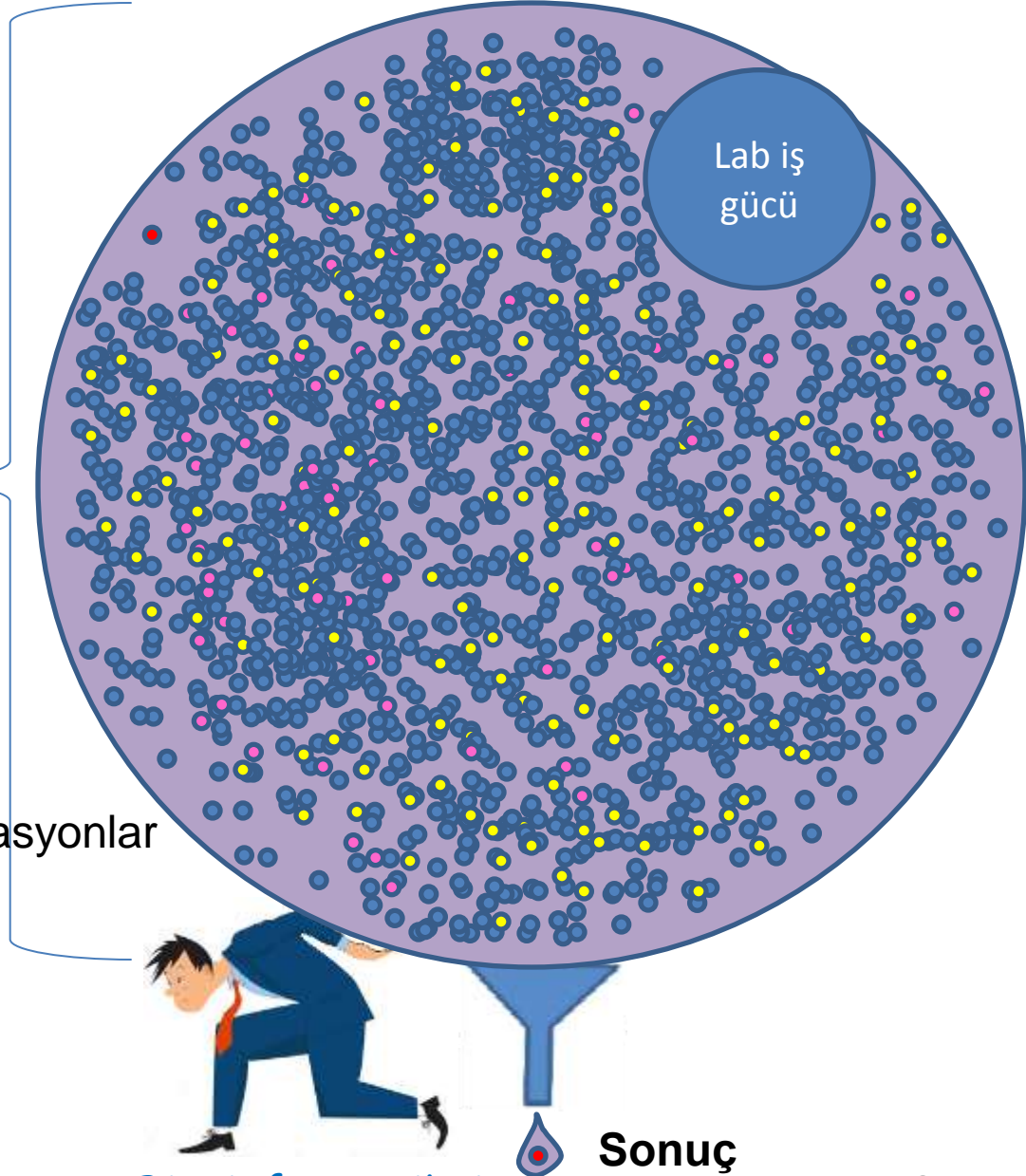




# Yeni nesil dizileme ile tanı

İşlem sonrası  
Elde edilen bilgi

- → Normal diziler
- → Nadir/de novo varyasyonlar ya da etkisi bilinmeyen mutasyonlar
- → Polimorfizm
- → Fenotip ilişkili mutasyon



Biyoinformatikçi

Sonuç

# Yeni nesil dizileme ve cfDNA çalışmaları

# cfDNA ile anöplodi taraması

FİRMA-MARKA	PLATFORM	ANALİZ TEKNİĞİ ve ALGORİTMA
BGI:NIFTY	Illumina Hiseq& İon proton	MPSS
SEQUENOIM: Materni T21Plus	Illumina Illumina Hiseq	t-MPSS
Verinata Health: Verifi Prenatal test	Illumina Hiseq	S-MPSS
Integrated Genetics: Ariosa: Harmony	Illumina Hiseq	DANSR + FORTE (t-MPSS)
Natera:Panorama	Illumina Hiseq	Non kantatif - SNP tabanlı targeted dizileme ~20.000 SNP
Premaitha healt: Iona test (2015 ocak)	İon proton	S-MPSS + Fetal fraksiyon düzeltmesi

MPSS:Massively parallel signature sequencing

FORTE:Fetal-fraction Optimized Risk of Trisomy Evaluation

NIFTY, Natera ve Sequenom Digeorge ve diğer mikro del/dup sendromları için sonuç veriyor.

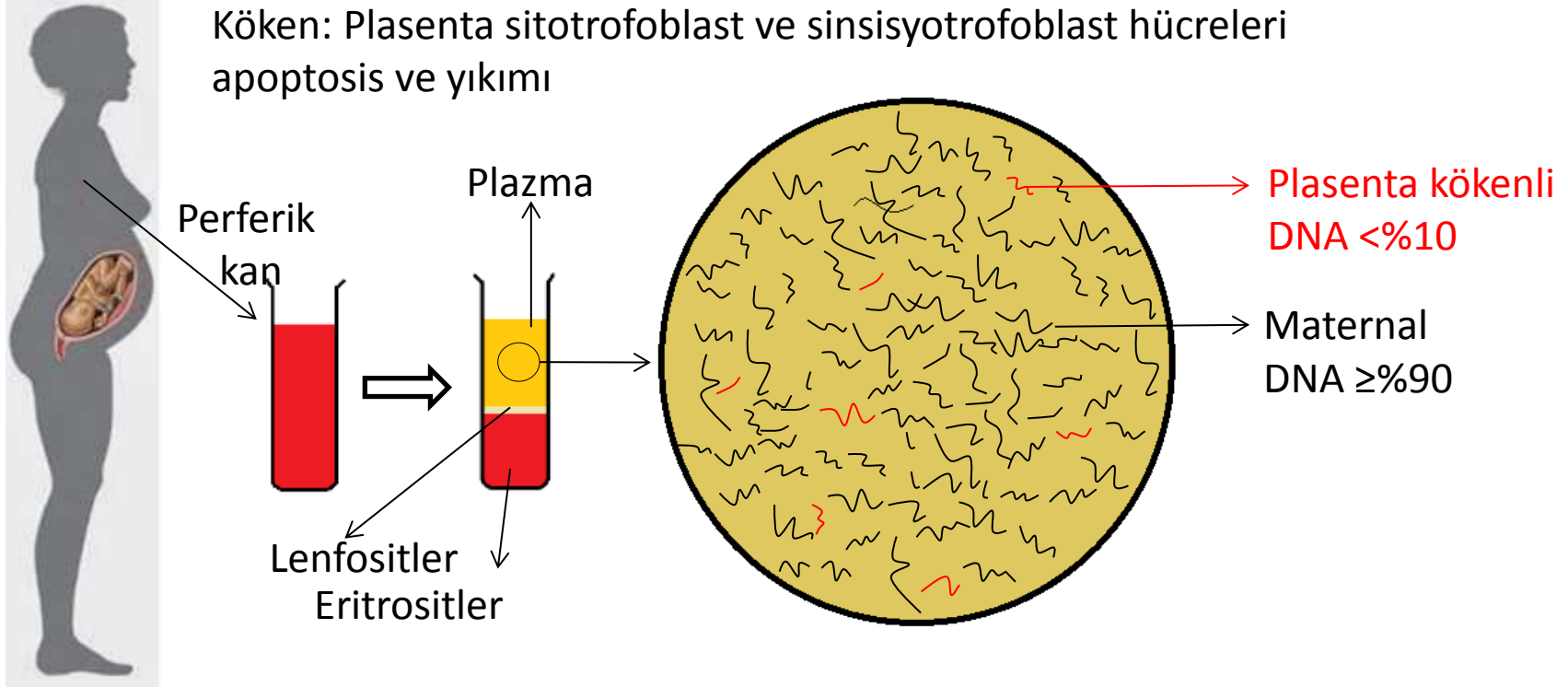
# Sayılar

- 10 milyon adet 25-30 bp uzunlukta dizi elde edildiğinde total genomun yaklaşık %4 ü dizilenmiş oluyor. Bunlardan %50 si unique dizi. Chr13 için ~154.000, chr18 135.000 ve chr21 için 65.700 dizi haritalanabiliyor. *(H. Christina Fan, PNAS, October 2008)*
- Trizomi21 li fetus taşıyan gebelikte örnekten 10.800.000. okuma elde edilirken sadece bu okunan dizilerden 21. kromozoma ait 32 000 tanesi (%0,3) anöploidi hesaplamasında kullanılabilir *(Chiu RW, Proc Natl Acad Sci USA 2008)*
- Fetal plasental DNA fraksiyonu kromozomal dozun hesaplanmasında çok önemli ve spesifiteyi arttırıyor.21. Kromozoma ait %4 oranında DNA taşıyorsa bunun trizomi durumunda %2 artış beklenmelidir. Yüksek güvenilirlik için yaklaşık 93.000 adet 21. kromozoma ait dizinin elde edilmesi gerekir. Bu da 21. kromozom DNA yükü total genomun % 1,5 olduğu için toplam okunabilir dizi sayısının minimum 6.3 milyon, ortalama MPSS verimi %25 olduğundan yaklaşık örnek başına toplam 25.000.000 okuma yapmak gerekmektedir. *(Andrew B. Sparks, P APRIL American Journal of Obstetrics & Gynecology, 2012)*
- Targeted SNP çalışmalarında yaklaşık 25.000 yüksek polimorfizm gösteren SNP bölgesi taranıyor.

# cfDNA

Plazmada serbest DNA fragmanları  $\leq 300\text{bp}$

Köken: Plasenta sitotrofoblast ve sinsisyotrofoblast hücreleri  
apoptosis ve yıkımı

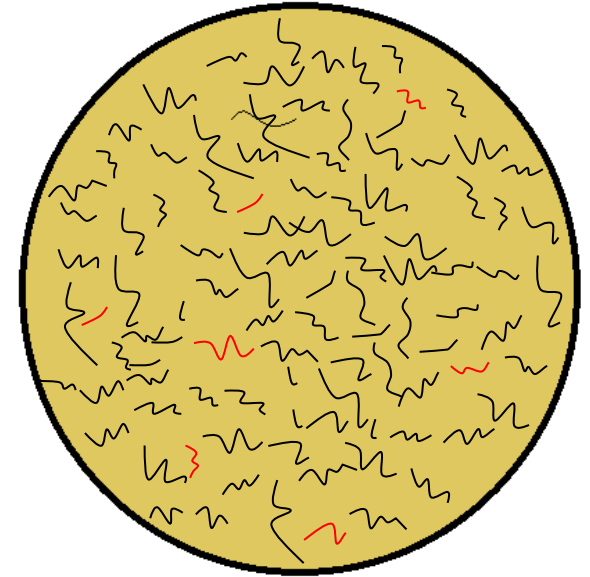
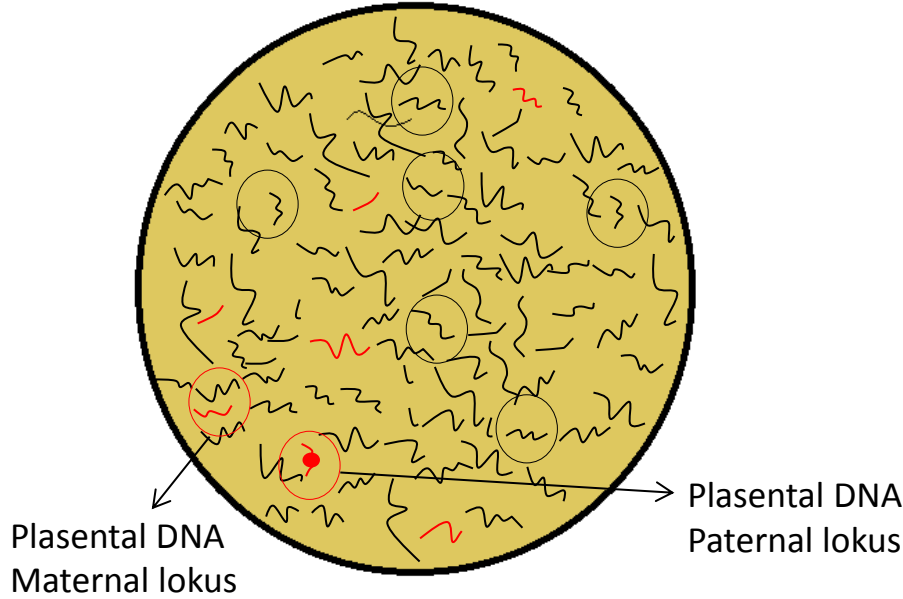


- İnsan genomu  $\sim 3$  milyar baz uzunluğunda
- Rastgele kırılmış halde milyonlarca küçük fragman
- chr13 %3,7; chr18 %2,5 chr21 %1.5' ini oluşturuyor
- Plasental DNA parçacıkları total havuzda fraksiyon %10 ise  
**chr13 % 0,37; chr18 %0,25; chr21 %0,15**

# cfDNA nın yeni nesil dizilemede kullanımı

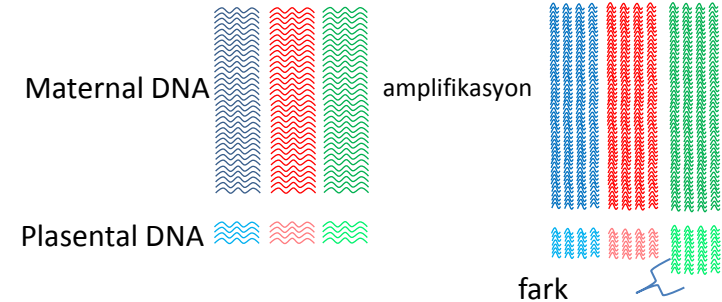
Kalitatif: Plasental DNA dan elde edilen baba kökenli dizide anneden farklı baz değişiminin gösterilmesi

Kantitatif: Amplifikasyon sonrası karşılaştırmalı ürün artışının saptanması



Maternal DNA

```
G A C T A G A A G C G T G T A G T C A T T G C A T C G A
G A C T A G A A G C G T G T A G T C A T T G C A T C G A
G A C T A G A A G C G T G T A G T C A T T G C A T C G A
G A C T A G A A G C G T G T A G T C A T T G C A T C G A
G A C T A G A A G C G T G T A G T C A T T G C A T C G A
G A C T A G A A G C G T G T A G T C A T T G C A T C G A
G A C T A G A A G C G T G T A G T C A T T G C A T C G A
G A C T A G A A G C G T G T A G T C A T T G C A T C G A
Plasental DNA Mat G A C T A G A A G C G T G T A G T C A T T G C A T C G A
Plasental DNA Pat G A C T A G A A G C G T G T C G T C A T T G C A T C G A
G A C T A G A A G C G T G T C G T C A T T G C A T C G A
```



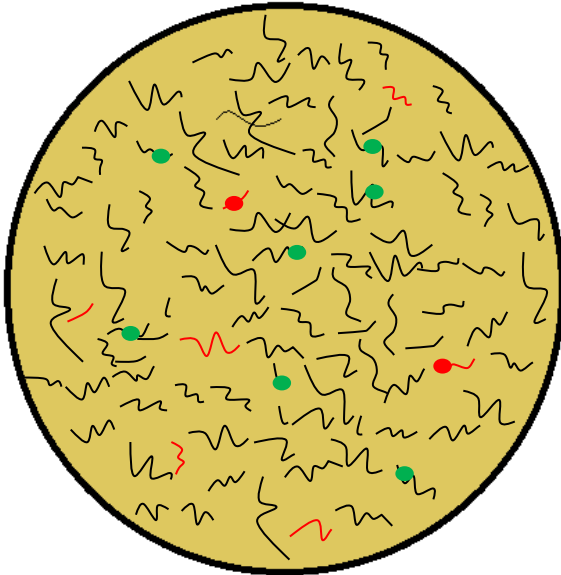
# cfDNA da plasental DNA nın saptanması

- Y kökenli dizilerin total DNA havuzuna oranı
- SNP farklılıklarının saptanması

SNP : Genomda bulunan ve fenotipi etkilemeyen kısa baz değişiklikleridir. Toplumda değişik sıklıklarda saptanan SNP ler vardır. Genomda şimdilik bilinen SNP sayısı >70.000.000

**ATGCTAGGAGGTGATTTCCCCAATGCGGCAGATACAGTAG**

**ATGCTAGGAGGTGATTTCAACCAATGCGGCAGATACAGTAG**



GTGATTTCCCCAATGCGGCAGATACAGTAG  
CTAGGAGGTGATTTCCCCAATGCGGCAGAT  
GGAGGTGATTTCCCCAATGCGGCAGATACAGTAG  
GCTAGGAGGTGATTTCCCCAATGCGGCAGATACAG  
ATGCTAGGAGGTGATTTCCCCAATGCGGCAGATACAGTAG  
TAGGAGGTGATTTCCCCAATGCGG  
GGTGATTTCCCCAATGCGGCAGATACAGTAG  
AGGAGGTGATTTCCCCAATGCGGCAGATA  
GGAGGTGATTTCCCCAATGCGGCAGATACAGTAG  
ATGCTAGGAGGTGATTTCCCCAATGCGGC  
TTTCCCCAATGCGGCAGATACAGTAG  
AGGAGGTGATTTCCCCAAT

%92

ATGCTAGGAGGTGATTTCCCCAATGCG  
ATGCTAGGAGGTGATTTCAACCAATGCGGCA  
ATGCTAGGAGGTGATTTCAACCAATGCGGC

%8

ATGCTAGGAGGTGATTTCAACCAATGCGGCAGAT

!!! Aynı yöntem nokta mutasyonları ve Rh analizlerinde de kullanılmaktadır.





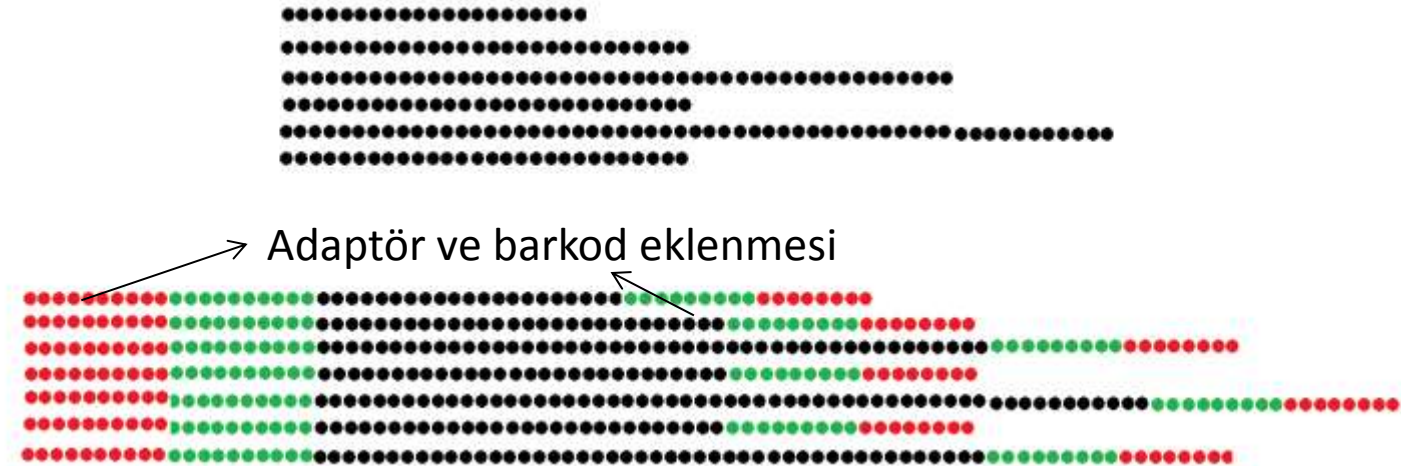
## Örnek alımı

- Maternal periferik kan ~10 ml
- standard EDTA içeren tüp (~8 saat)
- Özel CF DNA örnekleme tüpü (14 gün oda ısısı)  
(Streck Cellfree DNA BCT CE)

# Genel Protokol

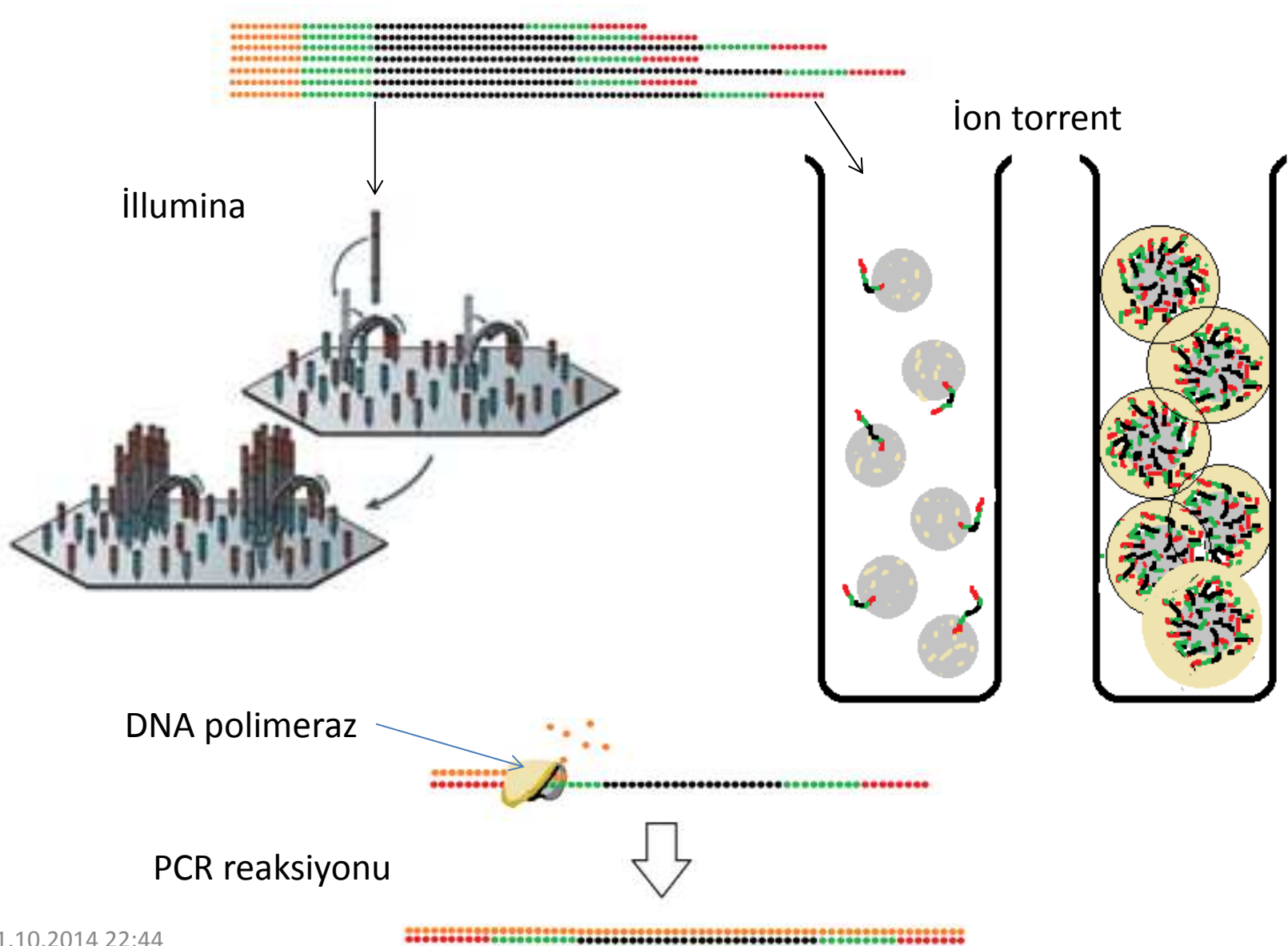
- Library preparation
- Cluster generation / Clonal amplification
- Massively parallel sequencing
- Mapping reads (Alignment)
- Quantifying reads
- Interpreting data
- Reporting

- Library preparation

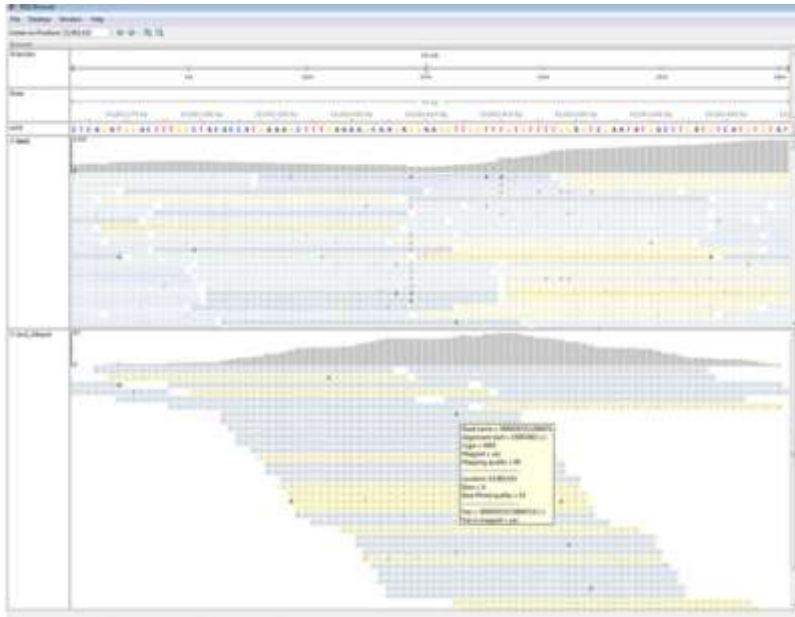
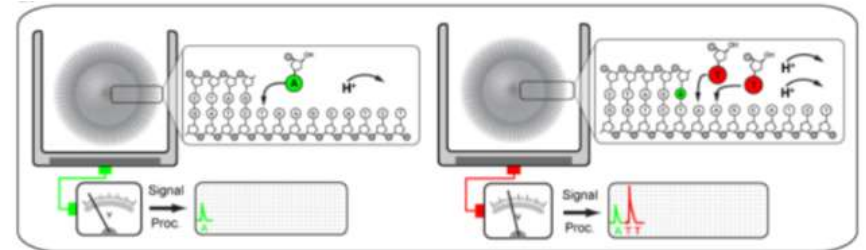
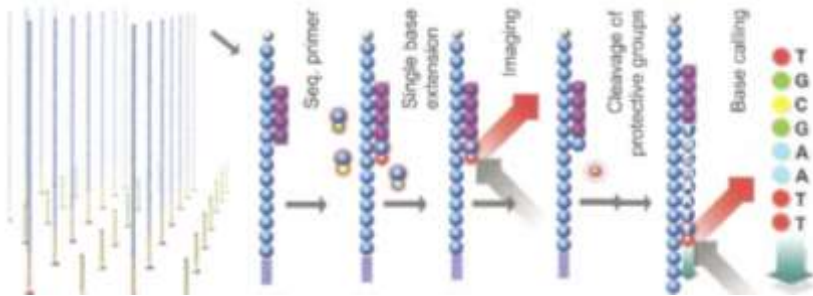


- Adaptör DNA'nın tutunmasını sağlar ve amplifikasyon sırasında primer görevi yapar.
- Barkod aynı çalışmada çalışılan örneklerin birbirinden ayrılmasını sağlar

- Cluster generation / Clonal amplification



- Massively parallel sequencing



Ion torrent

# Kantitatif Yöntem; Fetus NORMAL

Anne 46 kromozom + fetus 46 kromozom

Başlangıçtaki DNA Havuzu



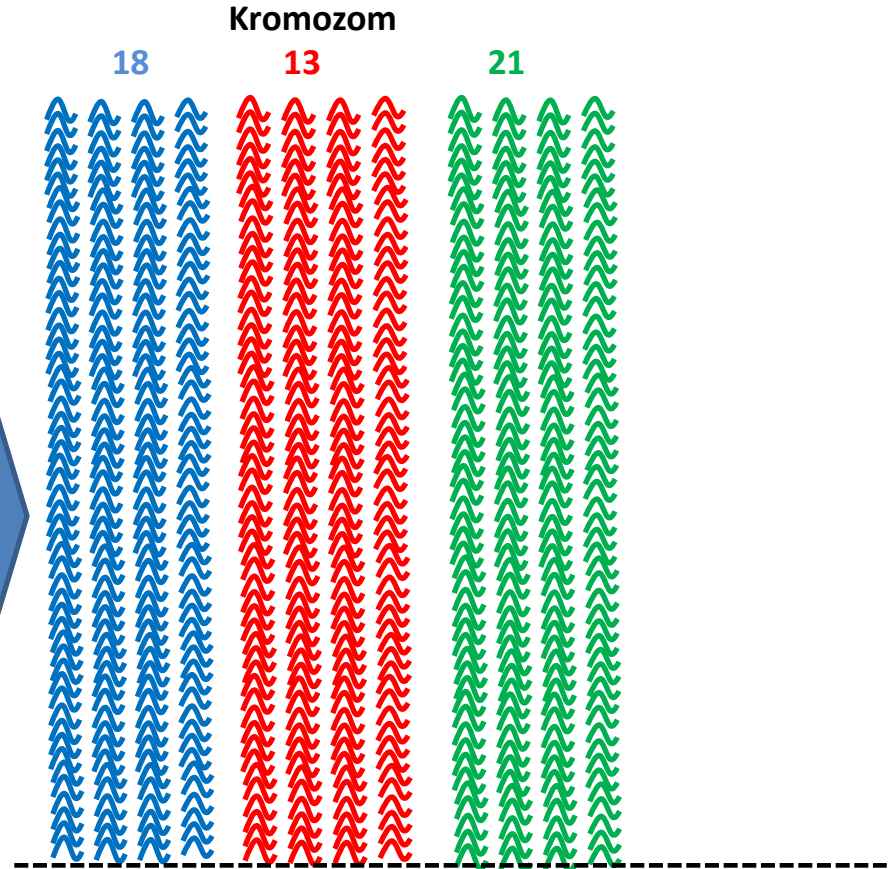
1 : 1 : 1

Fetusa ait DNA fragmanları

Anne ye ait DNA fragmanları

Yeni nesil dizileme ile amplifikasyon

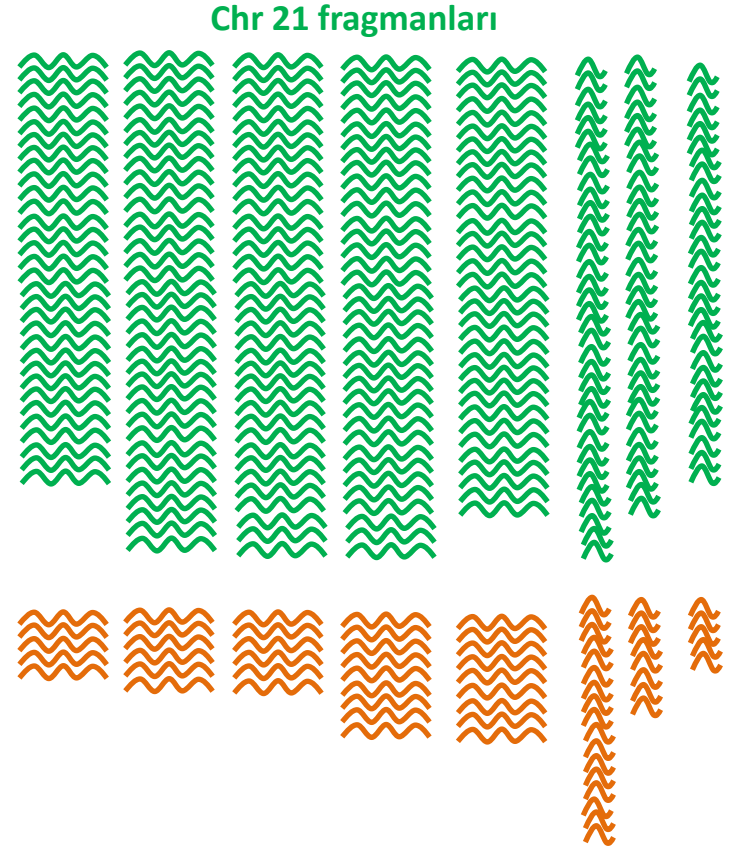
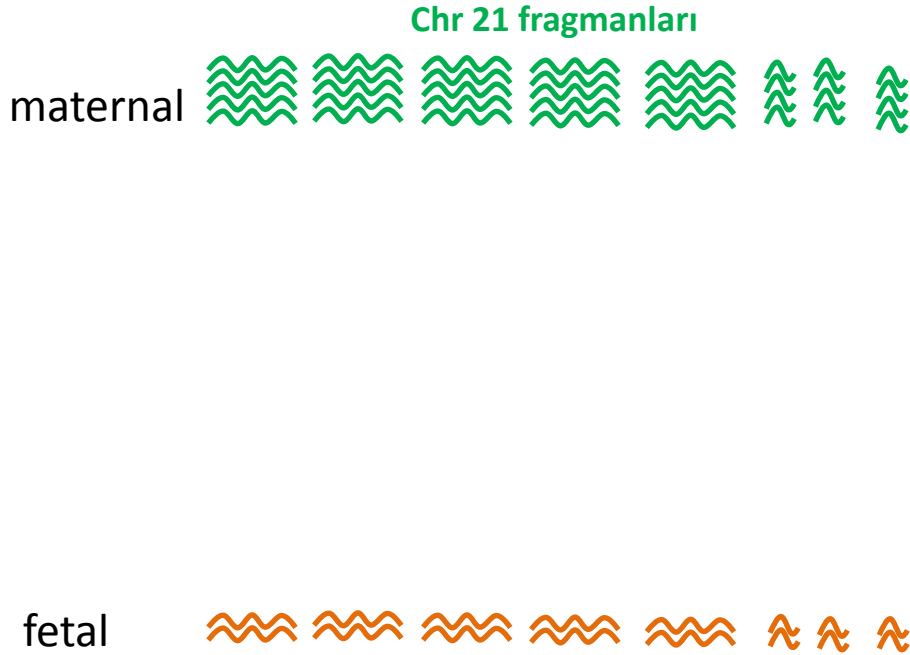
Amplifikasyon sonrası DNA Havuzu



# Kantitatif Yöntem

Amplifikasyon öncesi DNA Havuzu

Amplifikasyon sonrası DNA Havuzu



Aynı kromozomun  
fragmanlarında farklı oranlarda  
artış?

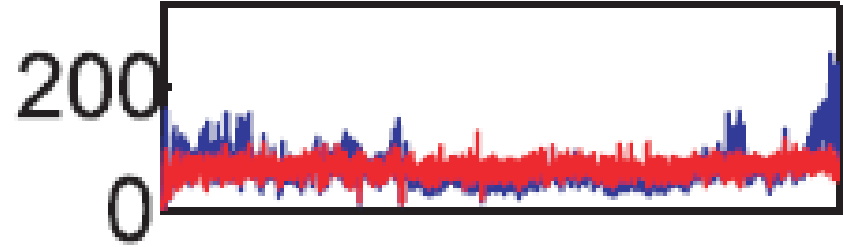
DNA baz dizilimi ve CG zenginliğine göre amplifikasyon veriminin değişimi

- Mavi pikler CG zenginliği göz önüne alınmadan elde edilen sonuç
- Kırmızı pikler CG zenginliği dikkate alınarak normalizasyon yapılmış durum

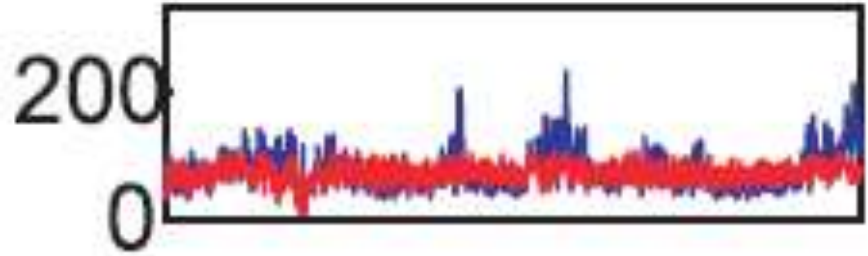
!!! **Problem** : Lokasyon (CNV varlığı) ve motife (CG/AT oranı) dayalı amplifikasyon farklılıkları dozun değişmesine yol açar!!

**Çözüm**: CG zenginliği paralel dizilerin kullanılarak normalizasyon yapılması ve stabil bölgelerin analize alınması

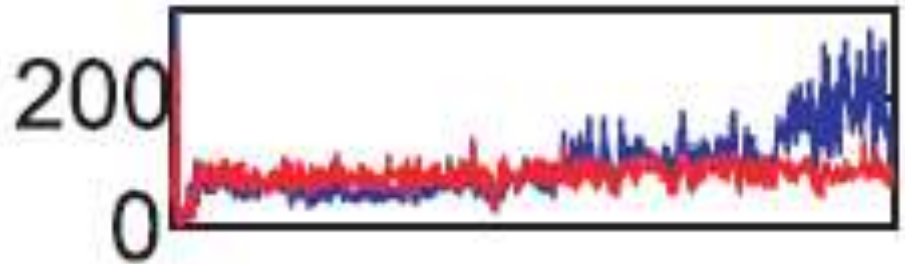
chr13



chr18



chr21



*H. Christina Fan, 2010*



# Kantitatif Yöntem; Fetus NORMAL

Anne 46 kromozom + fetus 46 kromozom

Başlangıçtaki DNA Havuzu



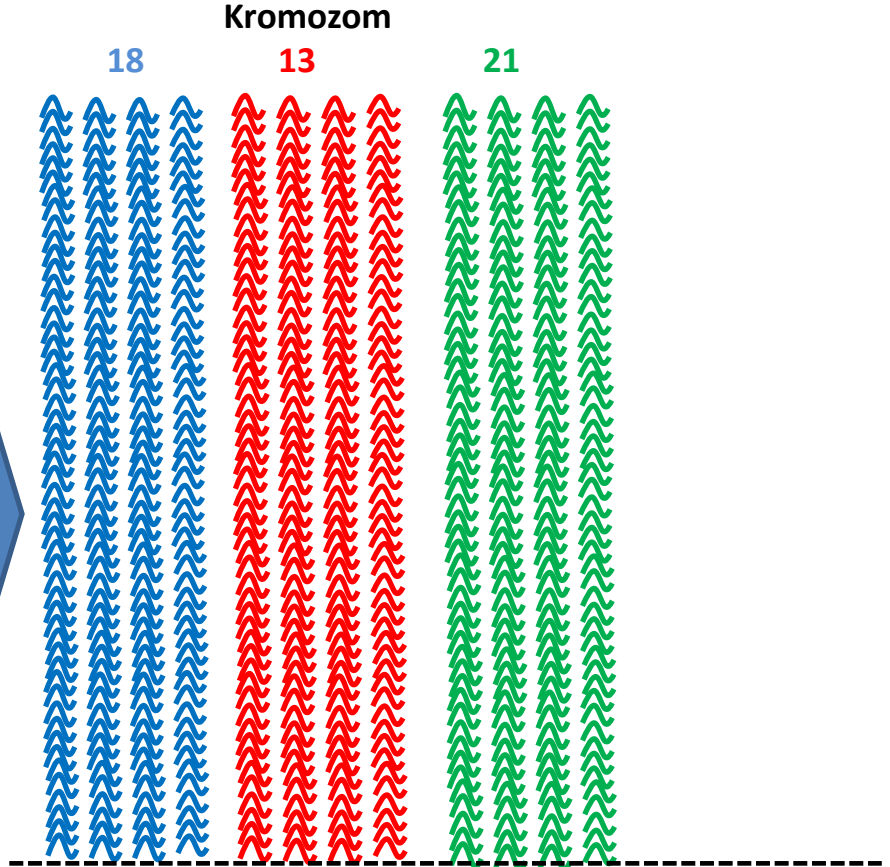
1 : 1 : 1

Fetusa ait DNA fragmanları

Anne ye ait DNA fragmanları

Yeni nesil dizileme ile amplifikasyon

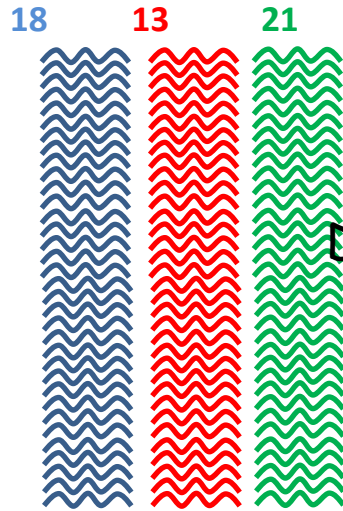
Amplifikasyon sonrası DNA Havuzu



# Kantitatif Yöntem; Fetus TRİZOMİK

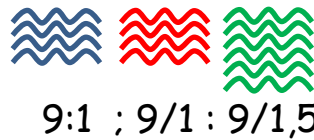
Anne 46 kromozom + fetus 47 kromozom (47,+21)

Başlangıçtaki DNA Havuzu

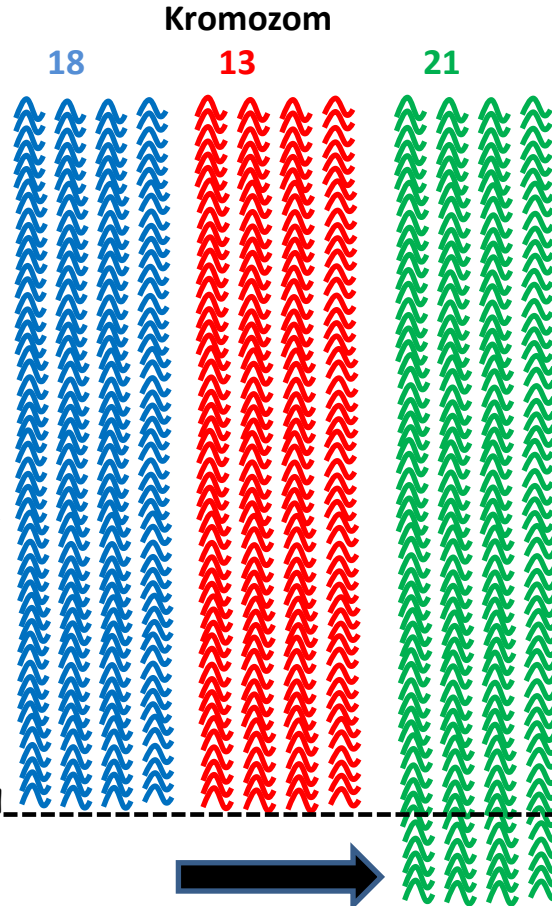


Anne ye ait  
DNA fragmanları

Yeni nesil  
dizileme ile  
amplifikasyon



Amplifikasyon sonrası DNA Havuzu



21. Kromozom AMPLİKONLARINDA artış



## Targeted sequencing/ SNP sequencing/ MPSS/s-MPSS

	MPSS	SNP sequencing	Targeted sequencing
Dizilenen bölge sayısı	Yüksek sayıda dizi elde edilir	Sınırlı sayıda okuma elde edilir	Sınırlı sayıda okuma elde edilir
Tekrar sayısı	Yüksek	Yüksek	Yüksek
Akraba evliliğinde hassasiyet	↓	↓↓	↓
Yumurta donasyonunda Hassasiyet*	Değişmez	Değişmez	Değişmez

\*Fetal plasental DNA nın fraksiyonunun hesaplanmasında ve SNP tabanlı çalışmalarda analiz optimizasyonu gerektirir. Çalışan firmalar var (Harmony, Materni21), çalışmayan (Panorama)

# Gelecekteki beklentiler

- Mikrodelesyon ve mikroduplikasyonların yüksek hassasiyetle ve güvenilirlikle yapılması
- Tek gen hastalıklarının topluca taranabilmesi
- Tüm genom dizileme

Daha uzun dizilerin amplifikasyon olmadan okunabilmesi,  
Maliyetlerin düşmesi

*Teşekkürler*