

Mikrobiyal Sistemler Biyolojisi

Prof. Dr. Bektaş TEPE

Mikrobiyoloji

Bölüm 9

Avuç İçine Sığan DNA Dizileme: MinION'un Ortaya Çıkışı

- DNA dizileme teknolojilerindeki hızlı gelişmeler maliyet ve taşınabilirlik sorunlarını büyük ölçüde azaltmıştır.
- MinION adı verilen dünyanın ilk mobil nükleik asit dizileyicisi avuç içine sığacak büyüklüktedir.
- MinION üzerinde yaklaşık 2000 adet nanopora sahip protein bulunur ve tek iplikli nükleik asitler bu nanoporlardan geçerken akım değişiklikleriyle tanımlanır.
- Bu akım değişiklikleri USB bağlantısı üzerinden bilgisayara iletilir ve cihaz aynı bağlantı üzerinden enerji alır.



MinION'un Çalışma Prensibi ve Gerçek Zamanlı Verim

- MinION, nükleik asit dizilerini kritik saha örneklerinden gerçek zamanlı olarak bilgisayar ekranında gösterebilir.
- Elektrik akımındaki küçük değişiklikler, tek tek nükleotidlerin tanımlanmasını sağlar.
- Makinenin küçük boyutu ve kolay kullanımı, sahada hızlı dizileme yapılmasına olanak tanır.
- Böylece dizileme süreci laboratuvar dışına taşınarak biyolojik analizlerin anında değerlendirilebilmesi mümkün olur.



Ebola Salgınında MinION'un Rolü

- MinION'un gücü 2014–2015 Batı Afrika Ebola salgını sırasında açıkça görülmüştür.
- Bilim insanları üç MinION cihazını yanlarında taşıyarak Gine'ye götürmüş ve büyük, hassas dizileyicilerin taşınma sorunlarını aşmıştır.
- Araştırmacılar, farklı Ebola suşlarının genomlarındaki özgün nükleotid dizilerini analiz ederek yayılımı izleyebilmiştir.
- Örneklerin alınmasından sadece 48 saat sonra 14 hastaya ait Ebola genomları MinION ile belirlenmiştir.



Gerçek Zamanlı Epidemiyoloji: Ebola'nın İzlenmesi

- Ebola genomunun yaklaşık iki haftada bir mutasyona uğraması MinION'un hızlı sonuç verme avantajını önemli kılmıştır.
- Gerçek zamanlı dizileme, virüs suşlarının coğrafi hareketlerinin izlenmesine olanak tanımıştır.
- Analizler iki ana suşun salgının devamından sorumlu olduğunu ve Sierra Leone ile Gine arasındaki geçişlerin salgını uzattığını göstermiştir.
- Geleneksel dizileme yöntemleri, sonuçların haftalar sonra elde edilmesi nedeniyle böyle bir sürveyansı destekleyememektedir.

MinION'un Geleceği: Saha, Uzay ve Eğitim

- Sahada alışan biyologlar MinION'un birçok olası kullanım alanını öngörmektedir.
- Geliştiriciler cihazın bilgisayar yerine akıllı telefonla çalışabilmesi için yeni düzenlemeler yapmaktadır.
- NASA, MinION'u Uluslararası Uzay İstasyonu'nda test etmeyi planlamaktadır.
- Uygun maliyeti, küçük boyutu ve kullanım kolaylığı MinION'u yakın gelecekte sınıflar için de ideal bir araç haline getirmektedir.

Sistem Biyolojisine Giriş

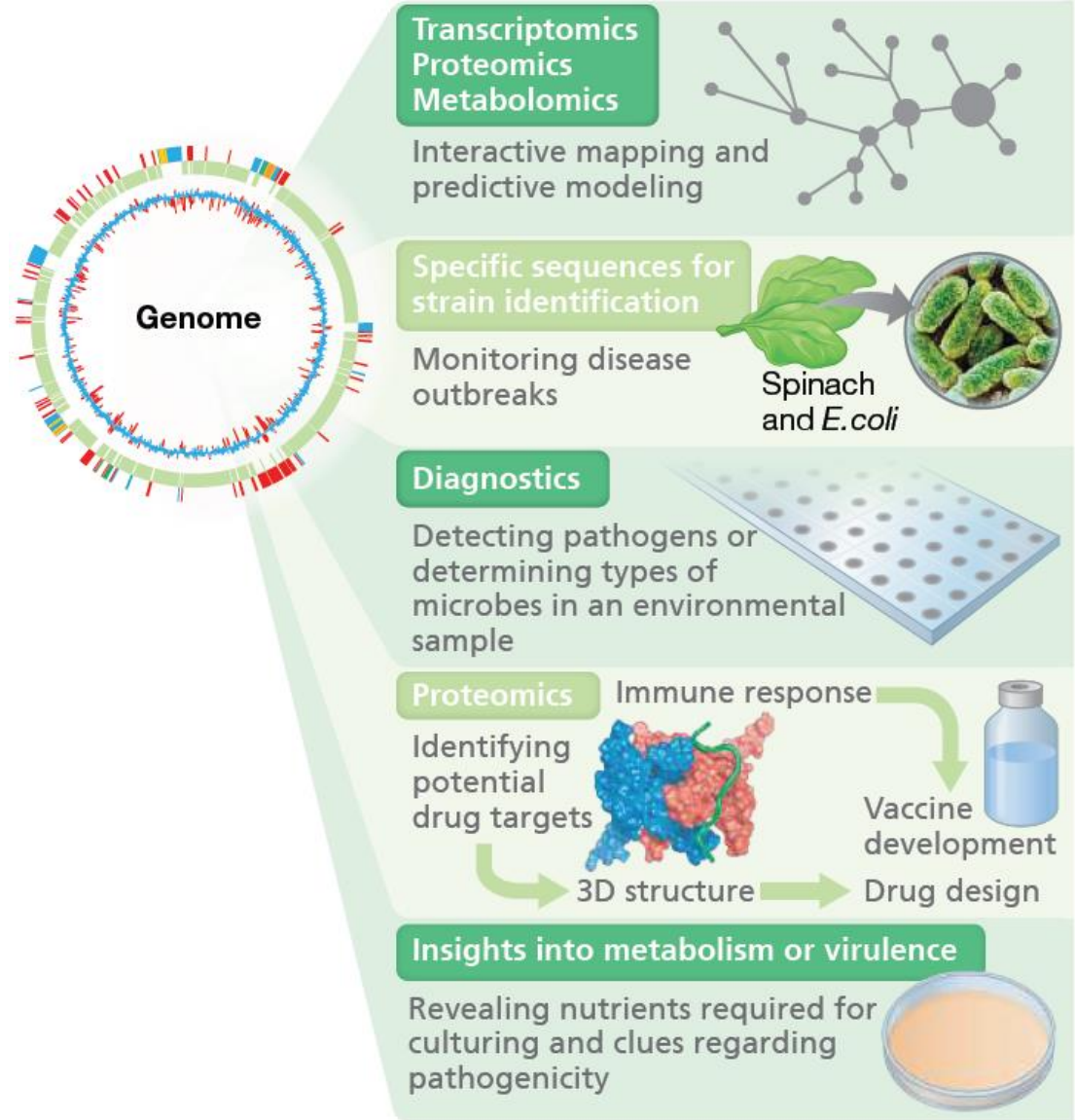
- Geleneksel mikrobiyal çalışma yöntemleri belirli koşullarda tek bir biyokimyasal yol ya da sınırlı sayıda moleküler yanıtı incelemeye odaklanmıştır.
- Bu indirgemeci yaklaşım, organizmaların dinamik doğasını ve biyomoleküllerin birlikte davranışlarını tam olarak açıklayamaz.
- Sistem biyolojisi, farklı yöntemleri bütünleştirerek organizmanın çevresine verdiği toplam yanıtın geniş bir görünümünü sunar.
- “Omics” devrimi, büyük molekül havuzlarını tanımlayıp nicelleştirebilme yeteneğiyle sistem biyolojisini güçlendirmiştir.

Veri Yoğunluğu ve Bilgisayar Gücü

- Sistem biyolojisi, büyük miktarda biyolojik bilginin bilgisayar ortamında depolanmasını ve analiz edilmesini gerektirir.
- Bu nedenle tüm biyolojik sistemlerin anlaşılması, hesaplama gücü ile depolama ve veri alma kapasitelerindeki gelişmelerle paralel ilerlemektedir.
- Omics verilerinin yorumlanması, moleküler süreçlerin bütüncül şekilde anlaşılmasını mümkün kılar.
- Bu yaklaşım günümüzde mikrobiyal sistemler biyolojisinin temelini oluşturur.

Genomiğe Giriş

- Omics ve sistem biyolojisinin temeli nükleik asit ve protein dizileridir ve bunların özellikleri hücrenin genomu tarafından belirlenir.
- Genom, bir organizmanın protein, RNA ve düzenleyici bölgeleri içeren tüm genetik bilgisini kapsar ve varsa kodlamayan DNA'yı da içerir.
- Bir organizmanın genom dizisi hem sahip olduğu genleri hem de organizmanın nasıl işlediğine dair ipuçlarını ortaya koyar.
- Bu bölümde genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik kavramları tanıtarak bunların mikrobiyal sistemler biyolojisiyle ilişkisi açıklanacaktır.



Genomiğin Tanımı ve Kapsamı

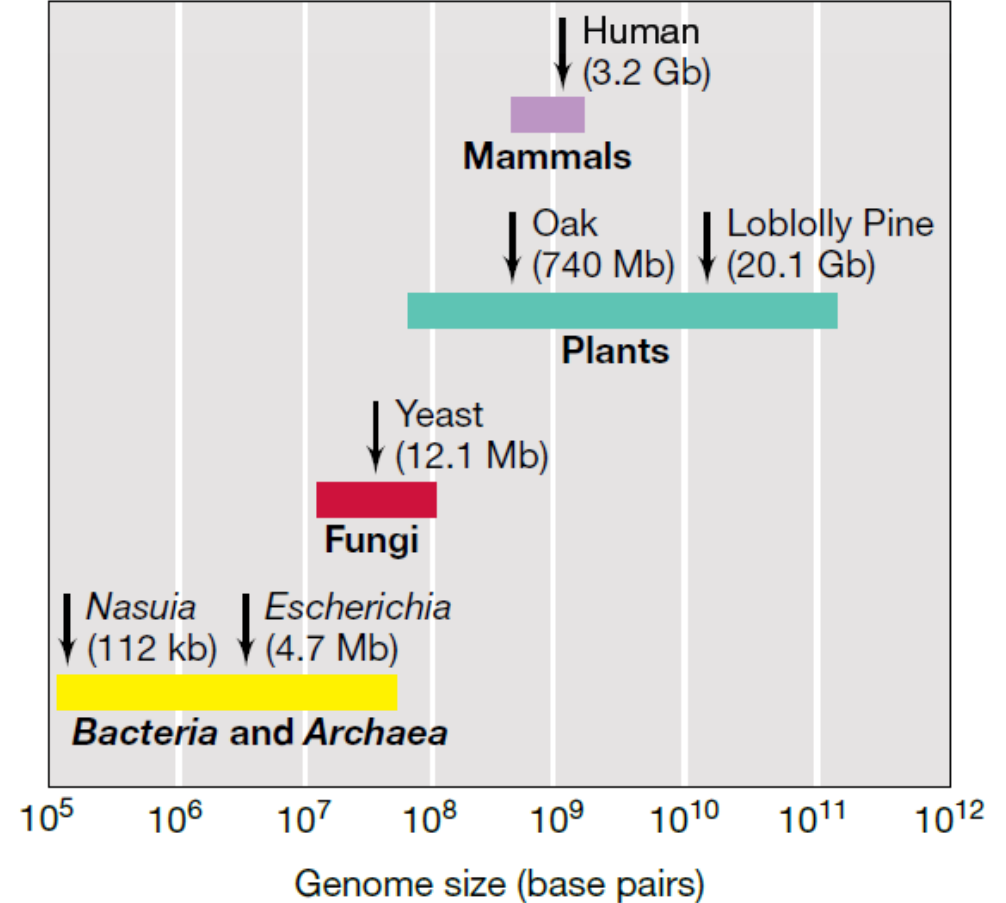
- Genomik, genomların haritalanması, dizilenmesi, analiz edilmesi ve karşılaştırılmasıyla ilgilenen disiplindir.
- Bu kısımda genomların nasıl dizilendiğine ve genom içeriğinin analizinde kullanılan bazı tekniklere değinilecektir.
- Genomik çalışmalar mikroorganizma biyolojisinin bütüncül anlaşılmasına önemli katkılar sağlar.
- Genom verileri diğer omics alanlarıyla birleştğinde organizmanın işleyişine dair daha geniş bir perspektif sunar.

Genomik Çağının Doğuşu

- Genomik alanındaki ilerlemeler, moleküler teknolojilerin gelişimi ile yüksek hesaplama gücünün birleşmesine dayanır.
- DNA dizileme süreçlerinin otomasyonu ve güçlü hesaplamalı analiz araçları genomların daha hızlı ve düşük maliyetle incelenmesini sağlamıştır.
- Bu gelişmeler sonucunda, çözümü yapılan genomların sayısı hızla artmış ve temel darboğaz, elde edilen devasa nükleik asit veri miktarının anlamlandırılması olmuştur.

Genomik: Geçmişten Günümüze

- İlk dizilenen genomlar yaklaşık 40 yıl önce küçük virüslere aitti ve ilk bakteri genom dizisi 1995 yılında yayımlandı.
- Günümüzde 50.000'den fazla Bacteria, Archaea ve virüs genomu ile metagenomik proje verileri çevrimiçi veri tabanlarında (özellikle GOLD) araştırmacıların kullanımına sunulmaktadır.
- GOLD veri tabanı, ABD Enerji Bakanlığı'na bağlı Joint Genome Institute tarafından yürütülmektedir.
- Ayrıca, 3.2 milyar baz çifti ve yaklaşık 20.000 protein kodlayan geni içeren haploid insan genomu dizilenmiş olup bu bilgi yandaki figürde gösterilmiştir.



Genomların Anlattıkları

- Modern mikrobiyolojide genom dizileri neredeyse tüm araştırma alanlarını şekillendiren temel bir bilgi kaynağı haline gelmiştir.
- Sıcak su kaynaklarında yaşayan mikroorganizmaların ısıya dayanıklı enzimlerinden patojenlerdeki virülans genlerine kadar çok çeşitli biyolojik özellikler genom dizilemesiyle ortaya çıkarılmıştır.
- Genomik yaklaşım, gen ekspresyonunun incelenmesinde kullanılan mikroarray'lerin geliştirilmesine ve yatay gen transferi olaylarının tespitine önemli katkılar sağlamıştır.
- Ayrıca genom verileri, patojenlere özgü “imza genlerin” belirlenmesiyle hastalık salgınlarının izlenmesi, CRISPR dizilerinin keşfi ve mikroorganizmaların metabolik yolları ile büyüme gereksinimlerinin anlaşılmasında kritik rol oynamıştır.

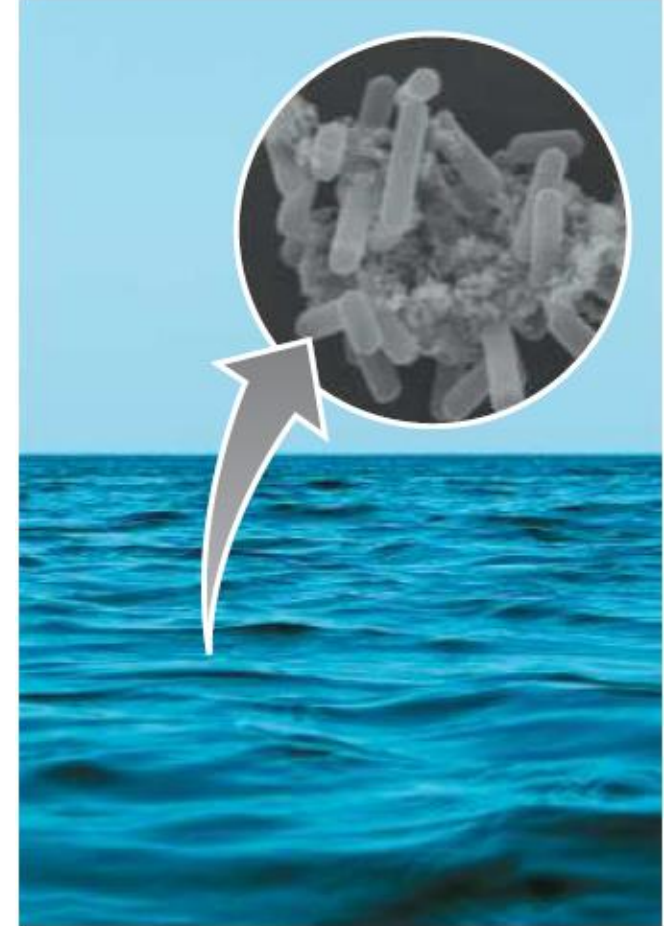
Genomik ve Tıbbi Gizemlerin Çözümü

- Genom dizilemesi, geçmişteki tıbbi bilinmezliklerin çözüme kavuşturulmasında da etkili olmuştur, Kara Veba etkeninin aydınlatılması bunun iyi bir örneğidir.
- Ortaçağ Avrupa'sını kasıp kavuran bu salgının nedeni olarak bubonik veba düşünülse de, bilimsel kesinlik dizilenen eski DNA örneklerinin modern *Yersinia pestis* genomu ile karşılaştırılmasıyla sağlanmıştır.
- Diş ve kemiklerden elde edilen eski DNA dizileri, hastalığın gerçekten bubonik veba olduğunu doğrulamıştır.



Genomik ve Yeni Archaea Filumlarının Keşfi

- Genomik analizler, bilinen Archaea çeşitliliğini genişleterek mikrobiyal filogeninin yeniden şekillenmesine katkı sağlamıştır.
- Önceleri yalnızca üç Archaea filumu bilinirken, çevresel 16S rRNA dizilerinde Crenarchaeota'ya zayıf benzerlik gösteren yeni gruplar tespit edilmiştir.
- Bu örneklerden biri olan *Nitrosopumilus*, ilk amonyak oksitleyen Archaea olarak izole edilmiş ve görüntüsü yanda verilmiştir.
- İki farklı amonyak oksitleyen Archaea türünün genomlarının karşılaştırılması, bu organizmaların yeni bir filum olan Thaumarchaeota'ya ait olduğunu açık biçimde ortaya koymuştur.



Mikrobiyolojide Genomik Devrimin Önemi

- Son 40 yılda mikrobiyoloji, genomik teknolojilerin sunduğu olanaklarla tarihte görülmemiş ölçüde hızlı bir bilimsel ilerleme yaşamıştır.
- Günümüzde mikrobiyoloji araştırmalarının büyük çoğunluğu genom dizilerinden türetilen bilgilerle desteklenmekte ve eski sorular yeni yöntemlerle çözülebilmektedir.
- Genomik devrim, hem sistem biyolojisi hem de ekosistem biyolojisi için yeni araçlar sunarak mikrobiyal dünyayı daha önce mümkün olmayan bir ayrıntıyla incelememize olanak vermektedir.
- Genel mesaj, içinde bulunduğumuz çağın belirgin biçimde genomik çağı olduğu ve genomik araçların mikrobiyolojiye güçlü bir dönüşüm getirdiğidir.



Genom Dizileme ve Anotasyonu

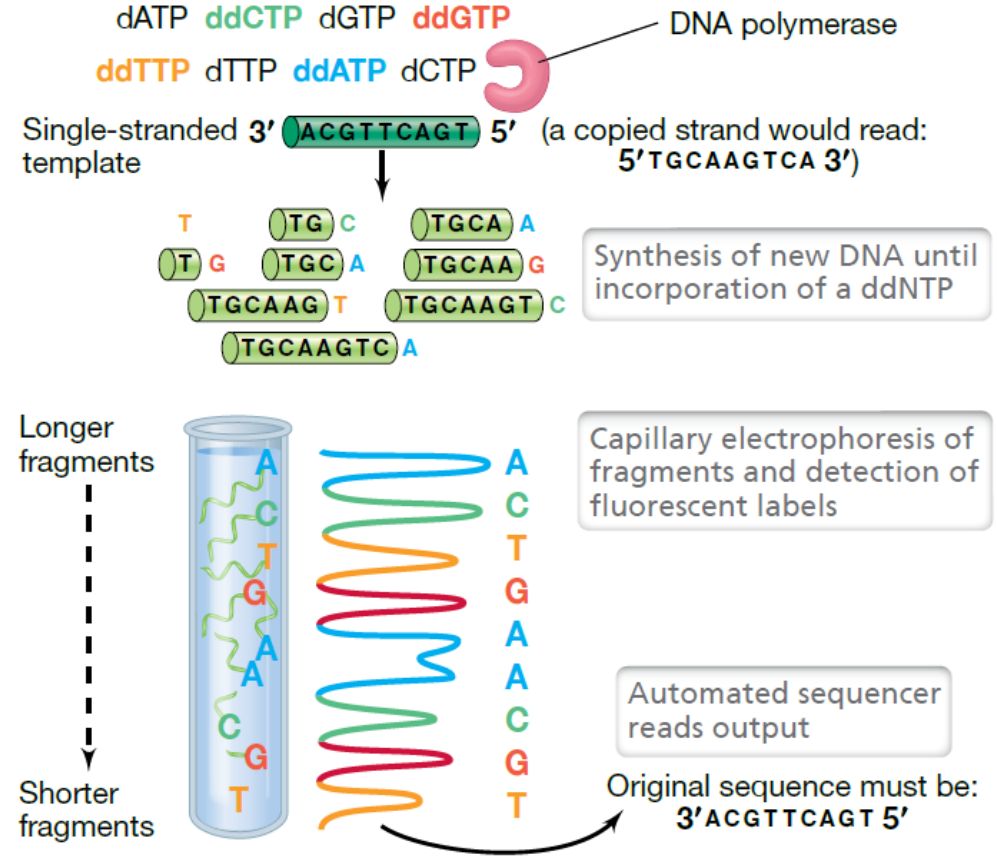
- Dizileme terimi biyolojide bir makromolekölün alt birimlerinin tam sırasının belirlenmesi anlamına gelir ve DNA için bu sıra nükleotidlerin dizilişidir.
- DNA dizileme günümüzde omics devrimin merkezinde yer alır ve teknolojisi o kadar hızlı gelişir ki her yıl yeni bir yöntem ortaya çıkar.
- Teknolojik ilerlemelere rağmen en yeni dizileme yaklaşımlarının temeli, ilk geliştirilen basit ama parlak bilimsel yöntemlere dayanır.
- Dizileme ve gen parçalarının birleştirilmesinden sonra genom anotasyonu yapılır ve ham diziler genomdaki genlerin ve işlevsel bölgelerin bir listesine dönüştürülür.

Biyoinformatiğin Rolü ve Anotasyonun Önemi

- Biyoinformatik, nükleik asit ve protein dizilerini ve yapılarını depolamak ve analiz etmek için bilgisayarların kullanılmasına karşılık gelir.
- Gelişmiş dizileme yöntemleri artık verileri analiz hızından daha hızlı üretir ve bu nedenle anotasyon günümüzde genomiklerdeki en önemli darboğazdır.
- Bu kısımda genom dizileme, dizilerin birleştirilmesi ve anotasyon süreçlerine odaklanılacaktır.
- Dizileme tamamlanmadan anotasyon yapılamayacağı için bu süreçler genomik çalışmaların bütünlüğünü oluşturan ardışık basamaklardır.

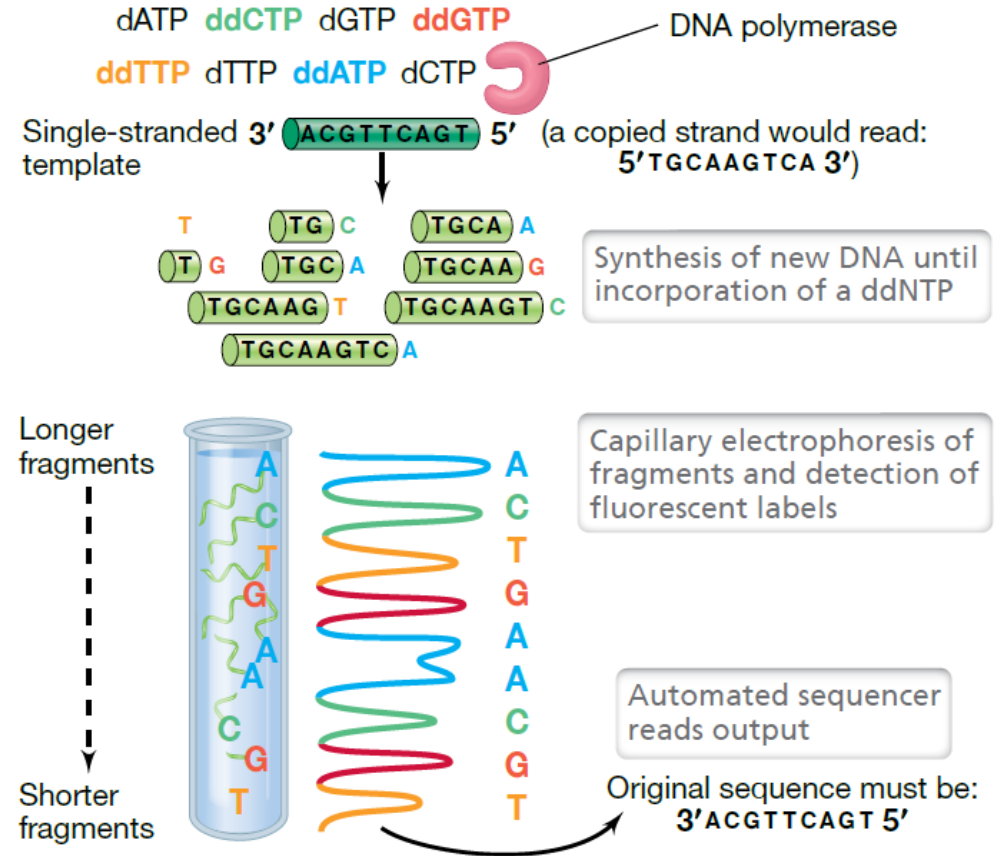
Sanger Dizileme Yönteminin Temelleri

- DNA dizilemede yaygın kullanılan ilk yöntem, Fred Sanger tarafından geliştirilen ve kendisine ikinci Nobel Ödülü'nü kazandıran dideoksi yöntemidir.
- Sanger yönteminde, tek iplikli DNA'nın PCR'a benzer bir süreçle kopyası oluşturulur ve karışıma hem normal dNTP'ler hem de dört bazın her biri için ddNTP analogları eklenir.



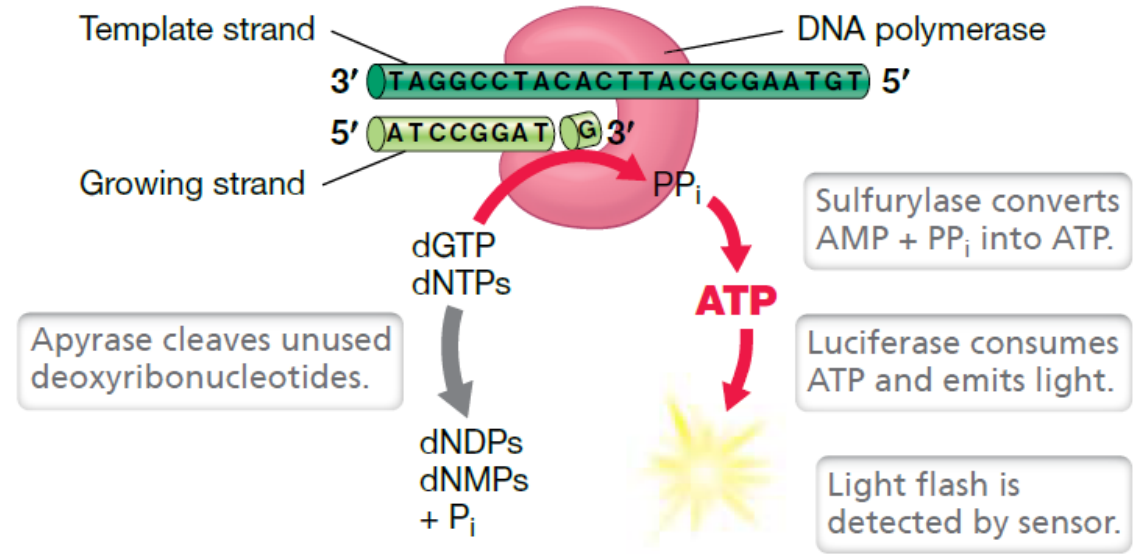
Sanger Dizileme Yönteminin Temelleri

- ddNTP analogları 3'-hidroksil grubu taşımadığı için zincir uzamasını durduran özgül zincir sonlandırıcılarıdır ve rastgele eklendiklerinde farklı uzunluklarda DNA zincirleri oluşur.
- Başlangıçta radyoaktif işaretler kullanılırken, kısa sürede her ddNTP için ayrı floresan etiketlerin kullanıldığı ve ürünlerin lazerle tespit edildiği otomatik sistemlere geçilmiştir.



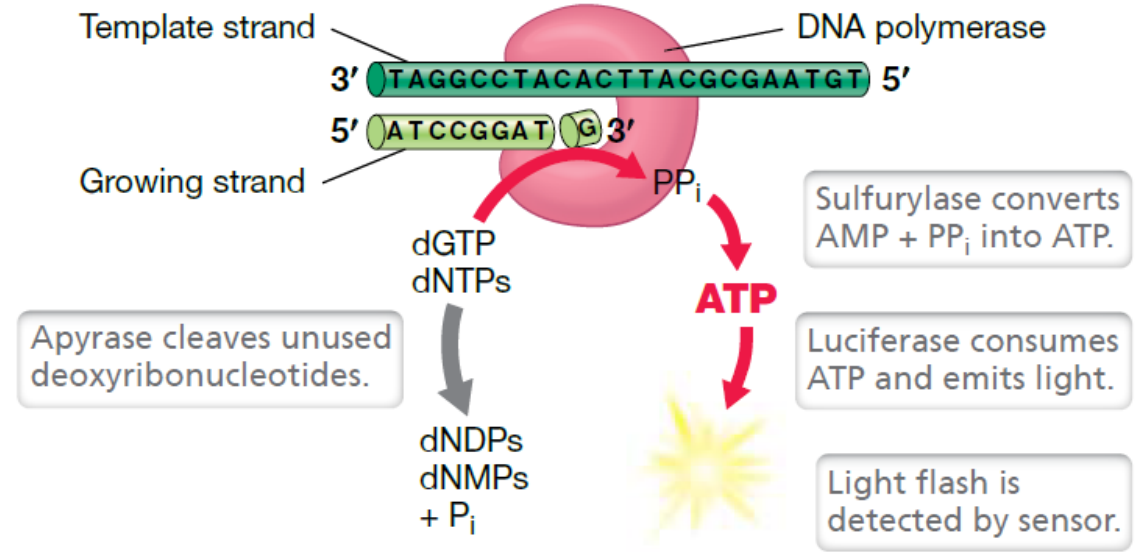
Sanger Yönteminin Sınırları ve Yeni Teknolojilere Geçiş

- Sanger yöntemi primerlerin bilinen dizilere bağlanmasına bağlı olduğundan ve reaksiyon başına yaklaşık 800 nükleotid ile sınırlı olduğundan büyük DNA molekülleri tek seferde dizilenemezdi.
- Bu nedenle büyük DNA molekülleri küçük parçalara bölünerek vektörlere klonlanır ve parçalar ayrı ayrı dizilenirdi.



Sanger Yönteminin Sınırları ve Yeni Teknolojilere Geçiş

- Bu sınırlılıklar, sürekli gelişen yeni dizileme yöntemlerinin doğmasına yol açmış ve bunlar “next-generation sequencing” kavramı altında anılır hale gelmiştir.
- Örneğin, ikinci nesil dizileme yöntemlerinden biri olan pirodizileme, dNTP’lerin eklenmesini lusiferaz enziminin yaydığı ışık darbeleriyle saptar.

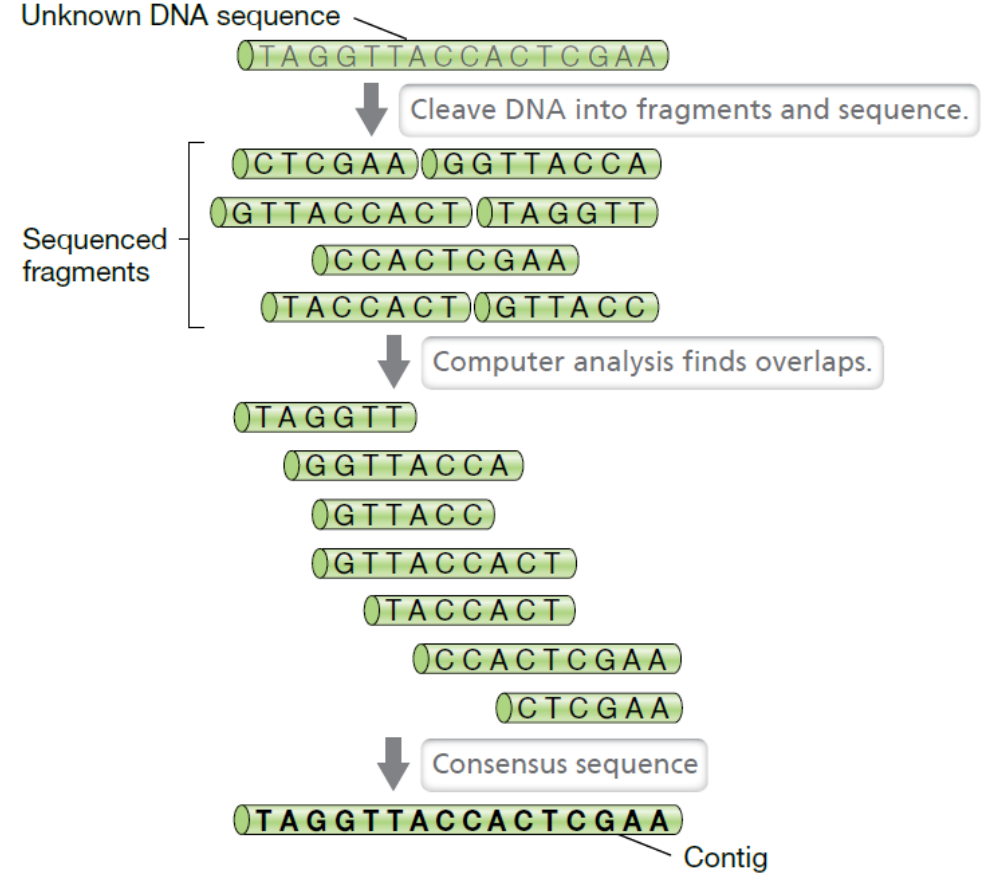


Modern Dizileme Yöntemleri ve Maliyet Değişimi

- Modern dizileme yöntemleri çok sayıda yeni teknolojiyi kapsar ve bu yöntemler DNA dizileme hızını dramatik şekilde artırmıştır.
- Sözkonusu yöntemler, 1 megabazlık DNA dizileme maliyetinin son 15 yılda 100.000 kat düşüş gösterdiğini ortaya koymuştur.
- Dizileme maliyetlerindeki bu düşüş, genomik araştırmaların erişilebilirliğini büyük ölçüde artırmıştır.
- Yeni yöntemlerin hızlı gelişimi, dizileme kapasitesinin her yıl daha da artmasına yol açmaktadır.

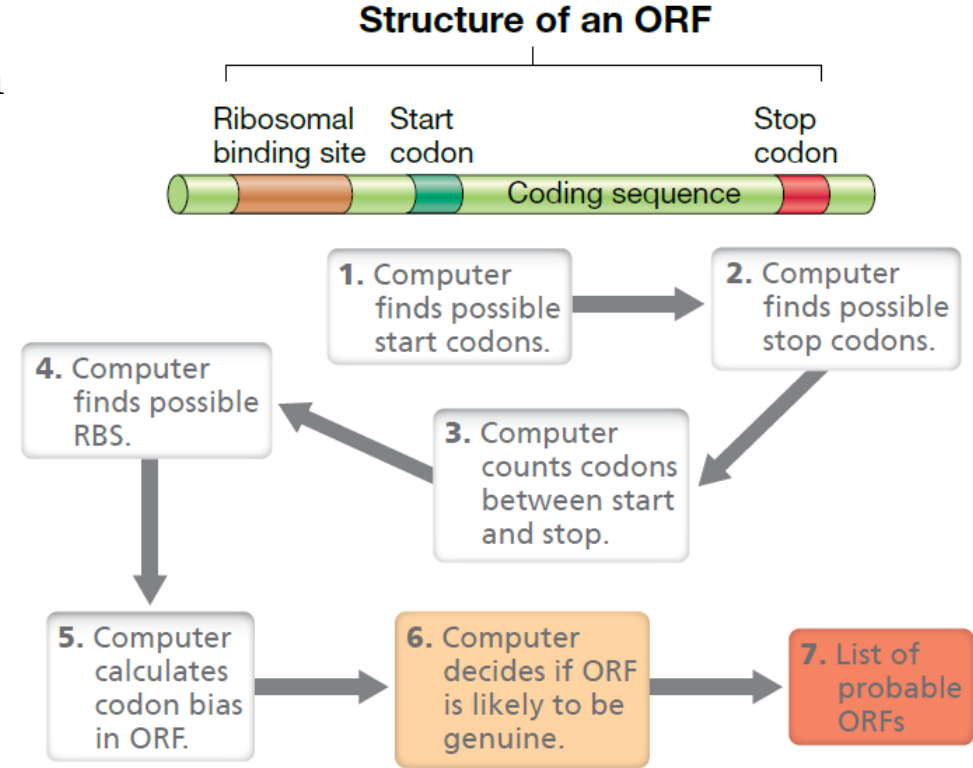
Genomların Birleştirilmesi (Assembly) Süreci

- Hangi dizileme sistemi kullanılırsa kullanılsın, elde edilen DNA parçalarının analiz edilebilmesi için önce doğru sırayla birleştirilmesi gerekir.
- Genom assembly işlemi, parçaların doğru sıraya dizilmesini ve örtüşen bölgelerin ayıklanmasını kapsar.
- Bilgisayarlar çok sayıda kısa DNA parçasını tarayarak örtüşen dizileri tespit eder ve bu örtüşmeler parçaların birleştirilmesinde temel alınır.
- Örtüşen diziler contig adı verilen birleşik dizilere dönüştürülür ve contiglerin uçlarındaki örtüşmeler hizalanarak genom haritasının temelini oluşturan scaffold'lar meydana getirilir.



Genom Anotasyonunun Başlatılması

- Genom haritası oluşturulduktan sonra anotasyon süreci başlar ve bu süreç genlerin ve diğer işlevsel bölgelerin tanımlanmasını içerir.
- Bakteri ve Archaea genomları çok az intron içerdiği için bu genomlar açık okuma çerçevelerinin kısa düzenleyici bölgelerle ayrıldığı bir yapı gösterir.
- Fonksiyonel bir ORF, gerçekten bir protein kodlayan ve dizide bilgisayar analizleriyle tanımlanabilen bölgedir.
- Genler DNA'nın yalnızca bir ipliğinden transkribe edilse de her iki iplikte de gen bulunabileceği için bilgisayar analizi iki ipliğin de taranmasını gerektirir.



ORF Arayışında Başlangıç: Start ve Stop Kodonlarının Belirlenmesi

- Bir ORF bulmanın ilk adımı, dizideki start ve stop kodonlarını tanımlamaktır.
- Ancak, çerçeve içindeki start ve stop kodonları dizide rastgele görülebildiği için, fonksiyonel bir ORF'yi ayırt etmek adına ek ipuçlarına ihtiyaç duyulur.
- Bakterilerde translasyon, mRNA üzerindeki ribozom bağlanma bölgesinin (Shine–Dalgarno dizisi) hemen ardından gelen start kodonundan başlar.
- Bu nedenle, start ve stop kodonlarının yanı sıra olası ribozom bağlanma bölgelerinin bulunması, ORF'nin işlevsel olup olmadığını ve hangi start kodonunun gerçekten kullanıldığını belirlemede yardımcı olur.

ORF'in İşlevselliğini Destekleyen Ek Kanıtlar

- Bir ORF'nin işlevsel olma olasılığı, dizisinin başka organizmaların genomlarındaki ORF'lere benzemesiyle artar.
- ORF içinde bilinen bir proteinin fonksiyonel domainini kodlayan bir dizinin bulunması, ortak evrimsel köken nedeniyle önemli bir ipucudur.
- Bilgisayar programları, GenBank gibi büyük veri tabanlarında BLAST algoritmasıyla dizilim benzerliklerini tarayarak ORF'nin potansiyel işlevi hakkında bilgi sağlar.
- Bu yaklaşım, hem protein hem de nükleik asit dizilerini diğer tüm kayıtlı dizilerle karşılaştırarak yorumlama imkânı sunar.

Kodon Kullanımı: Codon Bias ve ORF'nin Kökeni

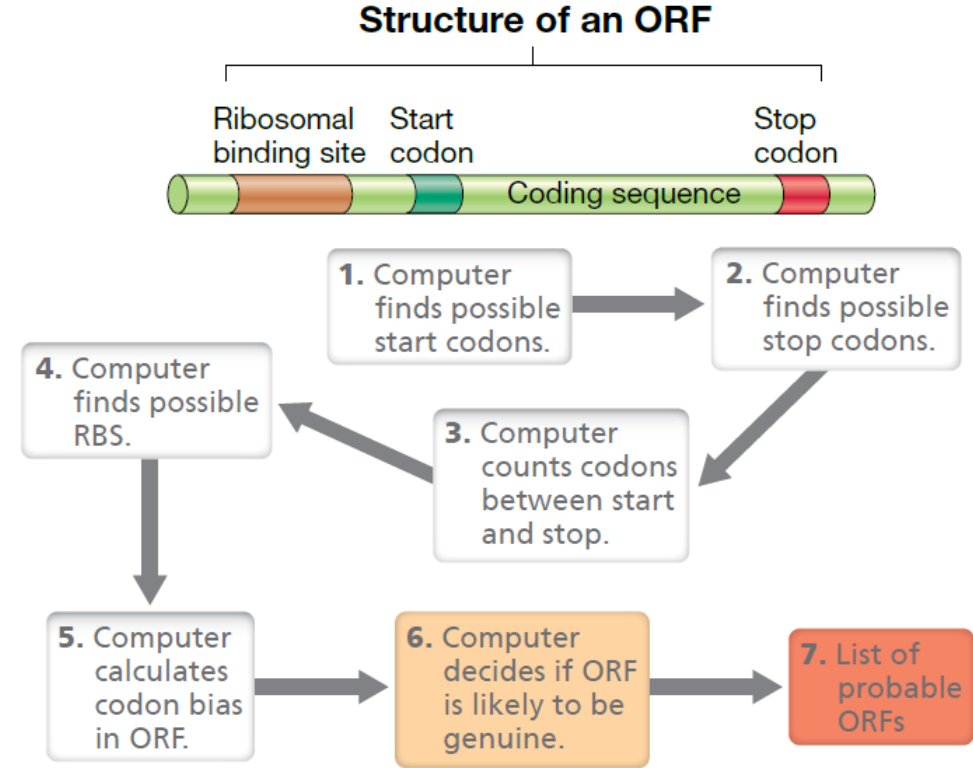
- Birçok amino asit birden fazla kodonla belirtildiği için, organizmalar arasında belirgin kodon kullanım farklılıkları görülür.
- Codon bias, belirli bir organizmada tercih edilen kodonların dağılımını ifade eder ve ORF'nin bu dağılımdan sapması işlevsizlik ya da yatay gen transferi olasılığına işaret edebilir.
- Bir ORF'nin kodon kullanım profili organizmanın genel kodon kullanımına uymadığında, bu ORF'nin başka bir organizmadan edinilmiş olabileceği düşünülür.

Genom Anotasyonu: Bilinmeyen Genler ve Hipotetik Proteinler

- Hiçbir genom projesi, genomdaki genlerin %100'ünün işlevini tanımlayarak tamamlanmaz ve çoğu organizmada ORF'lerin yalnızca yaklaşık %70'inin rolü bilinir.
- Geriye kalan ORF'ler hipotetik proteinleri kodlar; bu proteinler makul uzunlukta bir okuma çerçevesine, start–stop kodonlarına ve bir ribozom bağlanma bölgesine sahiptir ancak bilinen proteinlerle anlamlı homoloji göstermez.

Genom Anotasyonu: Bilinmeyen Genler ve Hipotetik Proteinler

- Yandaki figür, hipotetik proteinleri kodlayan ORF'lerin bu temel yapısal özelliklerini örneklemektedir.
- Bazı ORF'ler yalnızca genel bir işlev veya protein ailesi düzeyinde tanımlanabilir ve *E. coli* genomundaki birçok tanımlanamamış genin, özel koşullarda görev yapan veya düzenleyici süreçlerde rol alan proteinleri kodladığı düşünülmektedir.

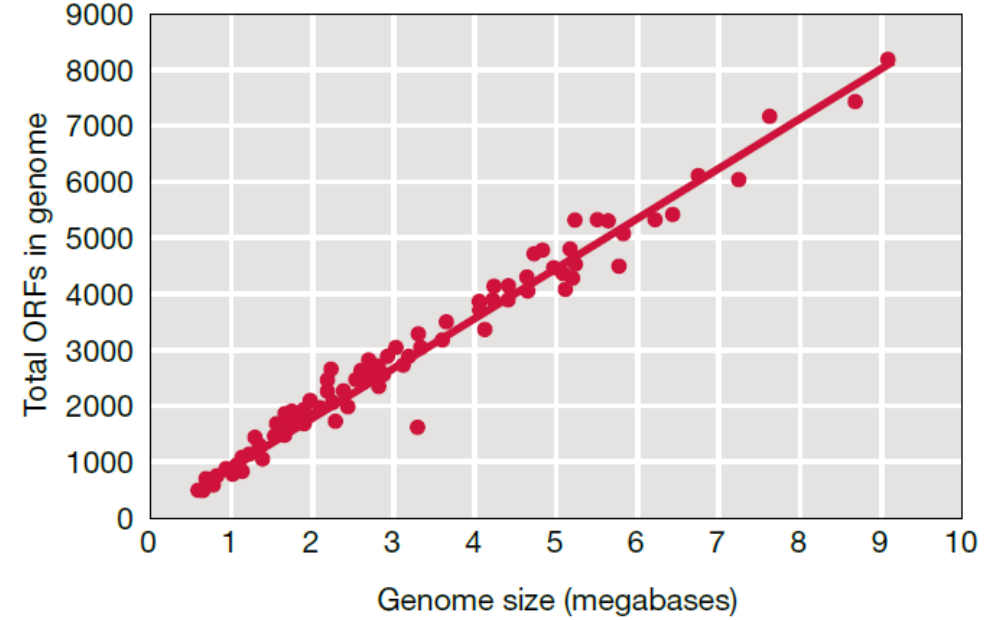


Protein Kodlamayan Genler ve Non-coding RNA'ların Tanımlanması

- Bazı genler protein kodlamaz ve bu nedenle start kodonlarından yoksun olabilir, hatta dizileri içinde birden fazla stop kodonu barındırabilir.
- tRNA ve rRNA gibi non-coding RNA'lar yüksek düzeyde korunmuş yapıları ve iyi bilinen dizileri nedeniyle genom anotasyonunda kolayca tanımlanır.
- Buna karşın, düzenleyici RNA'ların birçok türü yalnızca üç boyutlu yapıları bakımından korunmuştur ve anlamlı dizilim benzerliği göstermediğinden tanımlanmaları zordur.
- Bu nedenle transcriptomics yaklaşımları, özellikle RNA-Seq, kodlamayan genlerin saptanmasında kritik bir araç hâline gelmiştir.

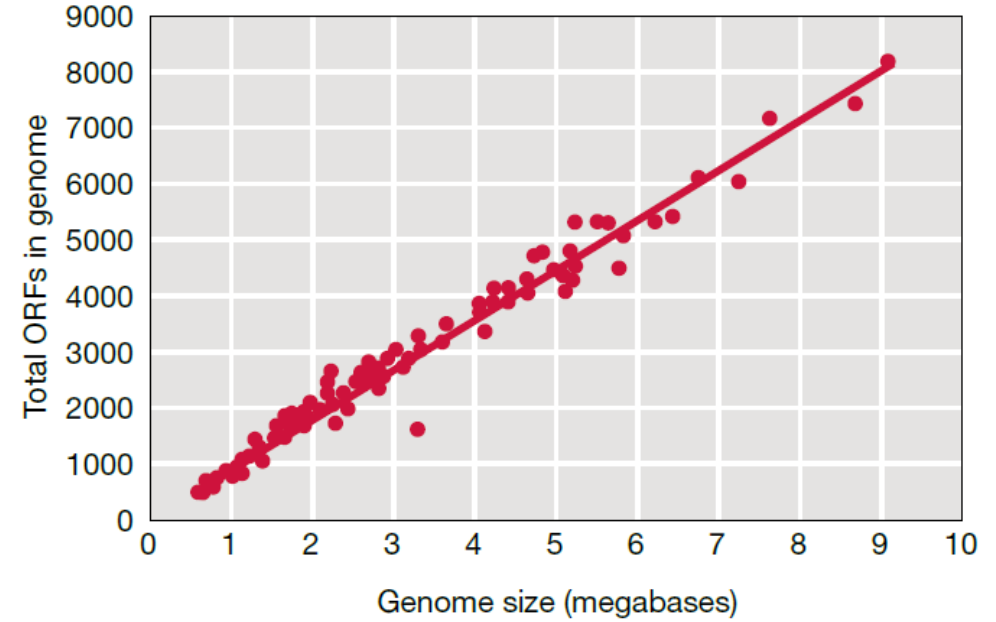
Bakteri ve Archaea Genomlarının Karşılaştırılması: Genom Boyutu ve ORF İçeriği

- Bir genom dizilendikten sonra MicrobesOnline gibi veri tabanları kullanılarak yapılan karşılaştırmalı genomik analizler, genomun biyolojik özelliklerinin ortaya çıkarılmasını sağlar.
- Bakteri ve Archaea genomlarında, genom boyutu ile ORF sayısı arasında güçlü ve doğrusal bir ilişki bulunduğu gösterilmiştir.



Bakteri ve Archaea Genomlarının Karşılaştırılması: Genom Boyutu ve ORF İçeriği

- Prokaryotlarda her 1 megabazlık DNA yaklaşık 1000 ORF barındırır ve genom büyüdükçe gen sayısı da orantılı biçimde artar.
- Bu durum, genomlarında büyük miktarda intron ve non-coding DNA taşıyabilen ökaryotların aksine, prokaryot genomlarının kompakt yapısını vurgular.

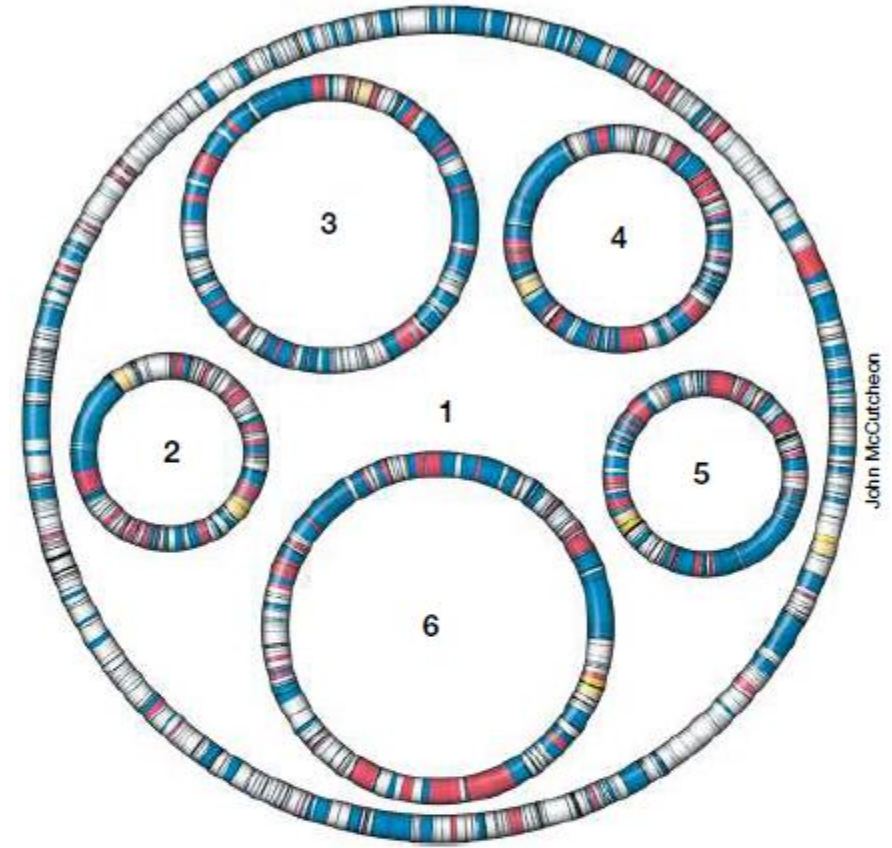


Bakteriyel Genom Çeşitliliği: En Küçükten En Büyük Genomlara

- Bakteriyel genom boyutları, yalnızca 121 protein kodlayan gene sahip *Tremblaya princeps*'ten, yaklaşık 100 kat daha fazla gene sahip *Sorangium cellulosum*'a kadar geniş bir aralıkta değişir.
- Serbest yaşam için yaklaşık 1300 genlik bir alt sınır kabul edilse de, yeni keşfedilen bazı denizel Aktinobakteriler yaklaşık 800 genle yaşamlarını sürdürebilmektedir.
- Bu bulgu, minimal genom gereksinimine ilişkin önceki tahminlerin yeniden değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.
- Bu genom çeşitliliği, farklı ekolojik nişlerde yaşayan bakterilerin genomlarını nasıl optimize ettiklerini ortaya koyar.

Küçük Genomlara Genel Bakış

- En küçük hücresel genomlar, böceklerde yaşayan endosimbiyont bakterilerde görülür ve *Tremblaya* ile *Hodgkinia*'nın genom büyüklükleri yaklaşık 140 kbp'dır.
- Bilinen en küçük genom ise yalnızca 112 kbp büyüklüğündeki *Nasua deltocephalicola*'ya aittir.
- Bu kadar küçülmüş genomlara sahip simbiyontlar, yaşamsal gereksinimlerini tamamen konak böcek hücrelerinden sağlar.
- Buna karşılık simbiyontlar, konağın sentezleyemediği temel amino asitler ve diğer bazı besin maddelerini konak hücreye sunar.



1. <i>Mycoplasma genitalium</i> (Mollicutes) 580.1 kbp GC: 31.7%	4. <i>Carsonella</i> (Gammaproteobacteria) 159.6 kbp GC: 16.6%
2. <i>Tremblaya</i> (Betaproteobacteria) 138.9 kbp GC: 58.8%	5. <i>Hodgkinia</i> (Alphaproteobacteria) 143.7 kbp GC: 58.4%
3. <i>Zinderia</i> (Betaproteobacteria) 208.5 kbp GC: 13.5%	6. <i>Sulcia</i> (Bacteroidetes) 245.5 kbp GC: 22.4%

Parazitik Prokaryotlarda Küçük Genomlar

- *Mycoplasma* (Bacteria) ve *Nanoarchaeum equitans* (Archaea) gibi parazitik prokaryotların genom büyüklükleri yaklaşık 500 kbp'dır.
- *N. equitans*, *Ignicoccus* adlı başka bir hipertermofil Archaea'da parazit olarak yaşar ve metabolik proteinleri kodlayan genlerin neredeyse tamamından yoksundur.
- Bu nedenle hem katabolik hem de anabolik süreçlerin büyük kısmı için konağa bağımlıdır.
- Bazı patojenlerin genomları oldukça büyük olabilirken, birçok insan patojeninin genomu *Pandoravirus*'un 2.5 Mbp büyüklüğündeki genomundan bile küçüktür.

Minimum Gen Sayısı ve Temel Genler

- *Mycoplasma*'nın yaklaşık 500 gene sahip genomu temel alınarak, yaşamsal faaliyetleri sürdürebilen en küçük hücrenin yaklaşık 250–300 gene ihtiyaç duyduğu tahmin edilmektedir.
- Bu tahminler küçük genomların karşılaştırılmasıyla ve sistematik mutagenез çalışmalarından elde edilen bulgularla desteklenmiştir.
- *E. coli* ve *Bacillus subtilis* üzerinde yapılan deneyler, yaklaşık 4000 genin içinden 300–400 kadarının büyüme koşullarına bağlı olarak “esansiyel” kabul edildiğini göstermiştir.
- “Esansiyel genler”in çoğu diğer Bacteria türlerinde de bulunur ve bunların yaklaşık %70'i Archaea ve ökaryotlarda da tanımlanmıştır.



Büyük Genomlara Genel Bakış

- Bazı Bacteria türlerinin genom büyüklükleri, bazı ökaryotik mikroorganizmaların genomlarıyla aynı seviyeye ulaşabilmektedir.
- Bakteriler büyük oranda kodlayıcı DNA'dan oluştuğu için, daha az DNA'ya sahip olmalarına rağmen bazı ökaryotlardan daha fazla gene sahip olabilirler.
- Örneğin *Bradyrhizobium japonicum*'un 9.1 Mbp'lık DNA'sında 8300 ORF bulunurken, *Saccharomyces cerevisiae*'nin 12.1 Mbp'lık genomunda yalnızca 5800 ORF vardır.
- Bu durum bakteriyel genomların verimli gen organizasyonuna işaret etmektedir.

Bilinen En Büyük Bakteriyel Genom: *S. cellulorum*

- Gliding myxobacteria grubundan *S. cellulorum*, tek bir halkasal kromozom üzerinde yaklaşık 14.8 Mbp genom büyüklüğü ile bilinen en büyük bakteriyel genoma sahiptir.
- Bu genom, maya ve bazı patojen protozoonlar dahil olmak üzere birçok ökaryotunkinden daha fazla DNA içerir.
- *S. cellulorum* genomu yaklaşık %10.5 oranında kodlamayan DNA ve 11,559 protein kodlayan gen barındırır; bu sayı *E. coli*'nin genomundan üç kat fazladır.
- Ayrıca 508 kinaz kodlaması, bu organizmanın çok yönlü bir yaşam biçimine ve gelişmiş bir düzenleyici sisteme sahip olduğunu düşündürmektedir.



Archaea Genomlarının Büyüklüğü

- Bakterilerin aksine, şimdiye kadar tanımlanan en büyük Archaea genomları yaklaşık 5 Mbp civarındadır.
- Bu durum Archaea'nın genel olarak daha kompakt genomlara sahip olduğunu göstermektedir.
- Archaea genomlarının büyüklüğü sınırlı olsa da, içerikleri yaşam stratejilerine uygun bir çeşitlilik sunar.
- Bu kompakt yapı, birçok metabolik yolun farklı organizasyonlarla çözümlendiğini düşündürmektedir.

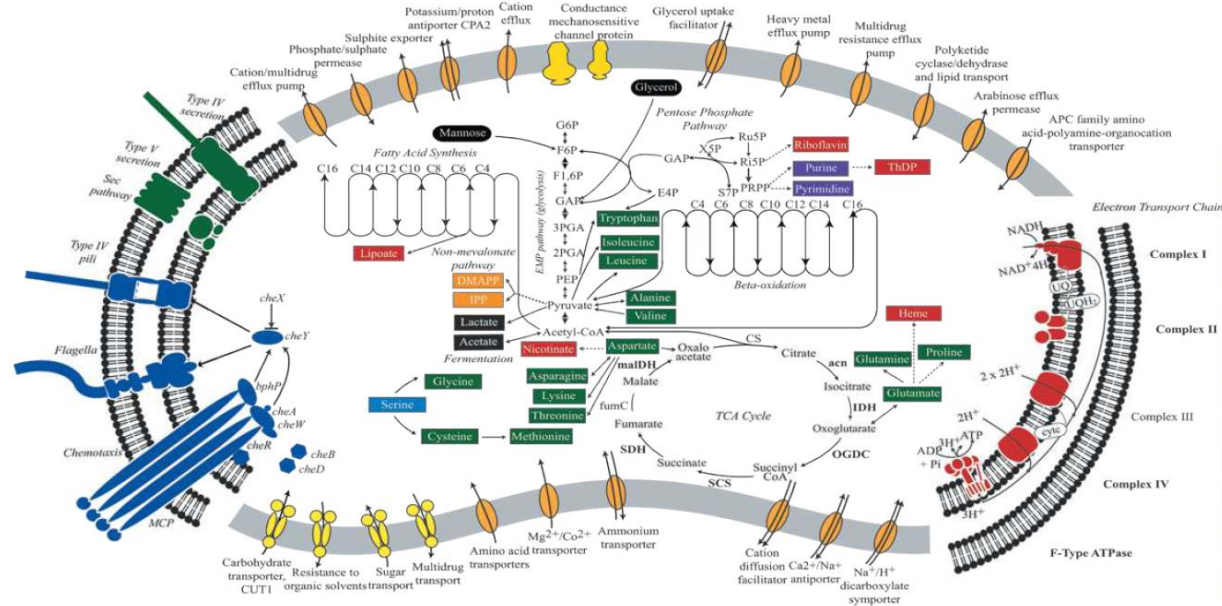
Gen İçeriği ve Yaşam Tarzı İlişkisi

- Bir organizmanın sahip olduğu genlerin bütünü, onun çevresel ve fizyolojik kapasitesini doğrudan yansıtır.
- Genomlar, organizmanın yaşam tarzına uyum sağlama süreciyle şekillenir ve karşılaştırmalı genomik analizler bu uyum mekanizmalarını anlamada önemli ipuçları sunar.
- *Vampirovibrio chlorellavorus*'un genomunun dizilenmesiyle, fotootrof genlerden yoksun olmasına rağmen Cyanobacteria filumuna ait olduğu ortaya çıkarılmıştır.
- Bu bulgu, yalnızca genom analizleriyle elde edilebilecek şaşırtıcı evrimsel ilişkilerin güzel bir örneğidir.



V. chlorellavorus'un Genom Analizi ve Yaşam Stratejisi

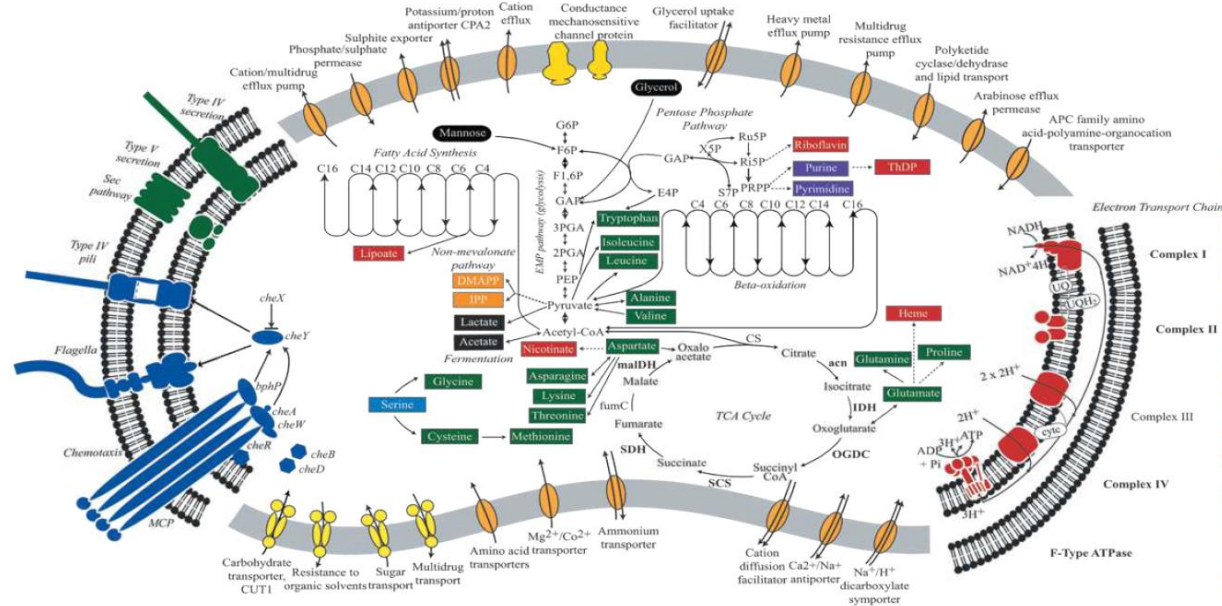
- Aşağıdaki figür, *V. chlorellavorus*'un genom anotasyonundan çıkarılan metabolik yollar ve taşıma sistemlerinin özetini göstermektedir.
- Bu yollar arasında mikroaerobik büyüme için bir elektron taşıma zinciri, fermentasyon yeteneği ve kemotaksi bulunur.



Soo, R.M., Woodroff, B.J., Parks, D.H., Yoon, G.W., and P. Huganmaltz, 2015, *PeerJ* 3: e808

V. cholerae'un Genom Analizi ve Yaşam Stratejisi

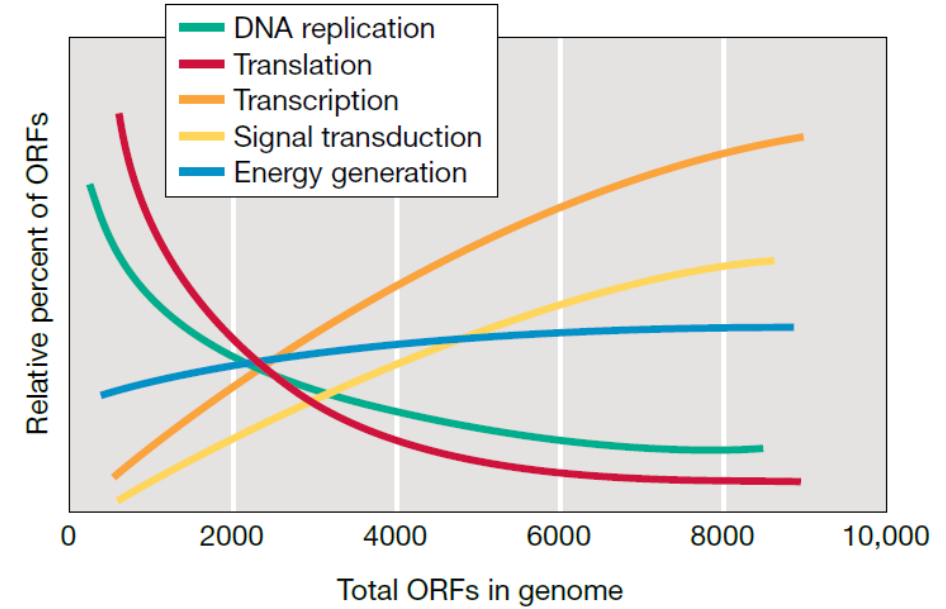
- Genom ayrıca 20 temel amino asidin 15'inin sentezlenebildiğini göstermektedir.
- Karşılaştırmalı genomikler, bu bakterinin avına saldırmak için konjugatif bir tip IV salgı sistemi kullandığını ortaya koymuştur.



Soo, R.M., Woodroff, B.J., Parks, D.H., Yoon, G.W., and P. Hugmoltz, 2015, *PeerJ* 3: e980

Bakteriyel Genomlarda Gen Kategorilerinin Dağılımı

- Genom büyüklüğü ile gen kategorileri arasında belirgin bir ilişki bulunmaktadır.
- Metabolik genler bakteriyel genomlarda genellikle en büyük sınıfı oluşturur; ancak genom küçüldükçe protein sentezi genleri oransal olarak daha baskın hale gelir.
- Protein sentezi genlerinin vazgeçilmezliği küçük genomlarda bu sınıfın yüksek yüzdede görülmesini açıklar.
- Buna karşılık büyük genomlarda transkripsiyonel düzenleme ve sinyal iletimiyle ilgili genlerin sayısı artar.



Archaea Genomlarında Gen İşlevlerinin Dağılımı

- Archaea genel olarak enerji ve koenzim üretimine bakteri genomlarından daha yüksek bir oranda gen ayırmaktadır.
- Bu durum özellikle metanojen Archaea'nın ürettiği çok sayıdaki yeni koenzim nedeniyle enerji ve koenzim alanına biraz kaymış olabilir.
- Archaea'da karbonhidrat metabolizması ve membran fonksiyonlarına yönelik genlerin bakteri genomlarına göre daha az olduğu görülmektedir.
- Ancak bu sonuçlar, Archaea'daki pek çok yolun yeterince çalışılmamış olması nedeniyle eksik tanımlanan genlerden kaynaklanıyor olabilir.

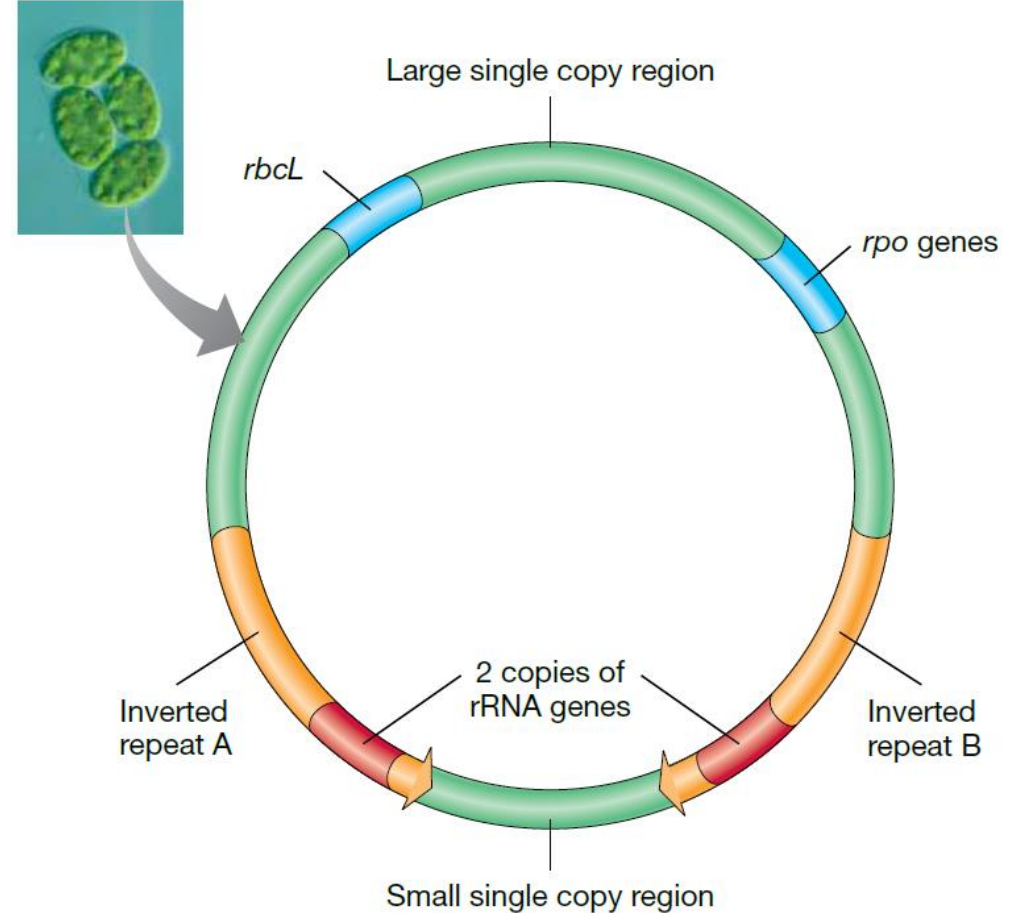
Ökaryotik Mikroorganizmalarda Organeller ve Genomların Genel Özellikleri

- Mitokondri ve kloroplastlar, endosimbiyotik bakterilerden türemiş olmaları nedeniyle Bacteria ile ortak birçok temel yapısal ve işlevsel özelliği paylaşır.
- Her iki organelin genomu, protein sentezi için gerekli ribozomlar, tRNA'lar ve translasyonu sürdürebilecek diğer bileşenleri kodlar.
- Çeşitli mikrobiyal ökaryotların genomları dizilenmiş olup boyutlarının oldukça geniş bir aralık gösterdiği görülmektedir.
- Bazı tek hücreli protozoonlar, örneğin serbest yaşayan *Paramecium* (40.000 gen) ve patojen *Trichomonas* (60.000 gen) insandan daha fazla gen taşır.



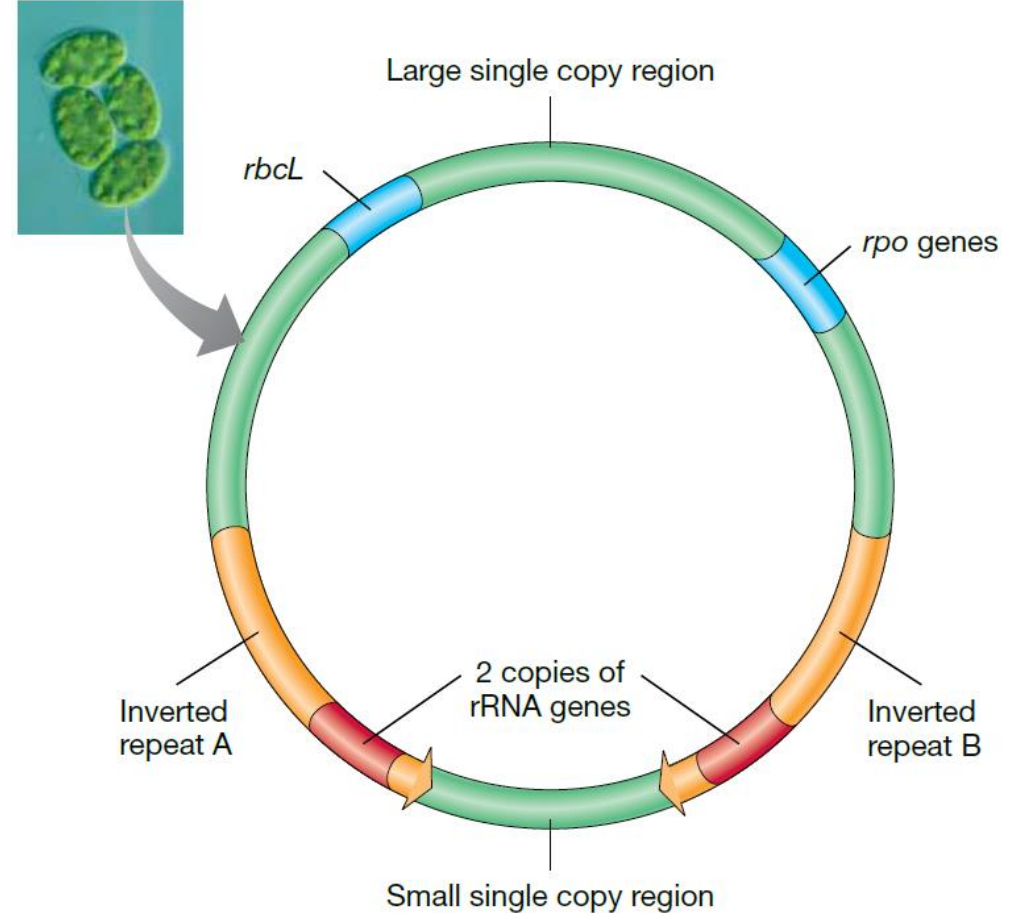
Kloroplast Genomunun Organizasyonu

- Bitki hücrelerindeki kloroplastlar fotosentezi gerçekleştiren organellerdir ve tüm bilinen kloroplast genomları halkasal DNA molekülleridir.
- Her kloroplast birden fazla özdeş genom kopyası içerir ve tipik kloroplast genomu 120–160 kbp uzunluğunda olup yanda gösterilen 6–76 kbp'lik iki ters tekrar bölgesi taşır.



Kloroplast Genomunun Organizasyonu

- Kloroplast genomundaki birçok gen, fotosentetik reaksiyonlar ve ototrofik metabolizma için gerekli proteinleri kodlar; örneğin RubisCO enziminin büyük alt birimini kodlayan *rbcL* geni kloroplast genomunda yer alır.
- RubisCO'nun küçük alt birimini kodlayan *rbcS* geni ise çekirdek genomundadır ve sentezlenen protein sitoplazmadan kloroplasta taşınır.

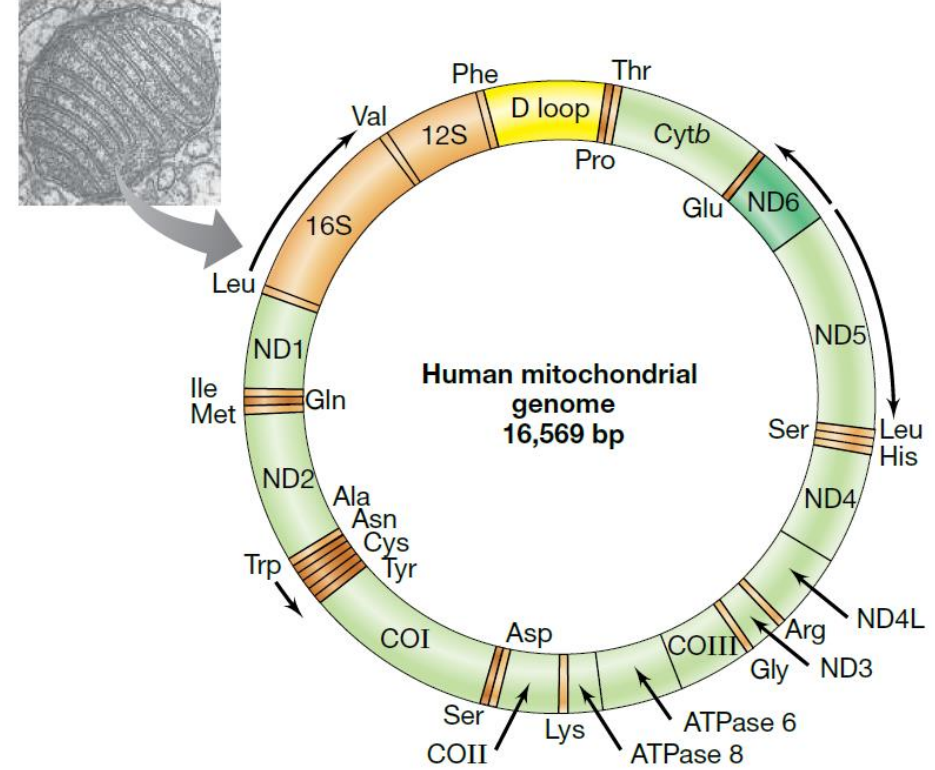


Kloroplast Genomlarının Genetik İçeriği ve Evrimsel İzleri

- Kloroplast genomu translasyonda kullanılan tRNA'ları, transkripsiyon ve translasyon için gerekli bazı proteinleri ve çeşitli başka proteinleri kodlar.
- Bununla birlikte, tüm kloroplast proteinleri kloroplast genomunda kodlanmaz; bir kısmı çekirdek genomuna taşınmış genlerin ürünleridir.
- Bu durum, kloroplastın endosimbiyotik bir hücreden evrimleşirken bazı genlerini konak çekirdeğine aktardığını düşündüren önemli bir evrimsel işarettir.
- Kloroplast genlerinde intronlar yaygındır ve çoğu kendiliğinden kesilebilen intron tipleridir.

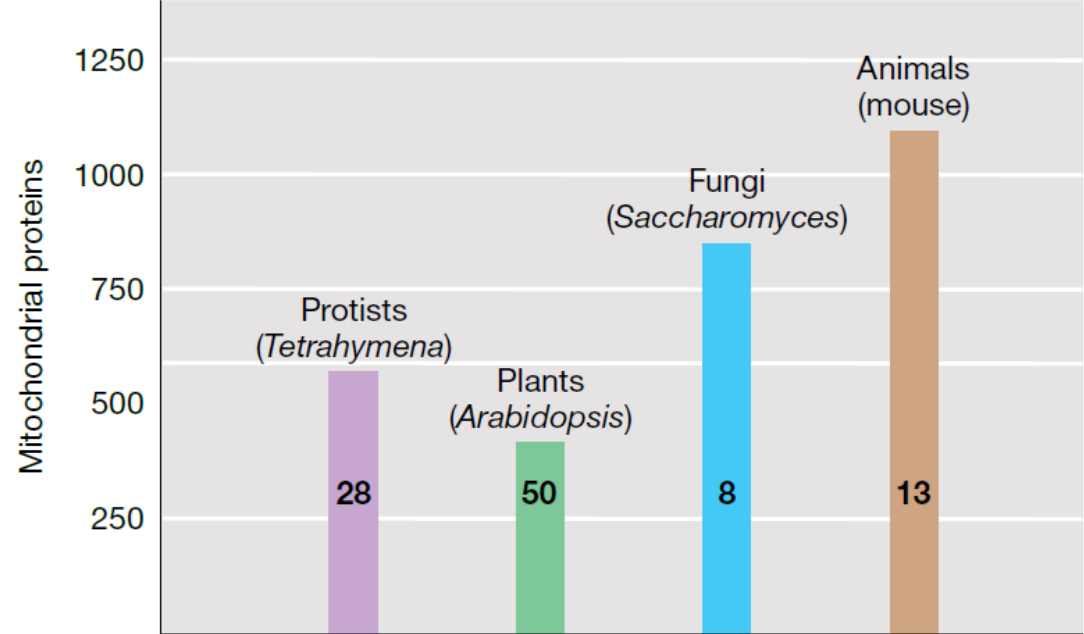
Mitokondri Genomlarının Temel Özellikleri

- Mitokondriler ökaryot hücrelerinde solunumdan sorumlu organeller olup yalnızca birkaç ökaryotta bulunmaz.
- Mitokondri genomları başlıca oksidatif fosforilasyon için gereken proteinleri kodlar ve ayrıca protein sentezi için gerekli proteinleri, rRNA'ları ve tRNA'ları içerir.
- Mitokondri genomları, kloroplastlara kıyasla çok daha az sayıda protein kodlar ve bilinen en büyük mitokondri genomu yalnızca 62 protein kodlayan gene sahiptir.
- İnsan da dâhil olmak üzere çoğu memelide mitokondri genomu 13 protein ile 22 tRNA ve 2 rRNA kodlar; 16.569 bp uzunluğundaki insan mitokondri genomunun haritası yanda verilmiştir.



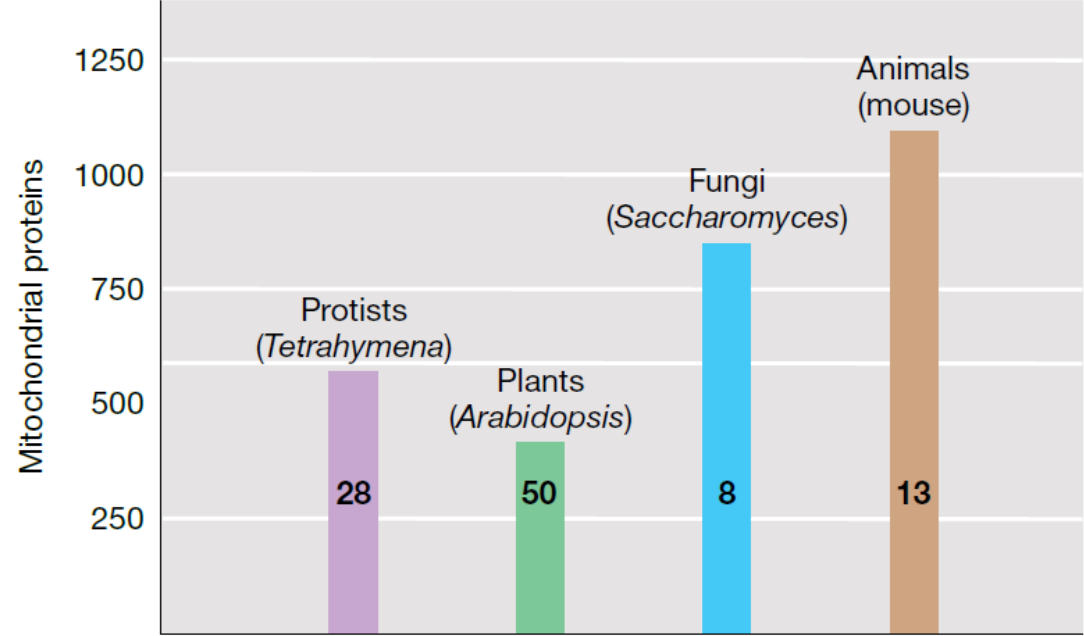
Mitokondri Genomlarının Çeşitliliği ve Ek Bileşenleri

- İnsan mitokondri genomu halkasal yapıdadır ancak bazı algler, protozoonlar ve mantarlar gibi organizmalarda mitokondri genomları doğrusal olabilir.
- Birçok mantar ve çiçekli bitkinin mitokondrileri, temel mitokondri genomuna ek olarak küçük halkasal veya doğrusal plazmitler de içerir.



Mitokondri Genomlarının Çeşitliliği ve Ek Bileşenleri

- Mitokondrinin işlevlerini sürdürebilmesi için genomunun kodladığından çok daha fazla proteine ihtiyaç duyulur; özellikle translasyon için gerekli birçok protein çekirdek genomunda kodlanır.
- Maya mitokondrisinin proteomu yaklaşık 800 farklı proteinden oluşur ve bunların yalnızca sekizi mitokondri genomu tarafından kodlanır; bu durum yanda gösterilmiştir.



Mitokondri Evrimi ve Nükleer Gen Transferinin İzleri

- Mitokondride işlev gören çekirdek kaynaklı proteinler, hem translasyon hem de enerji üretimi süreçlerinde görev alır ve Bacteria'daki homolog proteinlere ökaryotik sitoplazmadakilerden daha yakındır.
- Bu durum, mitokondrinin bakteriyel bir endosimbiyondan köken aldığını ve zamanla birçok genin konak çekirdeğine taşındığını gösteren güçlü bir evrimsel kanıttır.
- Kloroplastta olduğu gibi, mitokondrideki birçok temel işlevi sürdüren proteinlerin çekirdeğe taşınmış genler tarafından kodlanması, endosimbiyotik köken ile tutarlıdır.
- Böylece mitokondri, genomu oldukça küçülmüş olsa da, nükleer genom tarafından desteklenen geniş bir proteom aracılığıyla işlevlerini sürdüren bir organel hâline gelmiştir.

Mikrobiyal Ökaryotlarda Genom Büyüklükleri

- Parazitik ökaryot mikroorganizmalar genellikle 10–40 Mbp büyüklüğünde ve 4000–11.000 gen içeren küçük genomlara sahiptir.
- *Trypanosoma brucei*, 11 kromozomunda 35 Mbp DNA taşır ve yaklaşık 11.000 gene sahiptir.
- İnsanlarda sıtma yapan dört *Plasmodium* türünün genomları 14 kromozom üzerinde 23–27 Mbp ve yaklaşık 5500 gendir.

Nükleomorf Genomlarının Kökeni ve Özellikleri

- En küçük ökaryotik genomlar, belirli yeşil alglerin ikincil endosimbiyozla kazanılmış endosimbiyont kalıntıları olan nükleomorflarda görülür.
- Nükleomorf genomlarının büyüklüğü yaklaşık 0.37–0.85 Mbp aralığındadır.
- En küçük parazitik ökaryot genomu *Encephalitozoon intestinalis* türünde bulunur ve haploid genomu 11 kromozomda yalnızca 2.3 Mbp ile 1800 gen içerir.

Saccharomyces cerevisiae Genomu ve ORF Sayısı

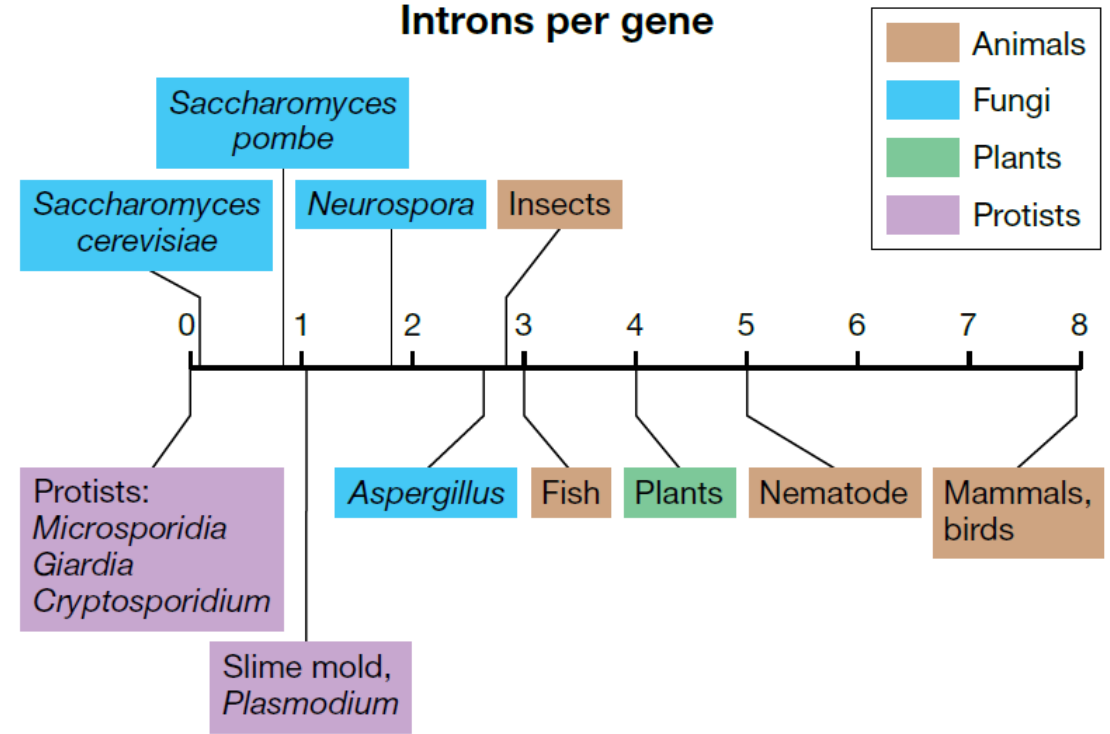
- Model ökaryot olan *Saccharomyces cerevisiae* 16 kromozomda toplam 13.4 Mbp DNA taşır.
- Maya genomu yaklaşık 6000 ORF içerir ve bu sayı bazı bakterilerin genomlarından bile daha düşüktür.
- Maya genlerinin hangilerinin yaşamsal olduğunu anlamak için her gen tek tek knock-out mutasyonlarıyla inaktive edilerek test edilmiştir.

Esansiyel Genlerin Belirlenmesi ve Knockout Yaklaşımı

- Knockout mutasyonları haploid hücrelerde esansiyel genlerde oluşturulamadığından, bu testleri gerçekleştirebilmek için maya diploid formda da büyütülmüştür.
- Diploid hücrelerde mutasyon oluşturulup haploidlerde yaşayıp yaşayamayacağı incelenerek genin esansiyel olup olmadığı belirlenmiştir.
- Bu çalışmalar sonucunda maya genomundaki yaklaşık 900 ORF'nin yüzde 17 oranında kesinlikle esansiyel olduğu gösterilmiştir.
- Esansiyel gen sayısı bakterilerde minimal gereksinim olarak tahmin edilen yaklaşık 300 genin oldukça üzerindedir.

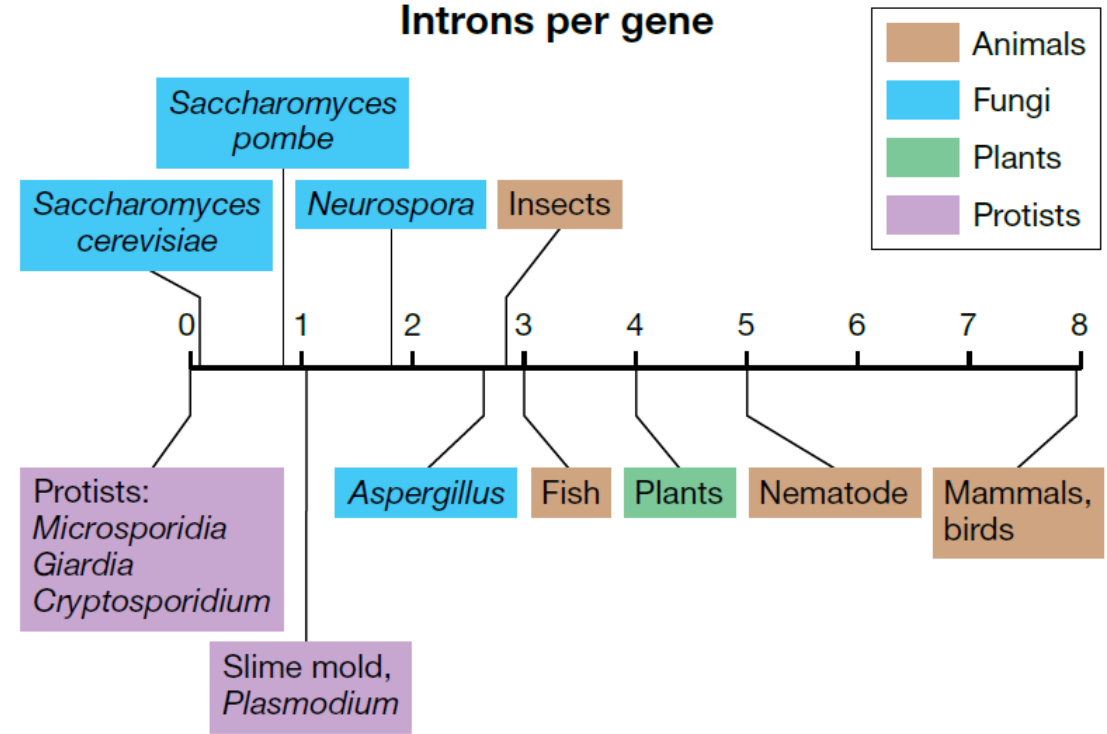
Maya Genomunda İntronların Dağılımı

- Maya bir ökaryot olmasına rağmen protein kodlayan genlerinde yalnızca 225 intron bulunur.
- İntron içeren maya genlerinin çoğunda, genin 5' ucuna yakın konumlanmış tek ve küçük bir intron yer alır.
- Bu durum, birçok introna sahip daha karmaşık ökaryotlardan belirgin şekilde farklıdır.



Ökaryotlarda İntron Sayılarının Karşılaştırılması

- *Caenorhabditis elegans* gen başına ortalama beş intron içerirken, *Drosophila* gen başına ortalama dört intron içerir.
- Bitkilerde intronlar yaygındır ve model bitki *Arabidopsis*'te gen başına ortalama beş intron bulunur; ayrıca *Arabidopsis* genlerinin yüzde 75'ten fazlası intron içerir.
- İnsanlarda neredeyse tüm protein kodlayan genlerde intron vardır ve pek çok gen 10'dan fazla introna sahiptir.



İnsan Genomunda İntron ve Ekzon Oranları

- İnsan genlerinde intronlar genellikle ekzonlardan çok daha uzundur.
- Ekzonlar tüm insan genomunun yalnızca yüzde 1'ini oluştururken intronlar yüzde 24 gibi büyük bir kısmı oluşturur.
- Geriye kalan DNA ise tekrarlı diziler, kodlamayan RNA'lar ve düzenleyici bölgelerden oluşur.

Karşılaştırmalı Genomik ve Evrimsel Perspektif

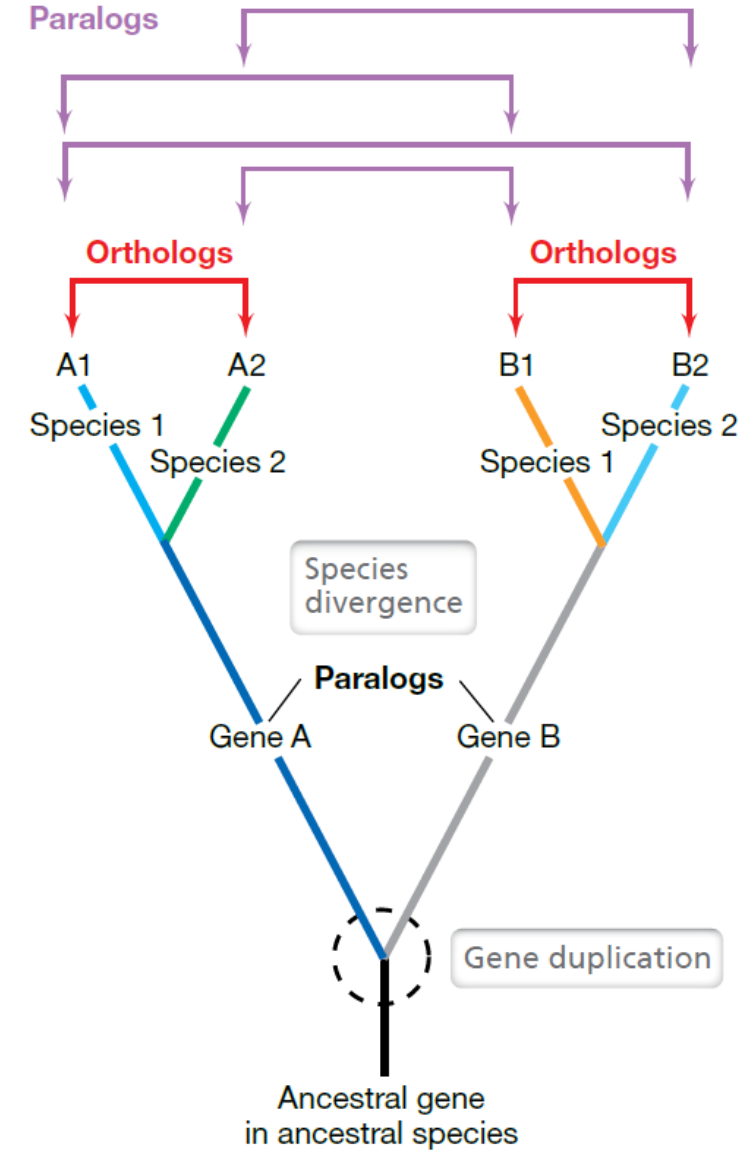
- Karşılaştırmalı genomik, organizmaların evrimsel ilişkilerini aydınlatarak hangi özelliklerin ilkel ya da türetilmiş olduğunu anlamaya yardımcı olur.
- Tek bir gene dayalı soy ağaçlarının belirsizliklerini gidermek için tüm genom dizilerine dayalı analizler kullanılabilir.
- Genomik çalışmalar, erken yaşam formlarını anlamak ve yaşamın kökeniyle ilgili temel soruları yanıtlamaya yaklaşmak için önemli bir araçtır.

Gen Aileleri ve Homolog Genler

- Prokaryot ve ökaryot genomlarında ortak evrimsel kökene sahip oldukları için birbirine benzeyen homolog gen kopyaları bulunur.
- Bir grup homolog gen, gen ailesi olarak adlandırılır ve daha büyük genomlarda gen ailelerinin daha çok üyesi bulunur.
- Gen duplikasyonu, gen ailelerinin ve bu aileleri taşıyan organizmaların evriminde önemli bir itici güç olarak kabul edilir.

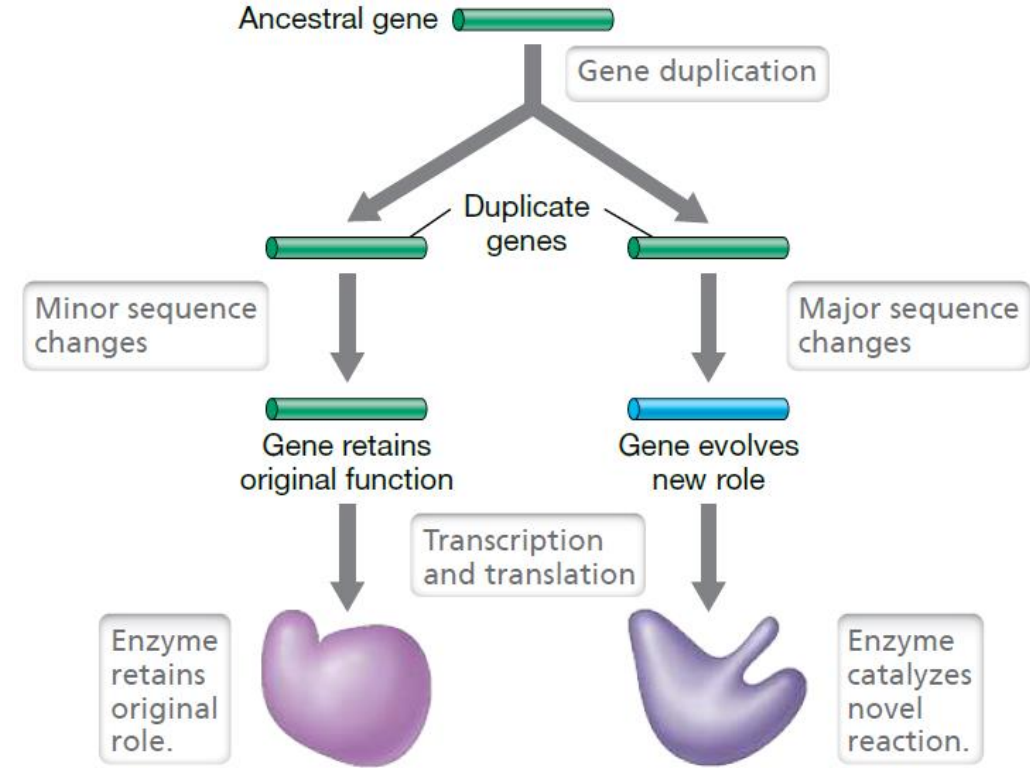
Paraloglar, Ortologlar ve Genlerin Evrimsel Kökeni

- Bir genin evrimsel süreçte aynı organizma içinde duplikasyonuyla ortaya çıkan homolog genler paralog olarak adlandırılır.
- Farklı organizmalarda ortak bir atadan türeyerek benzerlik gösteren genler ise ortolog olarak tanımlanır.
- İnsan LDH izoenzimleri paraloglara örnek oluştururken, *Lactobacillus* türündeki LDH insan LDH'sinin ortologudur.



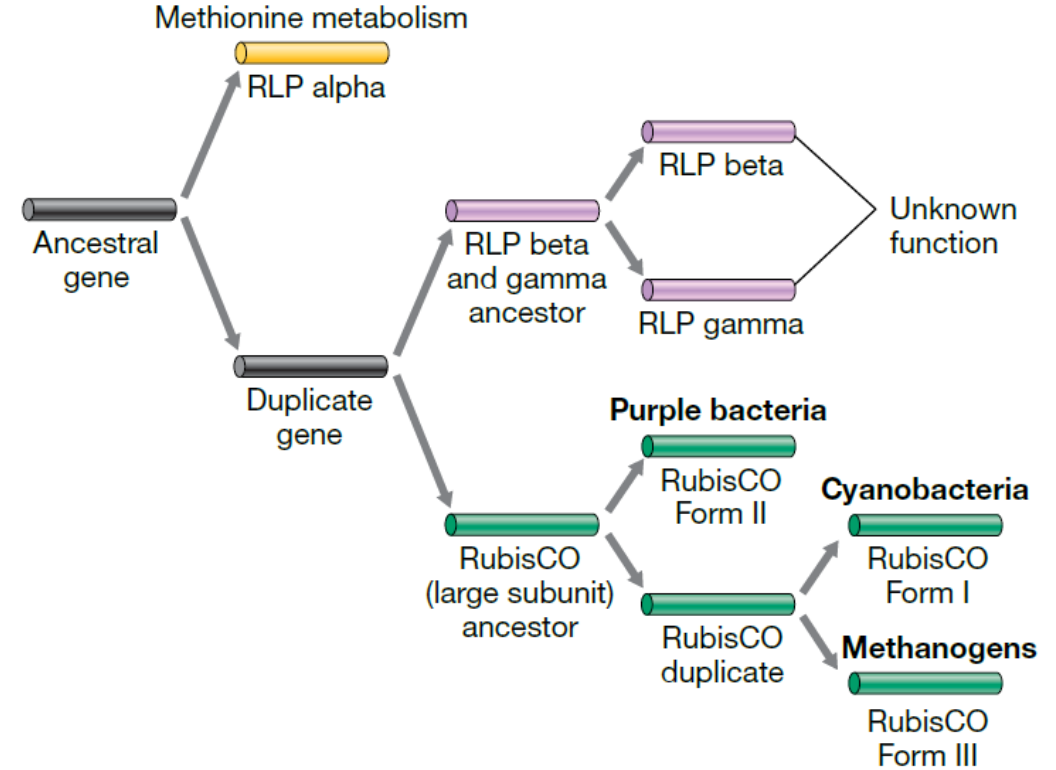
Gen Duplikasyonlarının Evrimsel Sonuçları

- Bir DNA segmentinin tüm genleriyle birlikte duplikasyonu, organizmanın bu genlerin birden fazla kopyasına sahip olmasına yol açar.
- Duplikasyon sonrası kopyalardan biri özgün işlevi sürdürürken diğeri mutasyonlarla değişime açıktır.
- Bu süreç, evrimin yeni işlevler geliştirmek üzere adeta “denemeler yapmasını” sağlar.



RubisCO Örneği ve Gen Ailesinin Evrimi

- Gen duplikasyonu ve sonrasındaki çeşitlenme olayları, birçok proteinin evrimsel kökeninin açıklanmasında önemli bir mekanizmadır.
- RubisCO enzim ailesi, atasal bir RubisCO geninin zaman içinde farklı fakat ilişkili katalitik özelliklere sahip enzimlere dönüşmesiyle şekillenmiştir.
- Bu tür duplikasyon ve çeşitlenme olayları, özellikle ototrofik metabolizma gibi temel biyolojik süreçlerde önemli evrimsel yenilikler oluşturur.



Tüm Genom Duplikasyonlarının Genel Çerçevesi

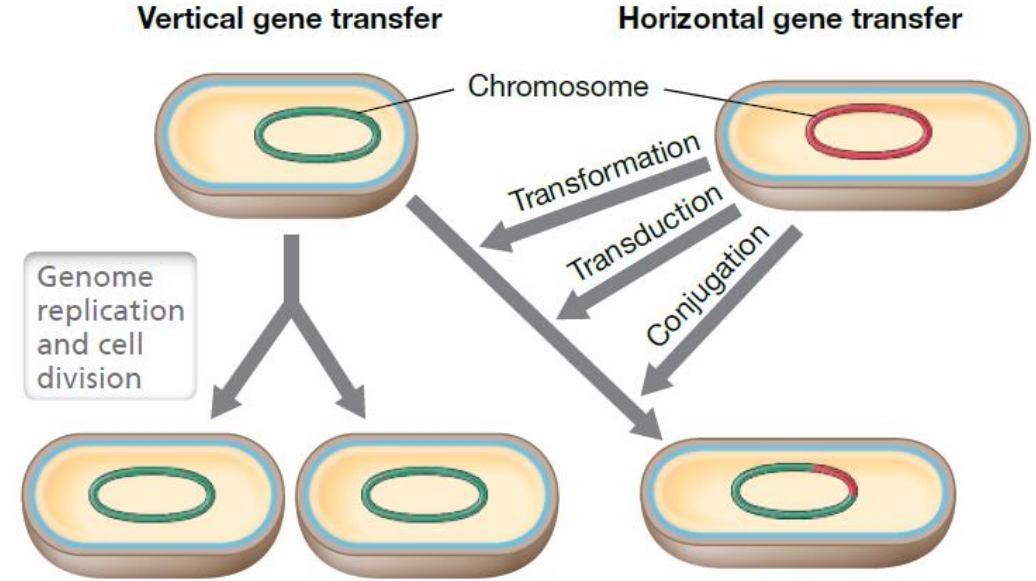
- Genetik materyaldeki duplikasyonlar birkaç bazdan tüm genlere hatta tüm genomlara kadar uzanan farklı ölçeklerde gerçekleşir.
- *Saccharomyces cerevisiae* genom karşılaştırmaları, atasal bir tüm genom duplikasyonunun gerçekleştiğini ve bunu geniş çaplı gen kayıplarının izlediğini göstermektedir.
- *Arabidopsis* genom analizi, çiçekli bitkilerin atasal soyunda bir ya da daha fazla tüm genom duplikasyonu bulunduğuna işaret eder.
- Bu bulgular, evrimsel süreçte büyük ölçekli genom duplikasyonlarının farklı organizma gruplarında tekrar eden bir tema olduğunu gösterir.

Prokaryot Genomlarında Duplikasyon ve Gen Kaybı Dinamikleri

- Bazı bakteriyel genomlarda geçmişte gerçekleşmiş olası genom duplikasyonlarının izleri görülmektedir.
- *Myxococcus*'un 9.1 Mbp'lik genomu, yakın akrabalarının genomlarının yaklaşık iki katı büyüklüğünde olup bu durum geniş çaplı duplikasyonlara işaret eder.
- Ancak prokaryotlarda küçük ölçekli gen duplikasyonları sık görülürken, tüm genom duplikasyonlarının oldukça nadir olduğu anlaşılmaktadır.
- Parazitik bakterilerde ardışık gen kayıpları, gereksiz genlerin ortadan kalkmasına ve özellikle böcek endosimbiontlarında gözlenen aşırı küçük genomlara yol açmıştır.

Yatay Gen Transferinin Genel İlkeleri

- Bakteri ve Archaea'da genler nesilden nesile dikey olarak aktarılırken, yatay gen transferi bu süreci çeşitlendiren ek bir mekanizmadır.
- Yatay transfer, genlerin hücreler arasında dikey süreç dışında gerçekleşen bir hareketidir ve bu durum genom analizlerini karmaşık hâle getirebilir.
- Prokaryotlarda yatay gen transferinin üç temel mekanizması transformasyon, transdüksiyon ve konjugasyondur.
- Bu süreçler, özellikle Bölüm 11'de ayrıntılı biçimde ele alınmaktadır.



Yatay Gen Akışının Genomlarda Saptanması

- Genomda anotasyon sonrası, yalnızca uzak akraba türlerde görülen proteinleri kodlayan genlerin varlığı yatay transferin güçlü göstergelerinden biridir.
- Genomun geri kalanından belirgin biçimde farklı GC içeriğine veya kodon kullanım önyargısına sahip DNA bölgeleri, bu bölgelerin yatay gen transferi yoluyla kazanılmış olabileceğini destekler.
- Bakteri ve Archaea genomlarında bu tür sinyallere dayalı çok sayıda yatay transfer örneği belgelenmiştir.
- *Thermotoga maritima* genomunda, 400'ü aşkın ve tüm genomun %20'sinden fazlasını oluşturan arkeal kökenli genlerin bulunması buna klasik bir örnektir.



Thermotoga Örneği ve Büyük Ölçekli Gen Aktarımları

- *Thermotoga maritima*'daki arkeal kökenli genlerden 81 tanesinin kümeler hâlinde bulunması, bu genlerin sıcak çevreyi paylaşan Archaea'dan topluca aktarıldığını düşündürür.
- Yatay transferin genomik olarak kolayca tespit edilebilmesi için organizmalar arasındaki filogenetik farkın belirgin olması gerekir.
- *Chlamydia trachomatis* genomunda bulunan histon H1-benzeri iki gen, muhtemelen ökaryotik bir kaynaktan insandan aktarılan genlere işaret eder.
- Buna karşın yakın akraba türler arasındaki yatay aktarımlar daha az belirgin olduğundan genom anotasyonu sırasında kolayca gözden kaçabilir.



Yatay Transferin İşlevsel Sonuçları ve Sınırlılıkları

- Yatay taşınan genler çoğunlukla merkezi moleküler süreçleri değil, metabolik işlevlere katkı veren genleri kapsar.
- Archaea ve Bacteria arasında paylaşılan bazı metabolik genlerin benzerliği bu tür transferlerle açıklanabilir.
- Birçok patojen bakterideki virülans genlerinin yatay yollarla kazanıldığı bilinmektedir.
- Yine de bir gene ait homologların henüz genomu çözümlenmemiş yakın türlerde bulunabileceği unutulmamalıdır.

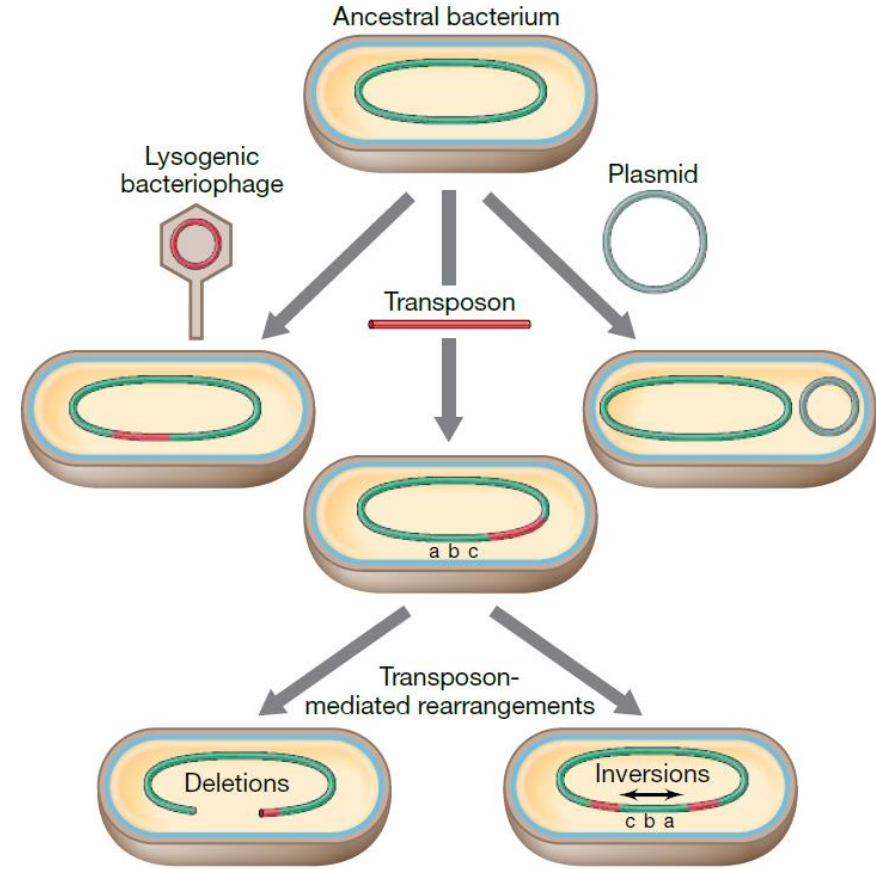


Mobilom ve Genom Evrimindeki Rolü

- Yatay gen akışını kolaylaştıran mobilom, bir genomdaki tüm hareketli genetik elementlerin toplamıdır.
- Mobilom; plazmidleri, profajları, integronları, insersiyon dizilerini ve transpozonları içerir.
- Integronlar, integras enzimi aracılığıyla gen kasetlerini yakalayabilen genetik yapılardır.
- Mobilomun bileşenleri türler arasında genleri taşıyarak genom evriminde önemli bir rol oynar.

Transpozonların Hareketi ve Genom Üzerindeki Etkileri

- Transpozonlar, transpozaz enziminin yardımıyla kromozom, plazmid ve virüs genomları arasında hareket eder.
- Bu hareket sırasında antibiyotik direnci veya toksin üretimi gibi özellikleri kodlayan genleri yanlarında taşıyabilirler.
- Transpozonlar, geniş ölçekli kromozomal değişikliklere neden olarak güçlü bir evrimsel itici güç oluşturur.
- Özellikle hızlı evrim geçiren bakteriler, yüksek sayıda hareketli element ve insersiyon dizisi taşır.



İnversiyon Dizileri ve Kromozomal Yeniden Düzenlemeler

- Aynı inversiyon dizileri arasında gerçekleşen rekombinasyon olayları delesyon, inversiyon ve translokasyon gibi büyük kromozomal yeniden düzenlemelere yol açar.
- Bu tür yeniden düzenlemeler, stresli büyüme koşullarında doğal seçilimin üzerinde çalışabileceği genetik çeşitliliği oluşturur.
- Birçok patojen bakterinin evriminde inversiyon dizilerinin kritik rol oynadığı görülmektedir.
- Bu nedenle, özellikle patojen evriminde hareketli elementler önemli bir itici güç olarak karşımıza çıkar.

Bordetella Örneği ve Patogenezde Genom Akışı

- *Bordetella bronchiseptica* 5.3 Mbp'lik genomuna rağmen bilinen hiçbir insersiyon dizisi taşımazken, yakın akrabası *Bordetella pertussis* 4.1 Mbp'lik genomunda 260'dan fazla insersiyon dizisi içerir.
- Genom karşılaştırmaları, bu insersiyon dizilerinin *B. pertussis* genomunda büyük çaplı yeniden düzenlemeleri tetiklediğini göstermektedir.
- Bu yeniden düzenlemeler, genomun küçölmesine ve virölans faktörlerini artırmaya yönelik bir “genom sadeleşmesi” sürecine işaret eder.
- Böylece insersiyon dizileri, bazı patojenlerde artan patojenik potansiyelle ilişkili olabilir.

Mobilomun Sonuçları ve Kromozomal Adalar

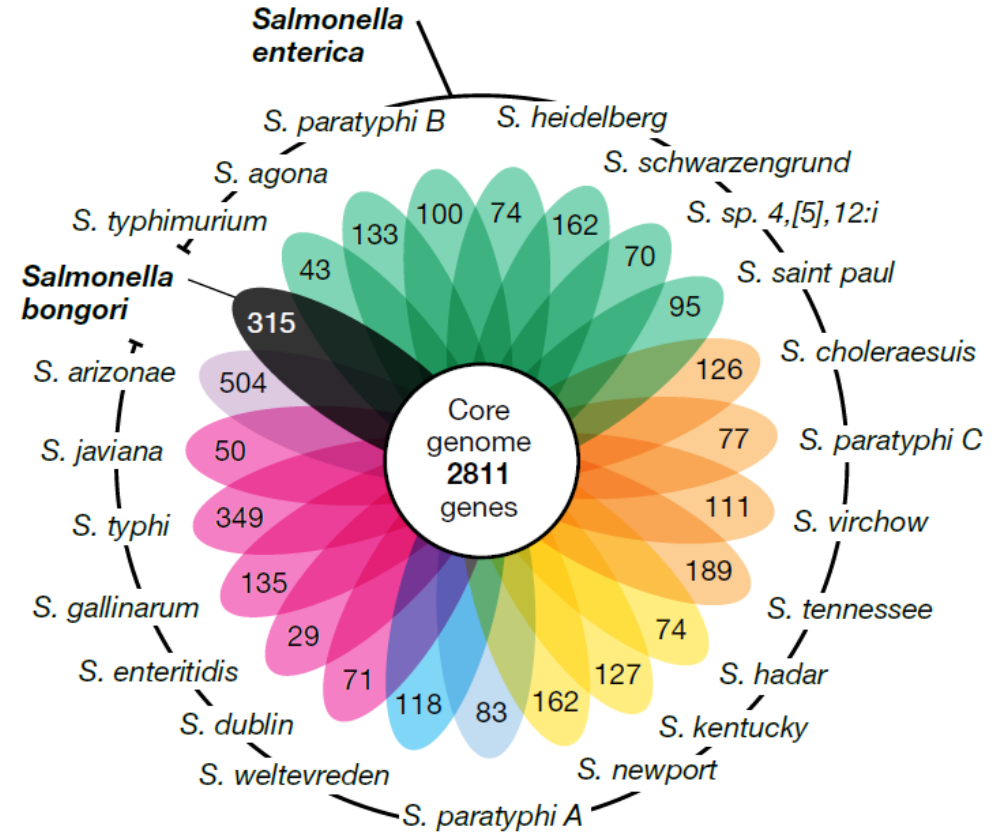
- Mobilom, özellikle transpozonlar ve profajların yatay transferiyle bazı genomlarda kromozomal adaların oluşumundan sorumludur.
- Kromozomal adalar, genellikle belirli işlevsel özellikleri barındıran ayrık DNA bölgeleridir.
- Bu adalar, organizmanın ekolojik nişine uyumunda önemli rol oynayabilecek gen kümeleri taşıyabilir.
- Bu noktadan itibaren, kromozomal adaların genomdaki konumları ve işlevleri ele alınacaktır.

Çekirdek Genom ile Pan Genom Arasındaki Temel Ayrım

- Çekirdek genom, bir türün tüm suşları tarafından paylaşılan ortak genleri ifade eder ve türün genel karakteristiğini temsil eder.
- Pan genom ise çekirdek genomun yanı sıra tüm suşlar arasında paylaşılmayan ek genleri de kapsayarak türün toplam gen repertuarını oluşturur.
- Yatay gen transferinin yaygınlığı nedeniyle aynı bakteriyel tür içinde DNA miktarı ve aksesuar yetenekler oldukça değişken olabilir.
- Pan genomun bileşenleri çoğunlukla hareketli genetik elementlerden oluştuğu için belirli suşlarda bulunup diğerlerinde bulunmayabilir.

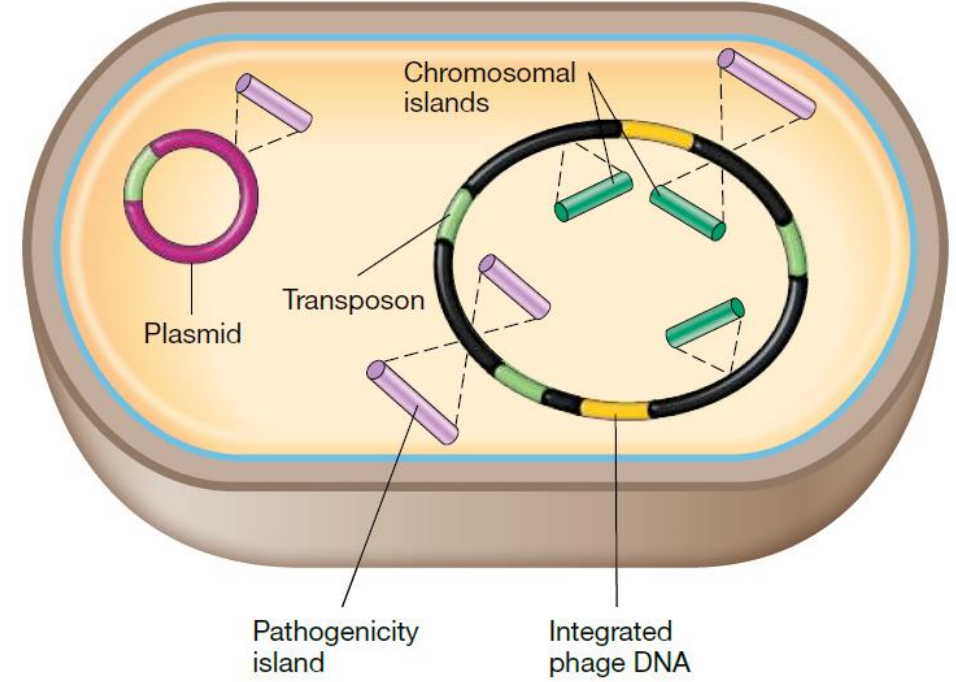
Pan Genomun Genişliği ve Çeşitliliği

- Bir türün pan genom büyüklüğü, yeni suşların genomları dizilendikçe artmaya devam ettiği için tam olarak belirlenmesi zordur.
- *Escherichia coli* ve *Salmonella enterica* gibi enterik bakterilerde birçok hareketli element taşıyan çok çeşitli izolatlar bulunduğundan pan genom oldukça geniştir.
- Yanda, *S. enterica* serovarlarının sahip oldukları ortak ve farklı genler “flowerplot” şemasıyla gösterilmektedir.
- Bu suşların hepsinde en az 2811 gen bulunmakla birlikte bazıları yüzlerce ek gene daha sahiptir.



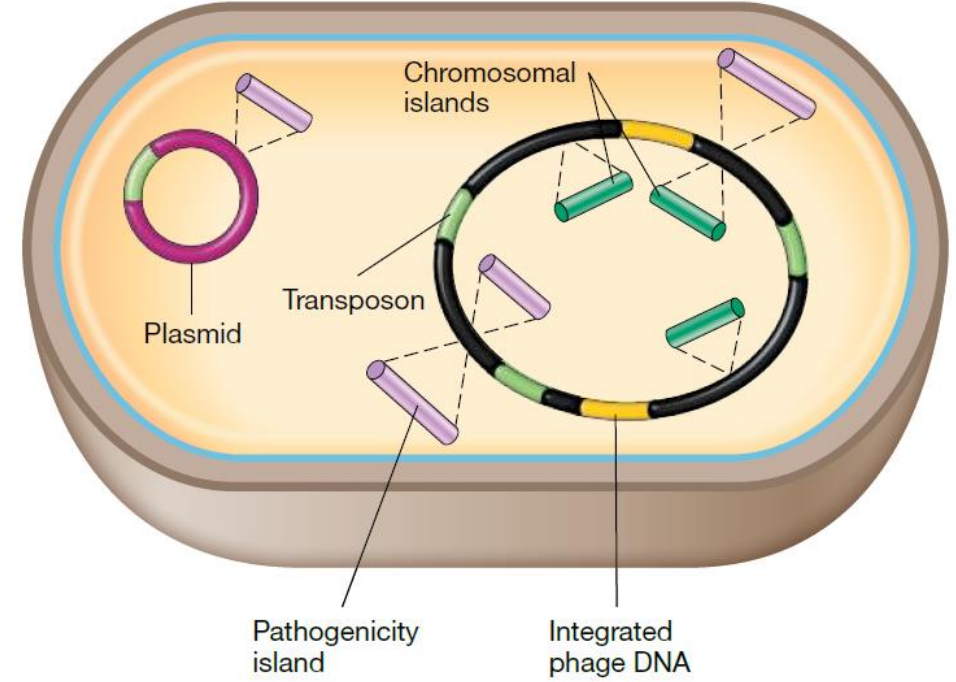
Kromozomal Adalar: Tür İçinde Genomik Çeşitlilik Kaynakları

- Çekirdek ve pan genom karşılaştırmaları, bazı türlerde plazmid veya virüs kökenli olmayan fakat kromozom üzerinde yer alan ek DNA bloklarını ortaya çıkarmıştır.
- “Kromozomal ada” veya “genomik ada” olarak adlandırılan bu bölgeler, yaşamsal olmayan ancak özel işlevler kazandıran gen kümeleri taşır ve suşlar arasında büyük genom boyutu farklarına yol açabilir.



Kromozomal Adalar: Tür İçinde Genomik Çeşitlilik Kaynakları

- Kromozomal adaların yabancı kökenli olduğu düşünülür çünkü çoğu ters tekrarlarla çevrilidir ve taban bileşimi ile kodon kullanımları genomun geri kalanından farklılık gösterir.
- Aynı türün bazı suşlarında bulunurken diğerlerinde bulunmamaları, bu adaların yatay transferle kazanılmış olabileceğini düşündürür.



Kromozomal Adaların İşlevleri ve Özel Örnekler

- Patojen bakterilerdeki birçok kromozomal ada, hastalıkla ilişkili fonksiyonları kodlayan gen kümeleri içerdiği için büyük ilgi görmüştür.
- Bununla birlikte aromatik hidrokarbonlar veya herbisitler gibi kirleticilerin biyolojik parçalanmasını sağlayan genleri içeren adalar da tanımlanmıştır.
- *Rhizobium* türlerinde, bitki ile simbiyotik ilişki için gerekli birçok genin kromozomal adalarda bulunduğu bilinmektedir.
- *Magnetospirillum*'daki en özgün adalardan biri, hücrenin manyetik alanda yönelimini belirleyen magnetozomların oluşumunu kodlayan magnetozom adasıdır.

Kromozomal Adaların Genetik Hareketliliği ve Evrimi

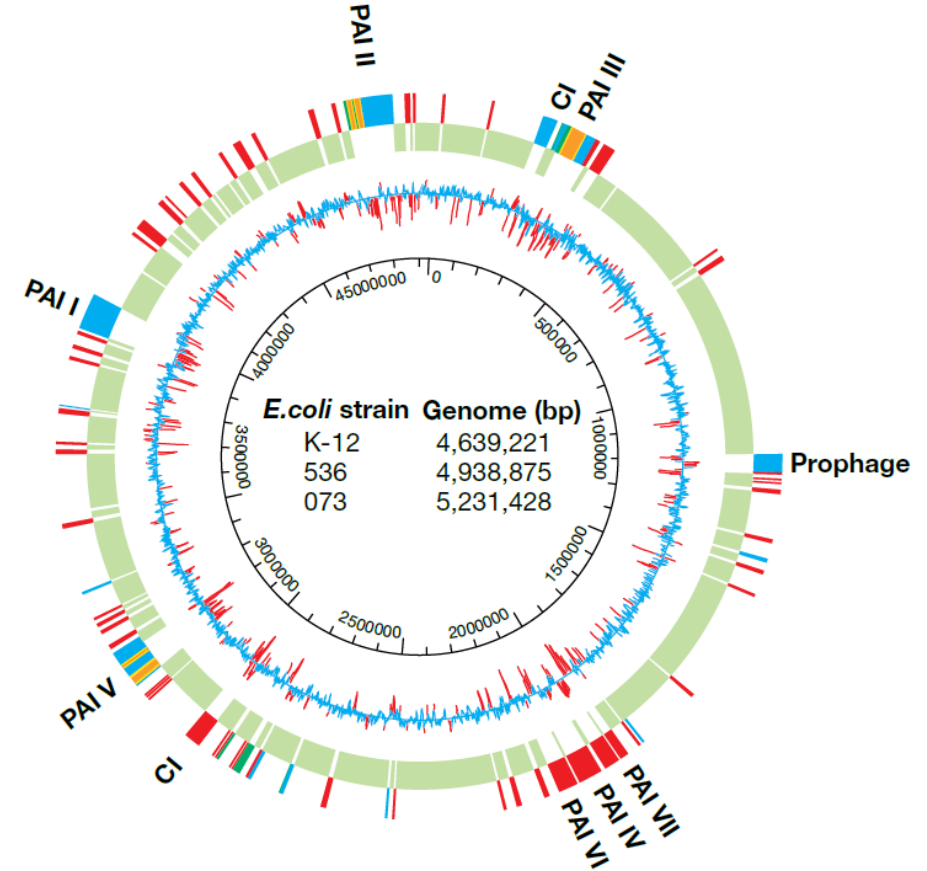
- Bazı adalar, integras enzimini kodlayan genler taşır ve bu durum onların konjugatif transpozonlara benzer biçimde hareket edebildiğini düşündürür.
- Genellikle tRNA genlerine yerleşirler ve hedef bölgenin çoğalması sayesinde ekleme sonrası tRNA geni bozulmadan korunur.
- Laboratuvarı bazı adaların bütün halinde ilgili bakteriler arasında aktarılabildiği gösterilmiştir ve bu transfer yatay gen aktarımının bilinen mekanizmalarıyla gerçekleşebilir.
- Yeni bir konak genomuna girdikten sonra zamanla mutasyon biriktirerek hareket kabiliyetlerini kaybetmeye eğilimlidirler.

Patojenite Adaları ve Virölansın Evrimi

- Patojen bakterilerin genomları ile zararsız akrabalarının genomlarının karşılaştırılması, virölans faktörlerini kodlayan özel kromozomal adaları ortaya çıkarmıştır.
- Bu adalarda toksinler, enzimler, özel proteinler veya hastalık gelişimini kolaylaştıran yapısal unsurlar bulunabilir.
- Bazı virölans genleri lizojenik fajlarda veya plazmidlerde taşınsa da pek çoğu kromozomal bölgelere kümelenmiş hâlde bulunur.
- Bu nedenle patojenite adaları, bakteriyel virölansın evrimini anlamada önemli bir genetik bileşen oluşturur.

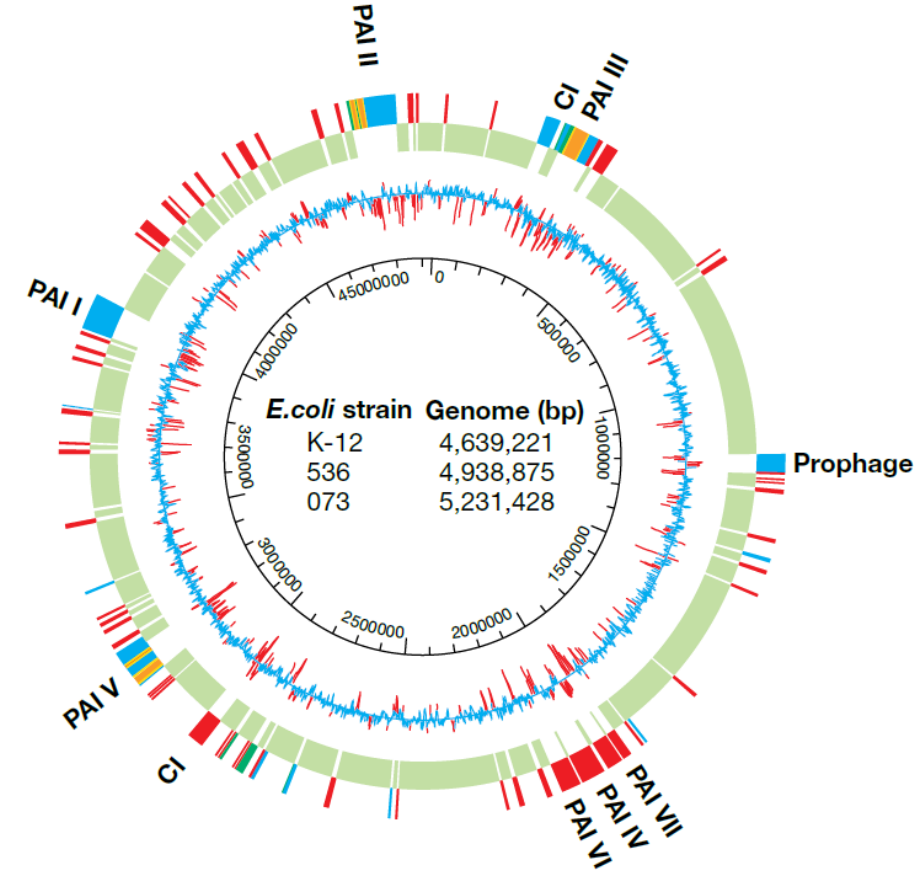
E. coli'de Patojenite Adaları ve Suşlar Arası Farklılıklar

- Uropatojenik *E. coli* suşlarında bulunan patojenite adaları ayrıntılı biçimde incelenmiş ve bu adaların pek çok virülans faktörünü kodladığı gösterilmiştir.
- Yalnızca birkaç *E. coli* suşu idrar yolu enfeksiyonlarına neden olur çünkü bu suşlar dokuya tutunmayı sağlayan adezinler ve bağışıklıktan kaçmayı kolaylaştıran kapsül gibi faktörler taşır.



E. coli'de Patojenite Adaları ve Suşlar Arası Farklılıklar

- *E. coli* K-12 gibi zararsız bir laboratuvar suşu ile 073 suşu aynı çekirdek genomu paylaşırsa da 073 suşu genomunun %11 daha fazla DNA içerdiği ve bunun büyük kısmının patojen yaşam tarzıyla ilişkili olduğu bilinmektedir.
- Bu farklar, pan genomun suşlar arasında ne kadar işlevsel çeşitlilik yarattığını açıkça ortaya koyar.



Staphylococcus aureus'ta Küçük Patojenite Adaları ve Transdüksiyon

- Gram pozitif patojen *Staphylococcus aureus*'un bazı suşlarında, virülans faktörlerini kodlayan küçük patojenite adaları bulunur ve bu adalar ılımlı (temperate) fajlar aracılığıyla hücreler arasında taşınabilir.
- Bu adalar faj genomundan daha küçük oldukları için kromozomdan ayrılıp çoğaldıklarında hatalı faj partiküllerinin oluşumuna yol açarlar.
- Bu partiküller faj genomunu taşıyamaz ancak adaların genlerini taşıyarak enfekte ettikleri hücrelere adaları aktarabilirler.
- Böylece ada taşımayan *S. aureus* suşları öldürülmeden adaları kazanarak daha güçlü patojenlere dönüşebilir.

Hücresel İşlevleri Anlamaya Giden Yol: Fonksiyonel Omics'e Giriş

- Dizilenmiş ve anotasyonu yapılmış bir genom, aslında bir organizmanın yalnızca bir “parça listesi” niteliğindedir ve bu liste tek başına hücresel işleyişi açıklamaz.
- Bir hücrenin nasıl çalıştığını anlamak için genlerin hangi koşullarda ifade edildiğini ve bu gen ürünlerinin ne iş yaptığını bilmek gerekir.
- Ayrıca, sentezlenen proteinlerin aktivitelerini ve hücre büyümesi sırasında ortaya çıkan metabolitleri de anlamak büyük önem taşır.
- Bu nedenle fonksiyonel omics, genom bilgisini hücresel süreçlerle ilişkilendiren temel bir yaklaşım olarak değerlendirilir.

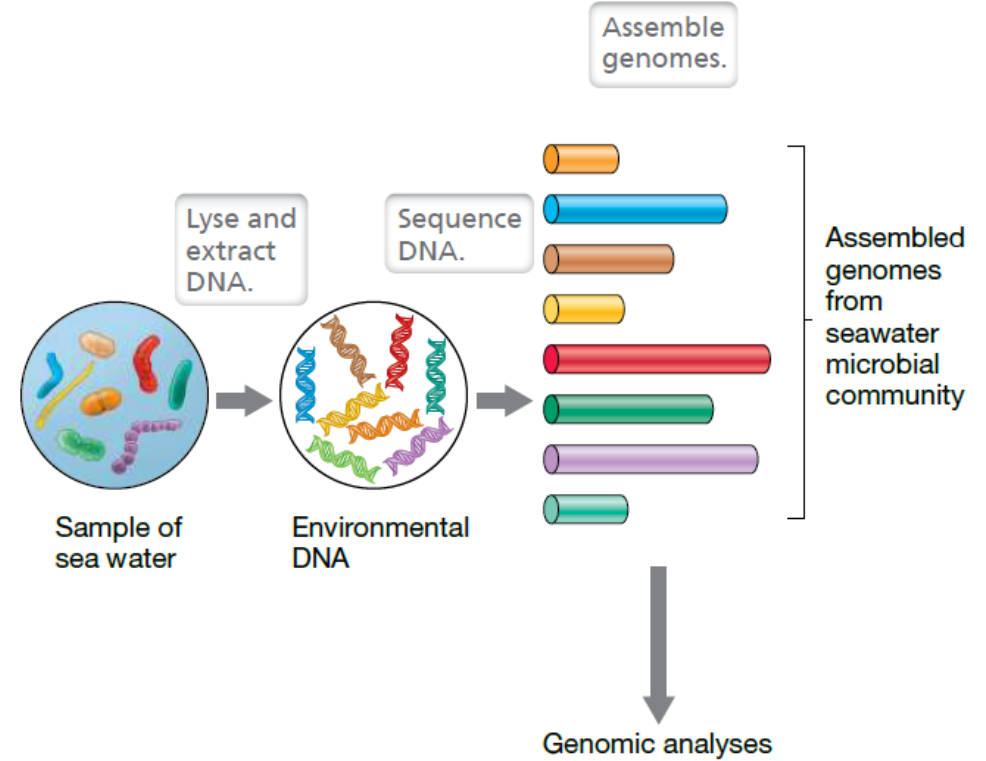
Omics Kavramı ve Kapsamı

- RNA, protein veya metabolitlerin tamamı belirli koşullar altında sentezlenen moleküler kümelerini oluşturur ve bunlar sırasıyla transkriptom, translatom ve metabolom olarak adlandırılır.
- Bu kümeleri inceleyen bilim alanları, ilgili terimlerin sonuna “-omic” eklenmesiyle tanımlanan çalışma disiplinleridir.
- Bu terminoloji, moleküler biyoloji ve mikrobiyoloji araştırmalarında hücresel süreçleri bütüncül olarak incelemeyi mümkün kılar.
- Yandaki tablo, günümüzde mikrobiyolojide kullanılan temel “omics” terimlerini özetlemektedir.

Some omics terminology	
DNA	Genome the total complement of genetic information of a cell or a virus Metagenome the total genetic complement of all the cells present in a particular environment Epigenome the total number of possible epigenetic changes Methylome the total number of methylated sites on the DNA (whether epigenetic or not) Mobilome the total number of mobile genetic elements in a cell
RNA	Transcriptome the total RNA produced in an organism under a specific set of conditions
Protein	Proteome the total set of proteins encoded by a genome; sometimes also used in place of <i>translatome</i> Translatome the total set of proteins present under specified conditions Interactome the total set of interactions between proteins (or other macromolecules) Secretome the total set of proteins secreted by a cell
Metabolites	Metabolome the total complement of small molecules and metabolic intermediates Glycome the total complement of sugars and other carbohydrates
Organisms	Microbiome the total complement of microorganisms in an environment (including those associated with a higher organism) Virome the total complement of viruses in an environment Mycobiome the total complement of fungi in a natural environment

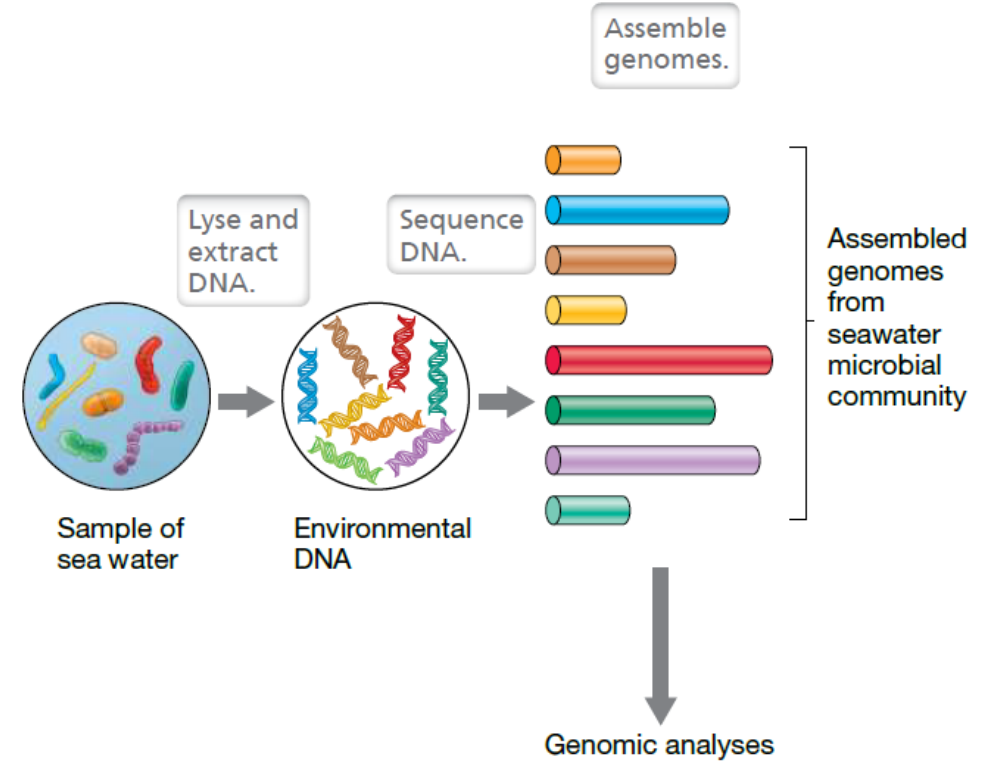
Metagenomik: Çevresel Örneklerden Genetik Bilgi Toplamak

- Doğal mikrobiyal topluluklar birçok kültüre edilmemiş ve tanımlanmamış mikroorganizmayı içerir, bu nedenle bu toplulukları anlamak için metagenomik yaklaşım geliştirilmiştir.
- Metagenomik, çevreden alınan bir örnekteki (ör. toprak, deniz suyu, bağırsak içeriği) farklı organizmalara ait DNA veya RNA'nın tek tek organizmalar izole edilmeden birlikte (havuzlanmış halde) toplanıp toplu olarak analiz edilmesine dayanır.



Metagenomik: Çevresel Örneklerden Genetik Bilgi Toplamak

- Bir topluluğun tüm gen içeriği, tek bir organizmanın genomuna benzer şekilde “metagenom” olarak adlandırılır.
- Ayrıca metatranskriptomik veya metaproteomik gibi RNA veya proteine dayalı analizler de doğal topluluklardaki gen ifadesi kalıplarını incelemek için kullanılabilir.



Metagenomik Çalışmalarda Tek Hücre Analizleri

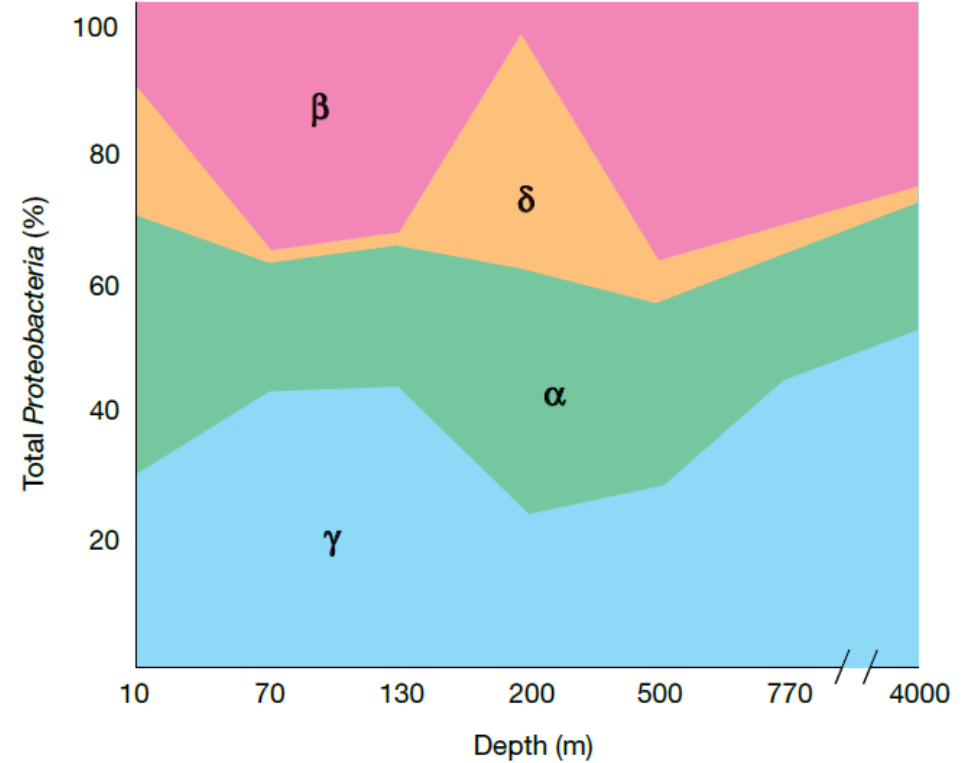
- Günümüzde kullanılan moleküler teknolojiler sayesinde metagenomik analizler yalnızca topluluk düzeyinde değil, bireysel hücreler üzerinde de yapılabilmektedir.
- Bu gelişme, karmaşık mikrobiyal topluluklarda türlerin rollerini ayrıntılı biçimde çözmeyi kolaylaştırır.
- Böylece, daha önce erişilemeyen nadir veya kültüre edilemeyen türlerin genetik özellikleri de ortaya çıkarılabilir.

Metagenomik Araştırma Alanları: Örnek Çalışmalar

- Birçok farklı çevre, büyük ölçekli metagenom dizileme projeleriyle araştırılmıştır ve bu çalışmalar mikrobiyal çeşitliliğin anlaşılmasına önemli katkılar sağlamıştır.
- Aşırı asidik maden atık suları gibi ekstrem ortamlarda tür çeşitliliği düşük olduğu için topluluk DNA'sının büyük bölümü bireysel genomlara yakın doğrulukta birleştirilebilmektedir.
- Buna karşılık, verimli topraklar veya sucul ortamlar gibi karmaşık ekosistemlerde genom birleştirmesi çok daha zordur.
- Şimdiye kadarki metagenomik çalışmaların ilginç bir bulgusu, doğal habitatlardan elde edilen genlerin çoğunun hücrelerden değil virüslerden kaynaklanmasıdır.

Derin Denizlerde Hücre Dışı DNA ve Ekolojik Önemi

- Birçok çevrede tam genomları birleştirmek mümkün olmasa bile metagenomik taramalar çok değerli bilgiler sağlar.
- Proteobakterilerin alt gruplarının derinlik boyunca dağılımı yanda gösterilmiş olup çevresel faktörlerle ilişkileri analiz edilebilmektedir.
- Doğal ortamlarda bulunan DNA'nın önemli bir kısmı canlı hücrelerde değildir; okyanuslardaki DNA'nın yaklaşık %50–60'ı hücre dışı formdadır.
- Bu DNA'nın, üst katmanlardaki organizmaların ölerek deniz tabanına çökmesiyle biriktiği ve küresel fosfor döngüsünde önemli bir rezervuar oluşturduğu düşünülmektedir.



İnsan Mikrobiyomu: Vücudumuzdaki Görünmez Topluluklar

- İnsan vücudu yaklaşık 10 trilyon hücre içerirken, bunun yaklaşık on katı kadar prokaryotik hücreyi de taşır ve bu topluluk “insan mikrobiyomu” olarak adlandırılır.
- Bu mikrobiyal topluluğun büyük kısmı kalın bağırsakta bulunur ve çoğunlukla Bacteroidetes ile Firmicutes filumlarına aittir.
- İlginç bir bulgu, bağırsak mikrobiyomunun bileşiminin obezite ile ilişkilendirilmesidir; özellikle Firmicutes oranı arttıkça obezite eğiliminin güçlendiği görülmektedir.
- Bu ilişkinin olası bir açıklaması, Firmicutes üyelerinin lifleri daha fazla yağ asidine dönüştürmesi ve böylece konak için ek karbon kaynağı sağlamasıdır.

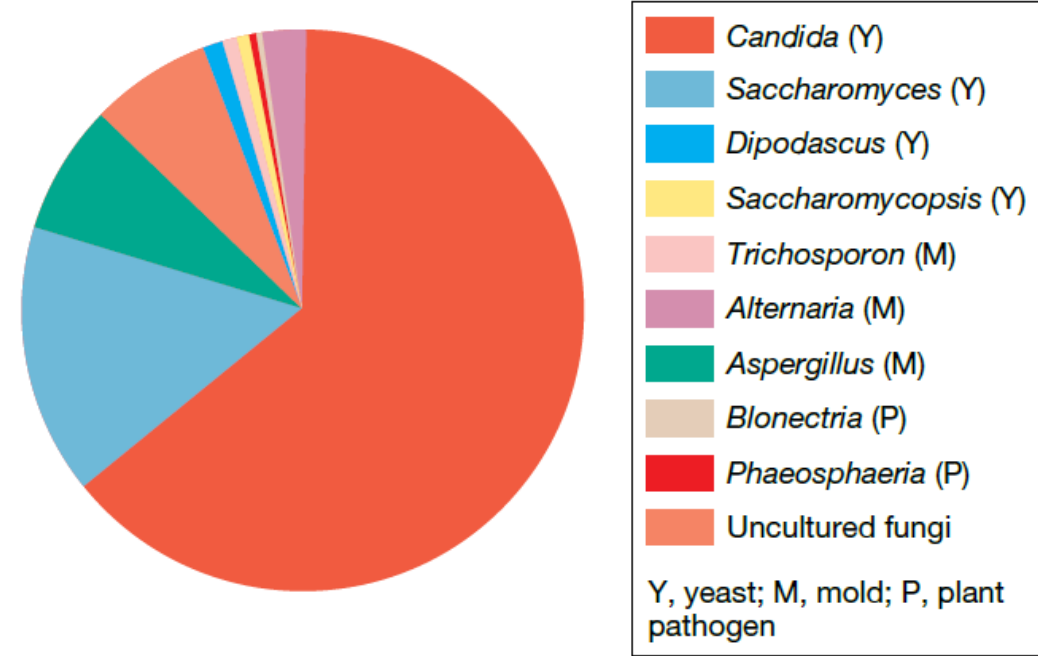


Bağırsak Mikrobiyomu ve Obezite İlişkisi

- Hem insanlar hem de deney fareleri üzerinde yapılan çalışmalar, Firmicutes oranının arttığı bağırsak mikrobiyomlarında obezitenin daha yaygın olduğunu göstermiştir.
- Fermentatif Firmicutes türlerinin diyet liflerini daha fazla yağ asidine dönüştürdüğü ve bu nedenle konak tarafından daha çok enerji emildiği düşünülmektedir.
- Bu bulgu, bağırsak mikrobiyomunun metabolik hastalıklarla ilişkisini anlamak açısından önemli bir örnektir.

Bağırsak Mantar Topluluğu: Gut Mycobiome

- Son yıllarda insan ve fare bağırsak mikrobiyomlarının analizleri, bağırsakta 60'tan fazla mantar türünün bulunduğunu ortaya koymuştur.
- Bu fungal topluluk “gut mycobiome” olarak adlandırılmaktadır.
- *Saccharomyces*, *Cladosporium* ve *Candida* gibi yaygın maya türleri hem dış yüzeylerde hem de bağırsakta bulunur; bazı türler ise potansiyel patojen özellik taşır.
- Bu mantar topluluğu, mikrobiyomun yalnızca %1'inden azını oluştursa da enflamatuar bağırsak hastalığı ve bazı obezite türleriyle güçlü ilişkiler göstermektedir.



Metagenomik ve Klinik Uygulamalar: Hastalıklarla İlişkilerin Keşfi

- Metagenomik, belirli mikrobiyal toplulukların belirli hastalıklarla ilişkisini araştırmada güçlü bir araç olarak görülmektedir.
- Bazı durumlarda nedensel ilişki güçlü şekilde düşünüldüğünde metagenomik yöntemler tanısal amaçlarla da kullanılabilir.
- Bu yaklaşım, hem insanlarda hem de hayvanlarda mikrobiyal popülasyonlarla hastalıklar arasındaki olası bağlantıları ortaya çıkarmada büyük bir potansiyel sunar.
- Bu nedenle metagenomik, modern mikrobiyoloji ve tıp alanlarında önemli bir araştırma ve klinik tanı aracı olarak değerlendirilmektedir.

Genom Dizilerinden Transkriptomik Yaklaşımlara Geçiş

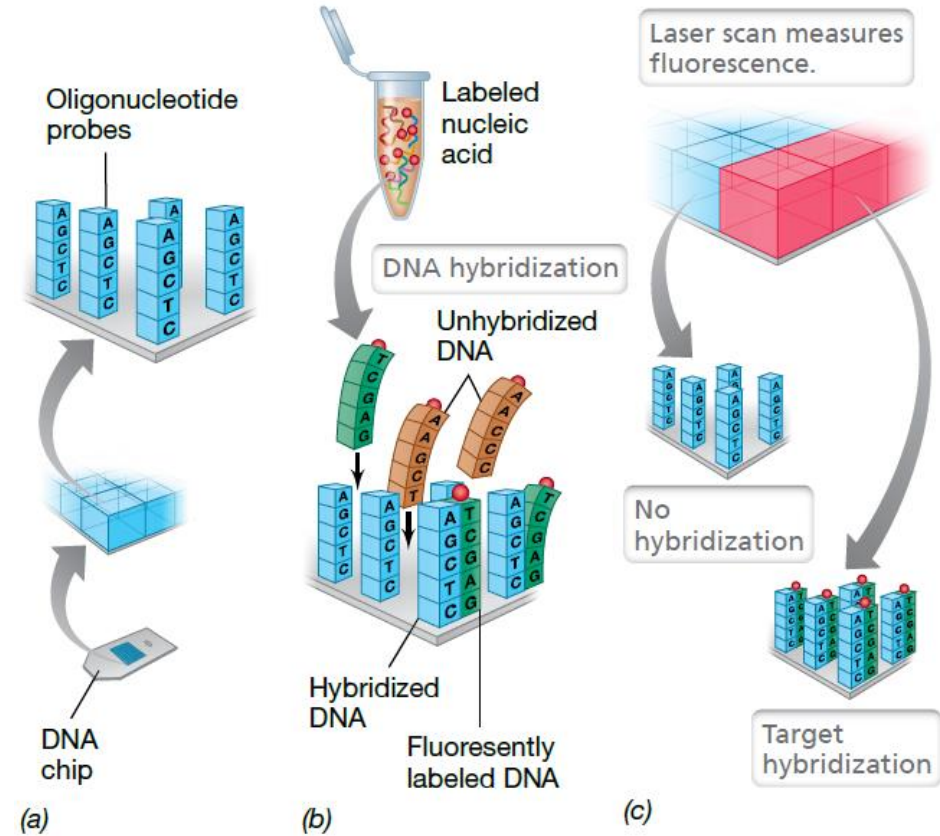
- Bir genom dizisi elde edildiğinde, bu bilgi gen çiplerinin sentezlenmesinde kullanılarak belirli mikroorganizmaların saptanması veya yakın akraba suşlar arasındaki genom farklılıklarının ortaya konulması mümkün olur.
- Gen çipleri, DNA'ya bağlanan proteinlerin hangi dizilere tutunduğunu belirlemede ve genlerin hangi koşullarda ifade edildiğini ölçmede önemli araçlardır.
- Transkriptomik, bir hücrenin belirli bir koşul altında ürettiği tüm RNA'ların incelenmesiyle transkripsiyonun genel bir görünümünü sağlar.
- İşlevi bilinmeyen genlerin hangi koşullarda ifade edildiğini öğrenmek, bu genlerin hücre içindeki rollerine dair ipuçları kazandırır.

Transkriptomikte Kullanılan İki Temel Yaklaşım

- Transkriptomik çalışmalarında iki ana yöntem kullanılır ve bunlar mikroarray teknolojisi ile RNA-Seq yaklaşımıdır.
- Mikroarray'ler, genom dizisine dayalı olarak önceden belirlenen oligonükleotid dizileriyle çalışırken RNA-Seq doğrudan RNA dizilemeye dayanır.
- Her iki yöntem de hücrenin verdiği transkripsiyonel yanıt hakkında geniş kapsamlı bilgiler sağlar.
- Bu bilgiler, genlerin çevresel koşullara nasıl tepki verdiğini anlamak için kritik öneme sahiptir.

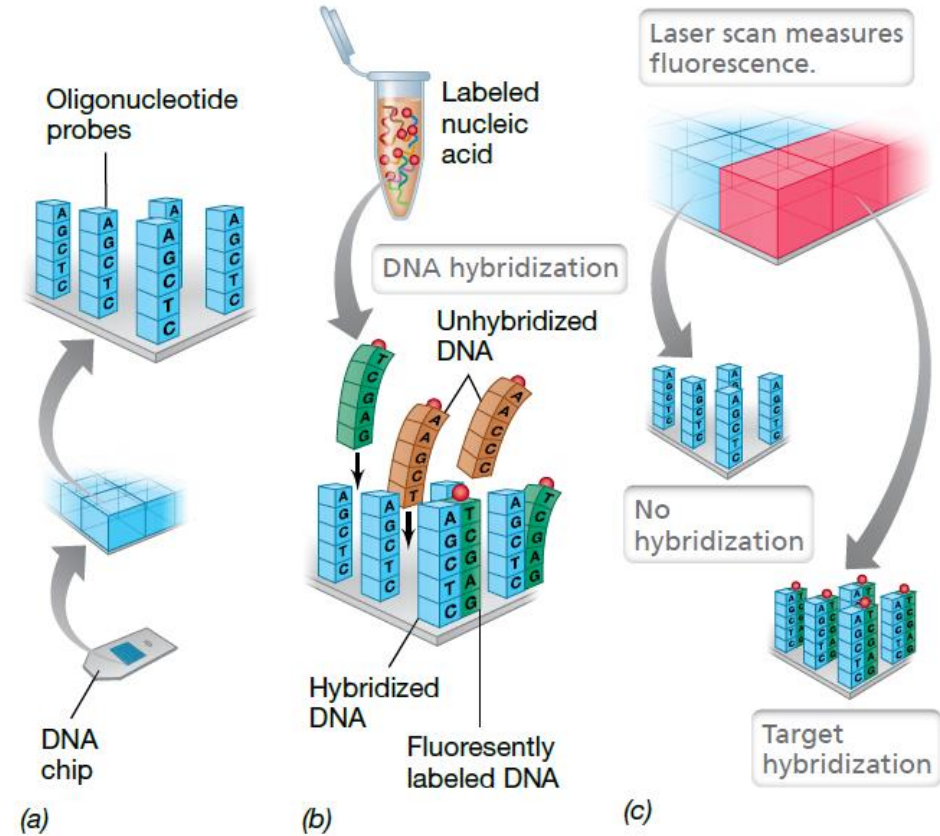
Mikroarray Teknolojisine Genel Bakış

- Mikroarray'ler, genlerin ya da gen parçalarına karşılık gelen oligonükleotidlerin düzenli bir desen içinde sabitlendiği küçük ve katı yüzeylerdir; bu nedenle gen çipi olarak da adlandırılırlar (Figür a).
- Mikroarray'ler, çipe bağlanmış DNA dizilerine hibritleşen DNA veya RNA miktarını ölçerek çalışır.
- Denatüre edilen DNA'nın tek iplikli hâle gelmesi, tamamlayıcı dizilerle hibrit çift iplikli yapılar oluşturmaya olanak tanır (Figür b).
- Tanımlı diziler içeren bu tek iplikli nükleik asit parçalarına "prob" denir ve prob-hedef hibritleşmesi floresanla tespit edilir (Figür b, c).



Hibritleşmenin Tespiti ve Problemlerin Rolü

- Hibritleşmenin saptanabilmesi için çipe eklenen nükleik asitler floresan bir boya ile işaretlenir.
- Hibritleşmiş çip, lazerli bir floresan tarayıcıyla okunarak hangi problemlerde hibritleşme olduğu belirlenir (Figür b, c).
- Bu yaklaşım, belirli DNA veya RNA segmentlerinin doğru şekilde tanımlanmasına olanak tanır.
- Böylece hem genlerin varlığı hem de ifade düzeyleri hakkında güvenilir bilgiler elde edilir.



Gen Çiplerinin Yapısı ve Kullanım Alanları

- Gen çipleri genellikle 1–2 cm büyüklüğündedir ve kolayca işlenebilmeleri için plastik bir tutucuya yerleştirilir (Figür a).
- Her bir çip binlerce farklı DNA parçasını içerir ve güvenilirliği artırmak için çoğu gen birden fazla kez temsil edilir.
- Tüm genom mikroarray'leri, bir organizmanın genomunun tamamını kapsayan diziler içerir.
- Örneğin insan genomunu kapsayan bir çip, 47.000'den fazla transkript ve klinik tanı amaçlı ek oligonükleotidler için alan barındırır.



(a)

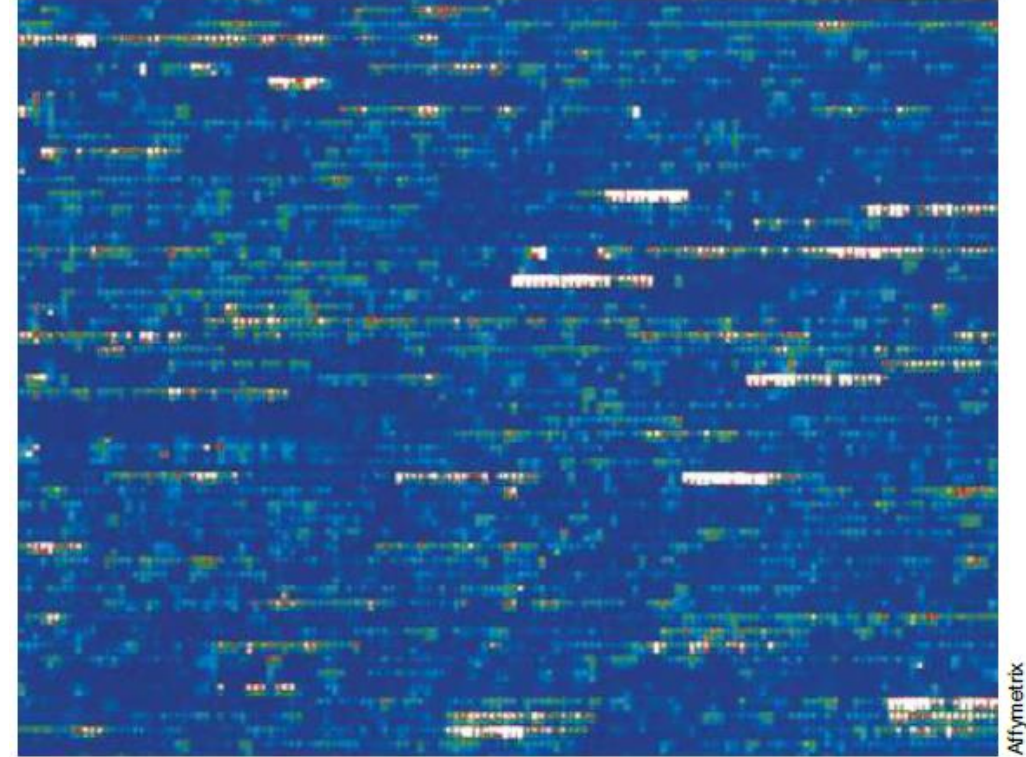


Gen İfadesini Ölçmeye Yönelik Mikroarray'ler

- Gen ekspresyon mikroarray'lerinde her gen için genom dizisine göre tasarlanmış özgün probler bulunur.
- Bu diziler, belirli koşullarda yetiştirilen hücrelerden elde edilen işaretli RNA'larla hibritleştirildikten sonra taranır ve bilgisayar analizine tabi tutulur.
- mRNA düzeyleri doğrudan ölçülemeyecek kadar düşük olduğundan, mRNA önce amplifiye edilip cDNA'ya çevrilir.
- Elde edilen hibritleşme verileri, hücrenin hangi genleri ne düzeyde ifade ettiğini ortaya koyar.

Tüm Genom İfadesinin İzlenmesi

- Evrensel gen ekspresyonunu belirlemek için total RNA veya cDNA, tüm genomu temsil eden oligonükleotid dizilerine hibritleştirilir.
- Yandaki figür, maya *Saccharomyces cerevisiae*'ye ait 6000'den fazla protein kodlayan gen probunu içeren bir çipten alınan hibritleşme görüntüsünü gösterir.
- Floresansın varlığı ve şiddeti, hangi genlerin hangi düzeylerde ifade edildiğini ortaya koyar ve bu sonuçlar maya kültürünün transkriptomunu tanımlar.
- Böyle bir analiz, farklı büyüme koşullarında gen ekspresyonundaki değişimleri sistematik olarak ortaya çıkarmayı sağlar.



Anaerobiden Aerobiğe Geçişin Transkriptomik İzleri

- Maya hem fermentasyon hem de solunumla büyüeyebildiğinden, ortam anaerobikten aerobik koşullara değıştirildiğinde gen ifadelerinde büyük bir yeniden düzenlenme görülür.
- Fermentasyonda gerekli olan etanol üretiminden sorumlu genler güçlü biçimde baskılanır.
- Buna karşılık, sitrik asit döngüsüne ait genler aerobik büyüme için gerektiğinden güçlü şekilde aktive olur.
- Toplamda 700'den fazla gen açılırken 1000'den fazla gen kapanır ve bilinmeyen işlevli proteinlere ait genlerin düzenleme desenleri de ipuçları sunar.

Mikroarray'lerin Mikrobiyal Tanımlamada Kullanımı

- Mikroarray'ler belirli mikroorganizmaların tanımlanmasında da kullanılabilir.
- Örneğin ID çipleri, *Escherichia coli* O157:H7 gibi belirli patojenlere özgü DNA dizilerini saptamak için geliştirilmiştir.
- Bu yaklaşım özellikle gıda endüstrisinde kontaminant takibi için değerlidir.
- Çip üzerindeki hibritleşme yanıtı, patojenin varlığını veya yokluğunu hızlı bir şekilde gösterebilir.



PhyloChip'ler ve Çevresel Mikrobiyal Çeşitlilik Analizi

- Çevresel örneklerde mikroorganizma çeşitliliğini belirlemek için 16S rRNA dizilerine dayanarak tasarlanmış PhyloChip'ler kullanılır.
- Bu çipler, farklı bakteriyel türlerin 16S rRNA dizilerine tamamlayıcı oligonükleotidler içerir.
- Çevreden elde edilen total DNA veya RNA bu problemlerle hibritleştirildiğinde türün varlığı hibritleşme sinyaliyle anlaşılır.
- Spesifiklikleri yüksek olsa da DNA izolasyonu ve dizileme maliyetlerinin düşmesiyle metagenomik yaklaşımlar günümüzde daha yaygın tercih edilmektedir.

RNA-Seq Analizine Giriş

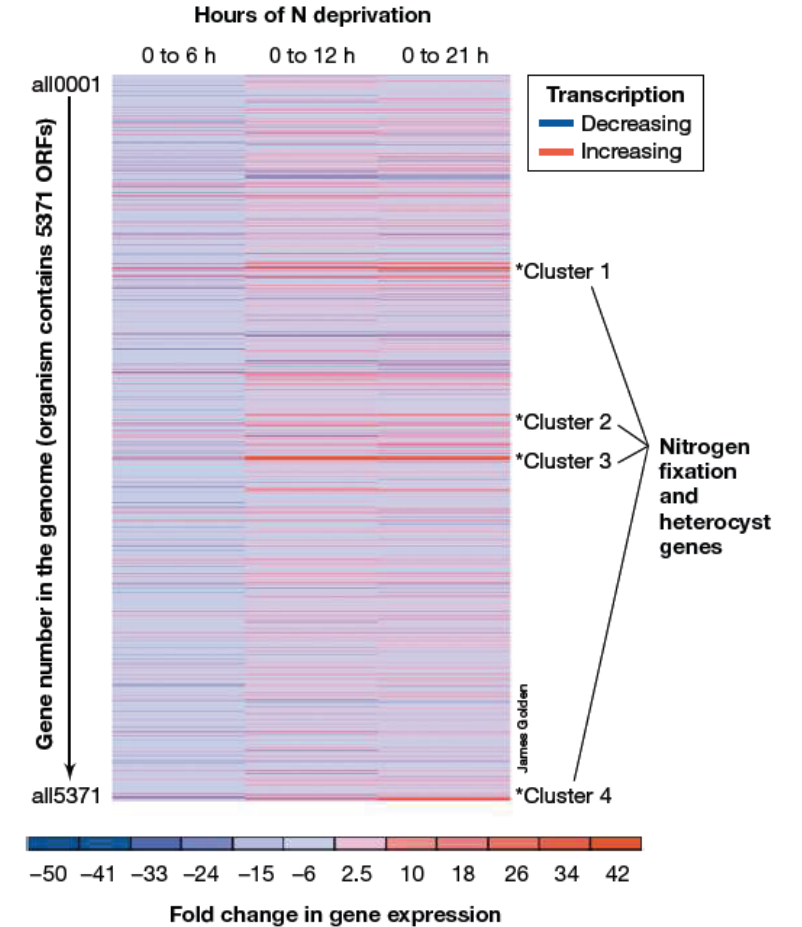
- RNA-Seq, hücredeki tüm RNA moleküllerinin önce cDNA'ya dönüştürülmesi ve ardından dizilenmesiyle çalışan kapsamlı bir transkriptomik yöntemdir.
- Bir genom dizisi mevcut olduğunda, RNA-Seq hangi genlerin aktarıldığını ve her gen için kaç RNA kopyası üretildiğini ortaya koyar.
- Bu teknik tüm transkriptleri hedeflediği için mRNA düzeylerini ölçmek, uzun 5' ya da 3' UTR bölgelerini belirlemek ve kodlamayan RNA'ları keşfetmek için idealdir.
- RNA-Seq yüksek verimli dizileme teknolojilerine bağlıdır ve hücrede en bol bulunan rRNA'nın varlığı süreci karmaşıklştırırsa da rRNA uzaklaştırma veya mRNA zenginleştirme yöntemleri mevcuttur.

RNA-Seq'in Kullanımı ve Avantajları

- Son teknolojik gelişmeler, bazı durumlarda rRNA uzaklaştırılmadan dizileme yapılmasına da imkân sağlayarak RNA-Seq'i daha esnek bir hale getirmiştir.
- RNA-Seq, gen ifadesinin küresel analizinde mikroarray'lerin yerini almış ve günümüzde tercih edilen yöntem olmuştur.
- Transkriptomik veriler sıklıkla gen ifadesi düzeylerini renklerle gösteren ısı haritaları şeklinde sunulur.
- RNA-Seq sonuçları ayrıca gen ifadelerinin genom açıklamalarına göre konumlarını göstererek transkript haritalamanın yapılmasına olanak tanır.

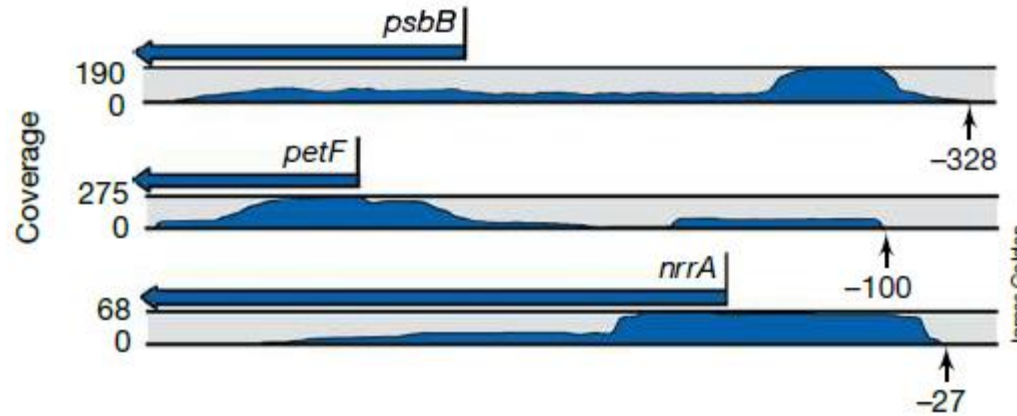
Azot Eksikliği Altında Gen İfadesi

- Yandaki figür, *Anabaena*'da azot kısıtlanması sırasında yukarı doğru düzenlenen gen kümelerini göstererek heterosist oluşumu ve azot fiksasyonu ile ilişkili genlerde artan transkripsiyonu ortaya koymaktadır.
- Bu ısı haritasında 1–4 numaralı gen kümeleri, azot eksikliği süresi arttıkça transkripsiyonun belirgin şekilde yükseldiği gen gruplarını temsil eder.



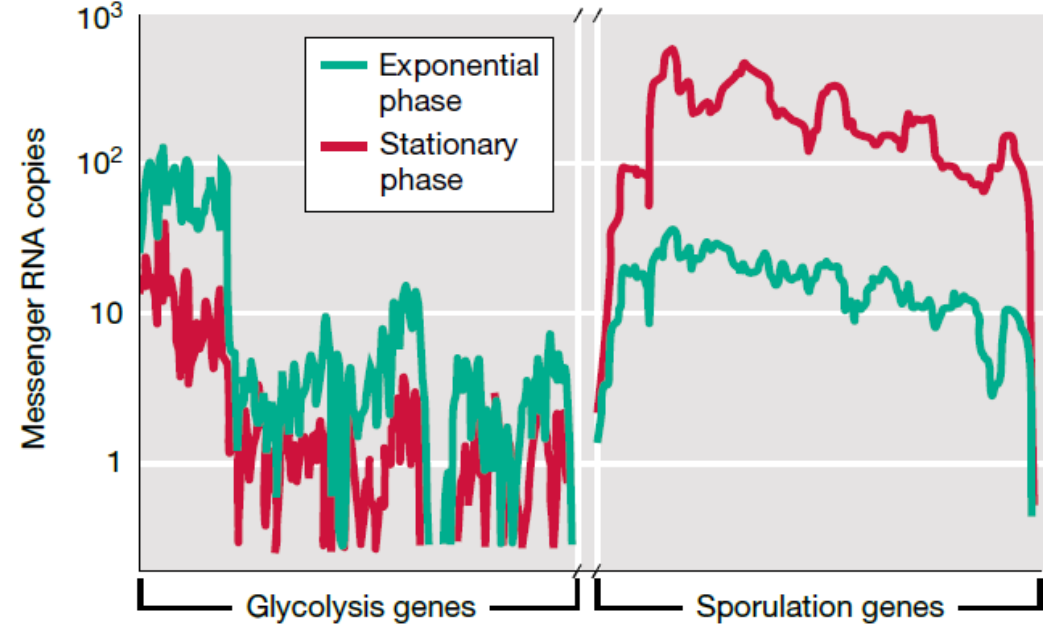
Azot Eksikliği Altında Gen İfadesi

- Aşağıdaki figür ise *psbB*, *petF* ve *nrrA* genleri boyunca dizileme kapsamasını göstererek bu transkriptlerin uzun 5' UTR bölgelerine sahip olduğunu ortaya koyar.
- Bu uzun UTR bölgelerinin, ilgili genlerin düzenlenmesinde rol oynayan mekanizmalarla ilişkili olabileceği düşünülmektedir.



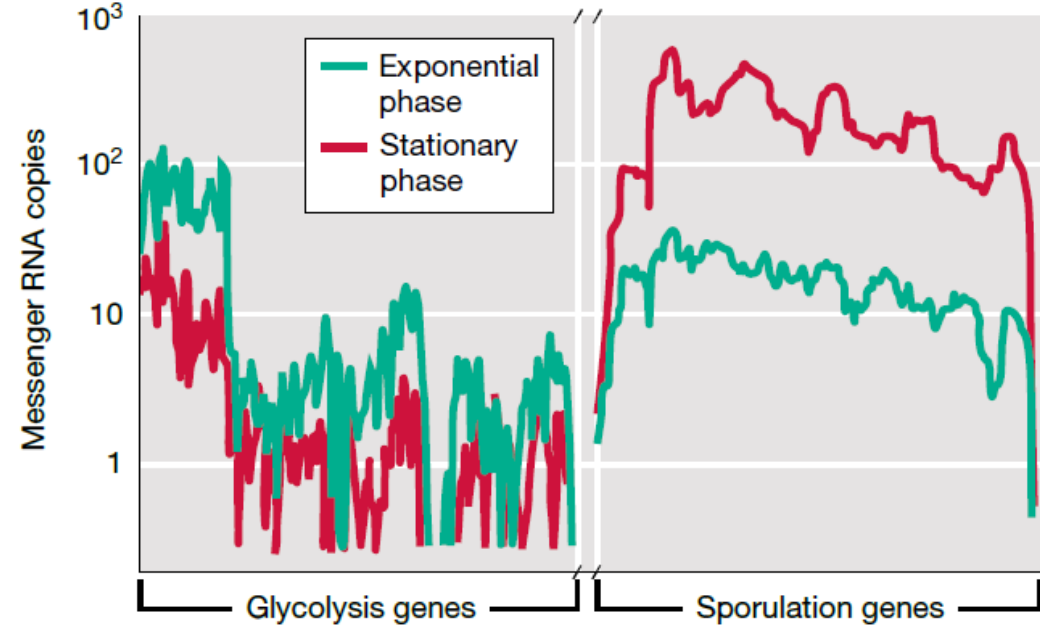
Büyüme Evreleri Arasında Transkript Düzeyleri

- RNA-Seq verileri, bir *Clostridium* türünde eksponansiyel ve durağan faz kültürleri arasında transkript bolluğunu karşılaştırmak için de kullanılabilir.
- Yanda görüldüğü üzere, organizmanın ATP üretiminde temel yol olan glikoliz genlerinin ifadesi eksponansiyel büyüme sırasında artmaktadır.



Büyüme Evreleri Arasında Transkript Düzeyleri

- Buna karşın, besinlerin sınırlanmaya başladığı durağan fazda sporulasyon genlerinin ifadesi belirgin şekilde yükselir.
- RNA-Seq ayrıca genom dizisi bulunmayan mikrobiyal topluluklarda da kullanılabilir ve burada transkriptler veri bankalarındaki homolog dizilerle tanımlanır.



Metagenomik Yaklaşımlar ve RNA-Seq Uygulamaları

- Metagenomik, çevresel örneklerden elde edilen DNA ya da RNA'nın toplu analizini içerir ve RNA-Seq bu kapsamda güçlü bir araçtır.
- RNA-Seq, laboratuvarı kültüre alınamayan bir bakterinin topluluk içinde hangi genleri yoğun biçimde aktardığını ortaya çıkararak besin gereksinimlerinin öngörülmesini sa lar.
- Bu yüksek transkripsiyonlu genlerin kodladığı proteinlere bakılarak organizmanın olası metabolik ihtiyaçları belirlenebilir.
- Araştırmacılar, bu bilgiler doğrultusunda hazırladıkları uygun besiyeri ile daha önce kültüre alınamayan bakteriyi başarıyla yetiştirmiştir.

Proteomik: Tanım ve Kapsam

- Proteomik, bir organizmanın proteinlerinin yapı, işlev ve aktivitesini genom ölçeğinde inceleyen modern bir biyolojik araştırma alanıdır.
- Bir hücredeki protein çeşitleri ve miktarları çevresel koşullara veya gelişimsel döngülere bağlı olarak sürekli değişir.
- Bu nedenle proteom terimi geniş anlamda organizmanın genomunda kodlanan tüm proteinleri, dar anlamda ise belirli bir anda hücrede bulunan proteinleri ifade eder.
- Bu dar kapsamlı tanım için translatom terimi de kullanılmakta olup belirli koşullar altında üretilen tüm proteinleri kapsar.

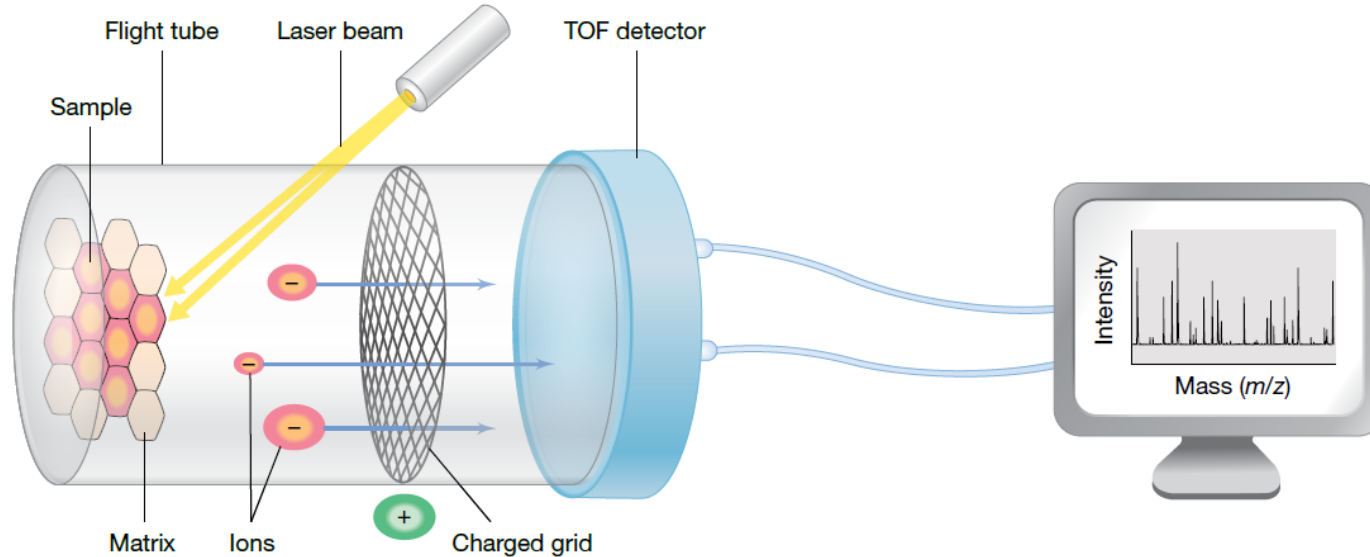
Proteomikte Kullanılan Yöntemler: Kütle Spektrometrisi

- Modern proteomik çalışmalarının temelinde, proteinlerin ve metabolitlerin tanımlanmasında kullanılan kütle spektrometrisi yer alır.
- Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi, atomların tam kütlelerini ayırt edebildiği için herhangi bir küçük molekülün moleküler formülünün kesin olarak belirlenmesine olanak tanır.
- Bir numunedeki proteinlerin proteazlarla parçalanması sonucu oluşan peptitlerin dizileri, genomdaki translasyon ürünleriyle eşleştirilerek hangi proteinlerin bulunduğu saptanır.
- Protein karışımlarının duyarlılıkla ayrılabilmesi için artık sıkça sıvı kromatografisi, özellikle yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), kütle spektrometrisiyle birlikte kullanılmaktadır.



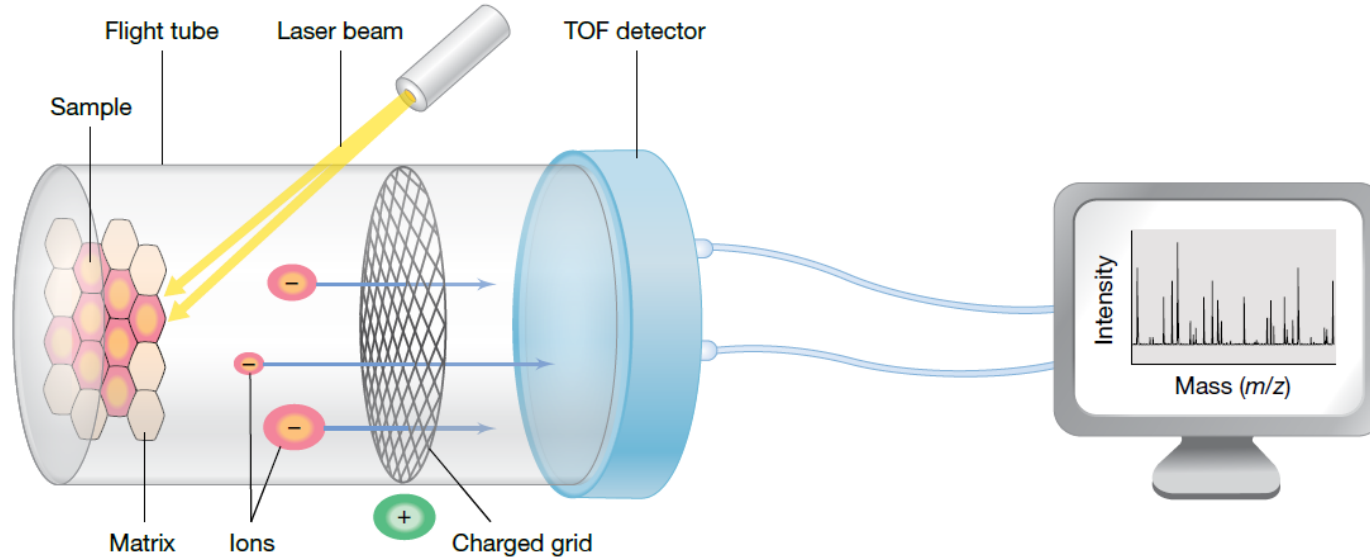
MALDI ve MALDI-TOF Tekniği

- MALDI, proteinlerin ayrıştırılmasına veya sindirilmesine gerek duymadan analiz edilebildiği gelişmiş bir kütle spektrometrisi tekniğidir.
- Bu yöntemde numune bir matrise yerleştirilir ve lazer ile iyonlaştırılarak gaz fazına geçirilir.



MALDI ve MALDI-TOF Tekniği

- Oluşan iyonlar bir elektrik alanı ile hızlandırılır ve her iyonun dedektöre ulaşma süresi, iyonun kütle/yük oranına bağlı olarak değişir.
- Aşağıda gösterildiği gibi, bu zaman-uçuş prensibiyle alışan MALDI-TOF sistemi, iyonların hızından hareketle moleküler kütleği hesaplayarak proteinlerin tanımlanmasını sağlar.

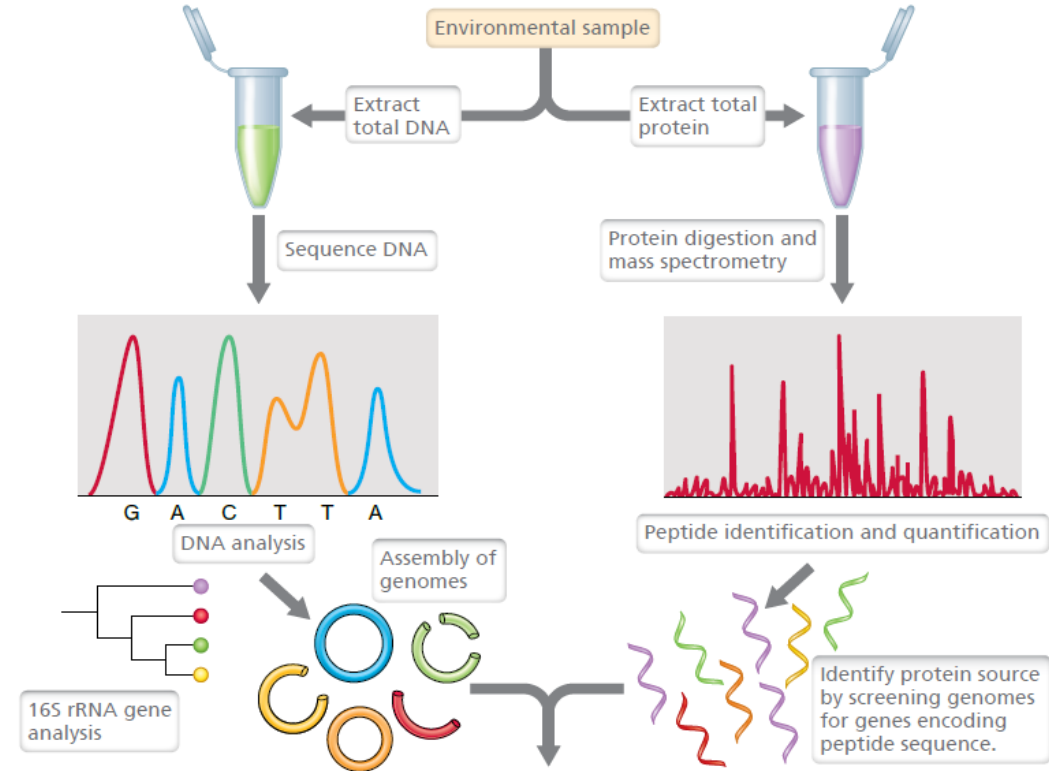


Çevresel Örneklemde Metaproteomik Yaklaşımın Önemi

- Metaproteomikler, çevresel örneklerdeki mikrobiyal toplulukların ortak metabolik potansiyelinin anlaşılmasını sağlar.
- Permafrostun Dünya kara alanının yaklaşık %20'sini kaplayan ve büyük miktarda organik karbon depolayan bir habitat olduğu vurgulanır.
- İklim değişikliğiyle permafrosttan CO₂ ve CH₄ salınımının artma olasılığı mikrobiyal topluluğun belirlenmesinin önemini artırır.
- Metagenomik ve metaproteomik birleşimiyle bir permafrost erime bataklığındaki gen ve protein çeşitliliğinin kapsamlı bir görüntüsü elde edilmiştir.

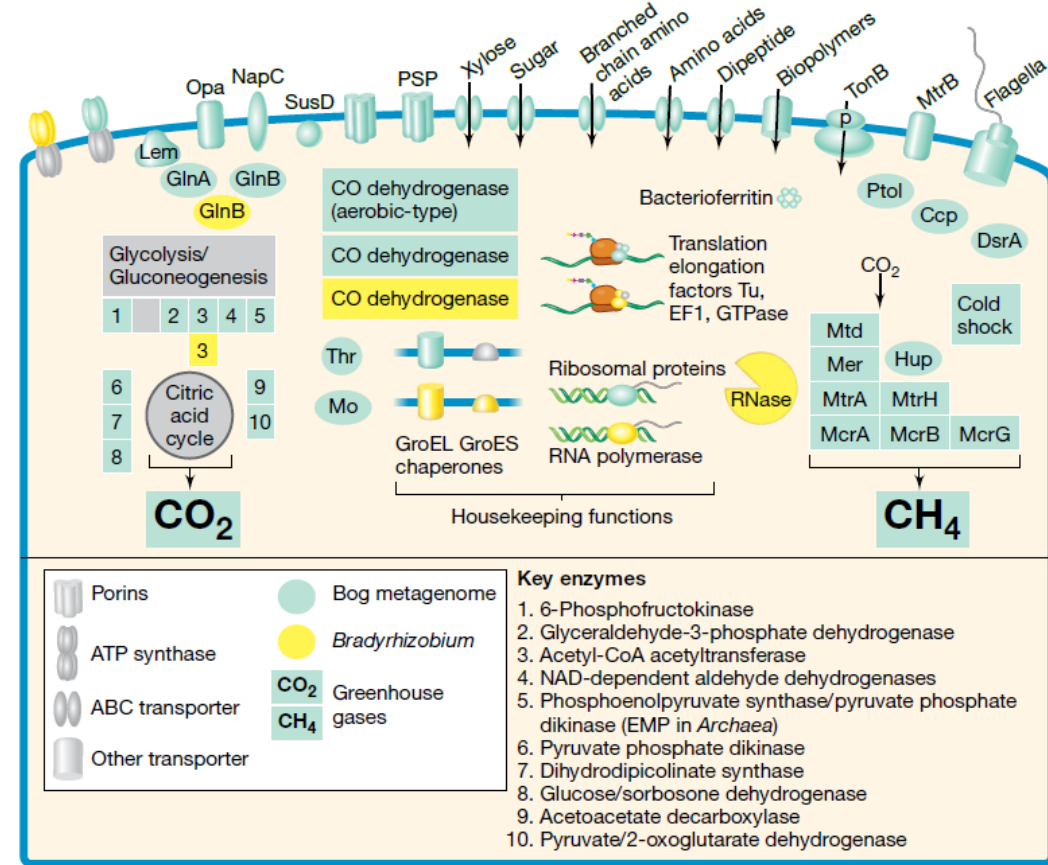
Erime Bataklığının Metagenomik Analizi

- Metagenomik analizde elde edilen DNA dizileri birleştirilerek tam ve kısmi genomlara dönüştürülmüştür.
- Bu analiz, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* ve *Chloroflexi*'nin baskın bakteriyel gruplar olduğunu göstermiştir.
- Archaea grubunda ise metanojenlerin (Euryarchaeota) baskın olduğu belirlenmiştir.
- Büyük miktarda diziden üç yeni ve henüz kültüre alınmamış metanojenin taslak genomlarının oluşturulabilmesi, benzersiz psikrofil metanojenlerin permafrostta bulunduğunu göstermiştir.



Metaproteomik Bulguların Yorumlanması

- Dizilerle eşleştirilen proteinler, kütle spektrometrisiyle tespit edilen peptitlerden yola çıkarak tanımlanmıştır.
- Toplulukta hücresel düzen, taşıma ve organik karbon respirasyonuna katılan çok çeşitli proteinlerin varlığı saptanmıştır.
- C₁ metabolizmasıyla ilişkili ve metan üretimi ile metan oksidasyonunda görev alan proteinler de toplulukta açıkça belirlenmiştir.
- Karbon monoksitin oksidasyonu ve indirgenmesiyle ilişkili proteinlerin varlığı metabolik çeşitliliği desteklemiştir.



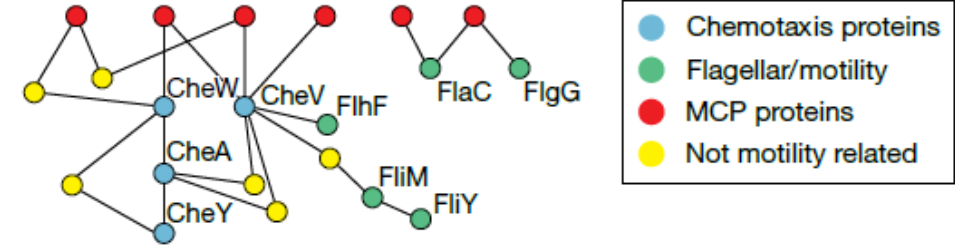
Metagenomik ve Metaproteomik Yaklaşımın Çevresel Etkileri

- Birlikte kullanılan bu iki omik yaklaşımı, mikrobiyal topluluklarda “kim” ve “nasıl” sorularını açıklığa kavuşturur.
- Bu entegre analiz, çevresel değişimlere verilen mikrobiyal tepkilerin öngörülmesine katkı sağlar.
- Permafrost erimesi durumunda artan organik karbon respirasyonunun CO₂ salınımını yükseltebileceği açıktır.
- Aynı şekilde metanojen aktivitesinin artmasıyla CH₄ salınım potansiyelinin belirgin biçimde yükseldiği görülmektedir.

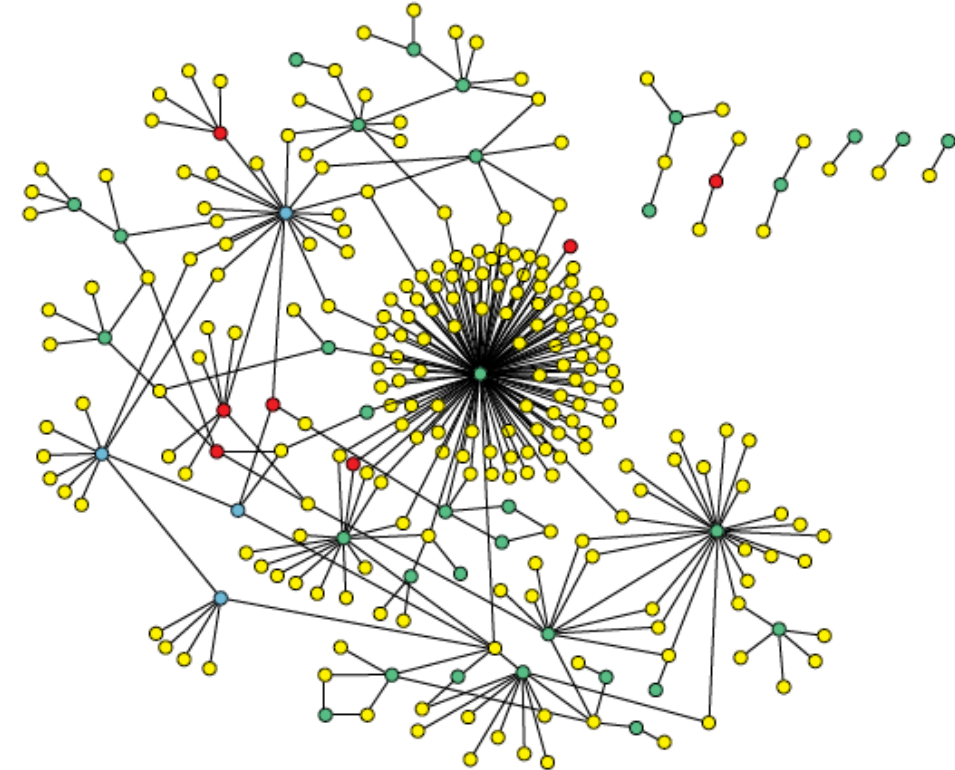


İnteraktom Kavramına Giriş

- İnteraktom, bir hücre içindeki makromoleküller arasında gerçekleşen tüm etkileşimlerin oluşturduğu bütünü ifade eder.
- Bu terim ilk olarak sadece protein–protein etkileşimlerini tanımlamak için kullanılmıştır.
- Ancak daha sonra protein–RNA gibi farklı makromolekül sınıfları arasındaki etkileşimleri de kapsayacak şekilde genişletilmiştir.
- İnteraktomlar genellikle düğümlerin proteinleri ve bağlantıların etkileşimleri temsil ettiği ağ şemalarıyla gösterilir.



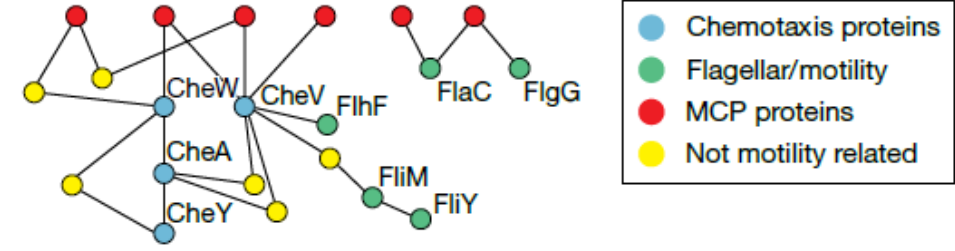
(a)



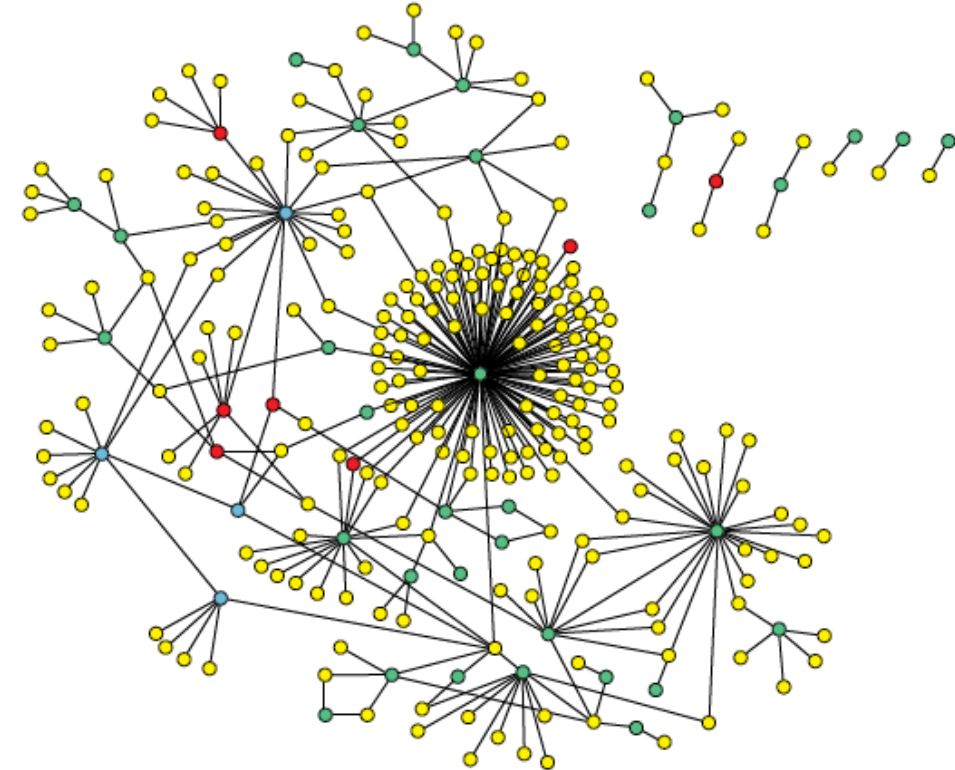
(b)

İnteraktomların Görselleştirilmesi ve Örnek

- Tüm hücre interaktomlarının şemaları oldukça karmaşık olabilir.
- Bu nedenle daha odaklı interaktomların incelenmesi öğretici sonuçlar verir.
- *Campylobacter jejuni*'nin hareketliliğine ilişkin protein ağı buna bir örnek olarak gösterilebilir.
- Bu ağ, kemotaksi sisteminin iyi bilinen bileşenleri ile bunlarla etkileşen diğer proteinlerin temel etkileşimlerini gösterir.



(a)



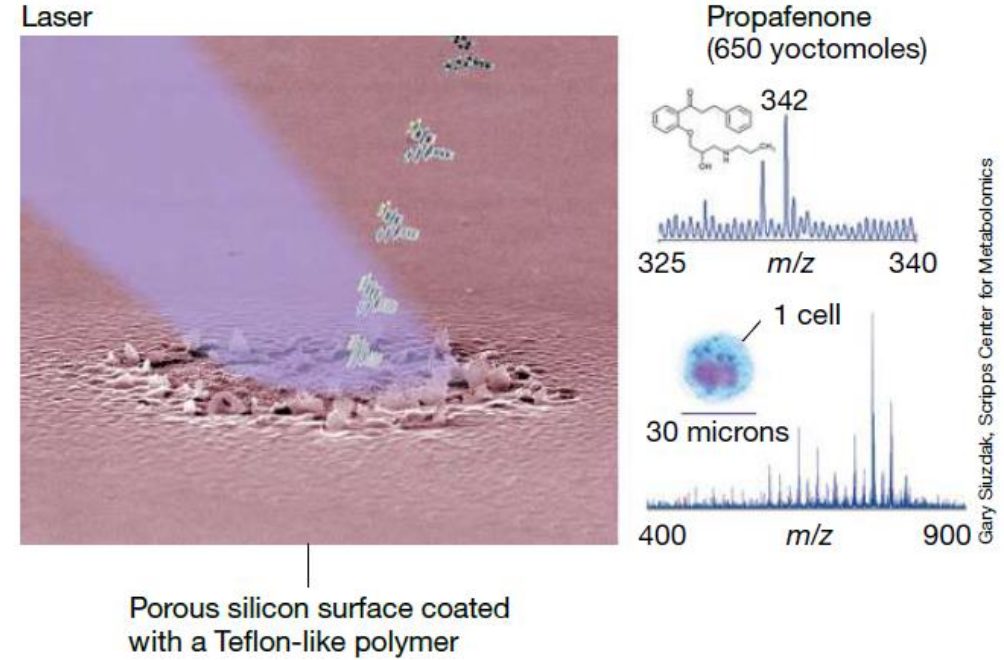
(b)

Metabolomik Kavramına Giriş

- Metabolom, bir organizmanın ürettiği tüm metabolik ara ürünleri ve küçük molekülleri kapsar.
- Metabolom, organizmanın genomunda kodlanan enzimatik yolların bir yansımasıdır.
- Gen ve protein düzeyindeki bilgiler belirli yolların potansiyel olarak aktif olduğunu düşündürürken metabolomik veriler bu tepkimelerin gerçekten gerçekleştiğini doğrular.
- Bu nedenle metabolomik analizler hücrenin belirli bir fizyolojik durumdaki metabolik etkinliğini doğrudan ortaya koyar.

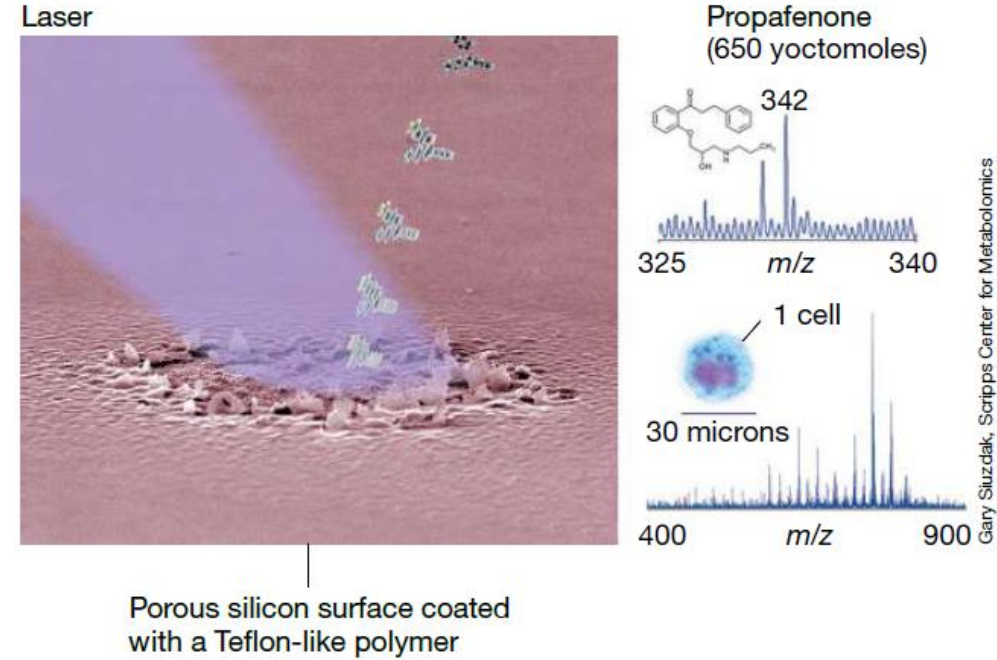
Metabolomik Tekniklerde Gelişmeler ve NIMS Yöntemi

- Metabolomikler, hücrelerdeki küçük metabolitlerin kimyasal çeşitliliği nedeniyle diğer omik alanlara kıyasla daha yavaş gelişmiştir.
- ^{13}C -glukozla işaretlenmiş hücre ekstraktlarının NMR analizi duyarlılık ve eşzamanlı tespit kapasitesi bakımından sınırlı kalmıştır.
- MALDI-TOF kullanılabilir olsa da NIMS, özel örnek hazırlığı gerektirmeden biyolojik örneklerin doğrudan analizine imkân tanıyan daha uygun bir tekniktir.
- NIMS, düşük konsantrasyonlardaki küçük metabolitlerin doğru tanımlanmasını ve doku görüntülemeye daha yüksek uzaysal çözünürlük elde edilmesini sağlar.



NIMS'in Teknik Üstünlükleri

- NIMS'te lazerle iyonizasyon gerçekleştirilir ancak silikon kaplı yüzey, MALDI-TOF'taki matris kaynaklı arka plan girişimini ortadan kaldırır.
- Bu özellik, yapısal olarak benzer karbonhidratlar veya steroidler gibi zor tanımlanan moleküllerin tespitini kolaylaştırır.
- Teknik, düşük bollukta bulunan metabolitlerin güvenilir biçimde tanımlanmasını mümkün kılar.
- NIMS'in yüksek duyarlılığı sayesinde, tek bir kalp hücresinde yoctomol düzeyinde propafenon tespit edilebilmektedir.



Bitki Biyokimyasını Anlamada Metabolomik Yaklaşım

- Metabolom analizinin bitki biyokimyasını anlamada çok değerli olduğu görülür çünkü bitkiler diğer canlı türlerinden daha fazla sayıda, birkaç bin metabolit üretir.
- Bu metabolitlerin önemli bir bölümü aroma, tat, alkaloid ve pigment gibi ticari değeri yüksek sekonder metabolitlerdir.
- Model bitki *Arabidopsis* üzerinde yapılan metabolomik çalışmalarda yüzlerce metabolitin seviyesi izlenmiş ve sıcaklık değişimlerine bağlı olarak pek çok metabolitte belirgin dalgalanmalar gözlenmiştir.
- Bu sonuçlar, iklim değişikliğinin bitki metabolizmasını önemli ölçüde değiştirebileceğine işaret etmektedir.



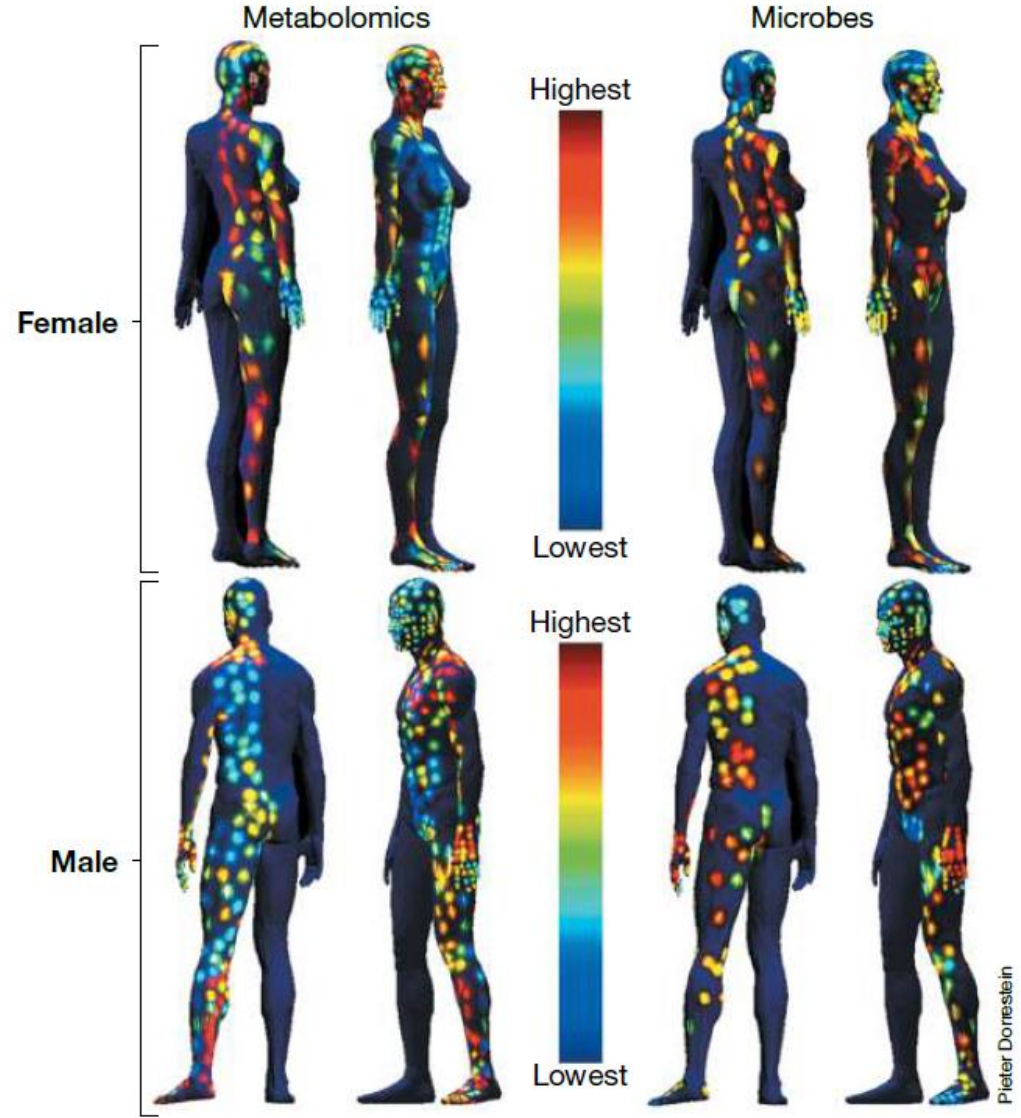
Ekstrem Ortamlarda Mikrobiyal Metabolomik

- Metabolomik analizler, mikrobiyal kültürlerin yanı sıra doğal mikrobiyal topluluklar üzerinde de uygulanabilir.
- Kuzey Kaliforniya'daki terk edilmiş bir maden sahasından akan, aşırı asidik (pH ~0.9) ve ağır metalle zengin sulara büyüyen basit bir mikrobiyal biyofilmde 3500'den fazla farklı metabolit tespit edilmiştir.
- Bu metabolitlerin birçoğunun ortamın yüksek ozmotik baskısı ve diğer zorlayıcı koşullarıyla başa çıkmak için üretilen osmolitler veya koruyucu moleküller olduğu düşünülmüştür.
- Bu bulgular, ekstrem çevrelerde yaşayan mikroorganizmaların metabolik esnekliklerini ve adaptif yanıtlarını daha iyi anlamayı sağlar.



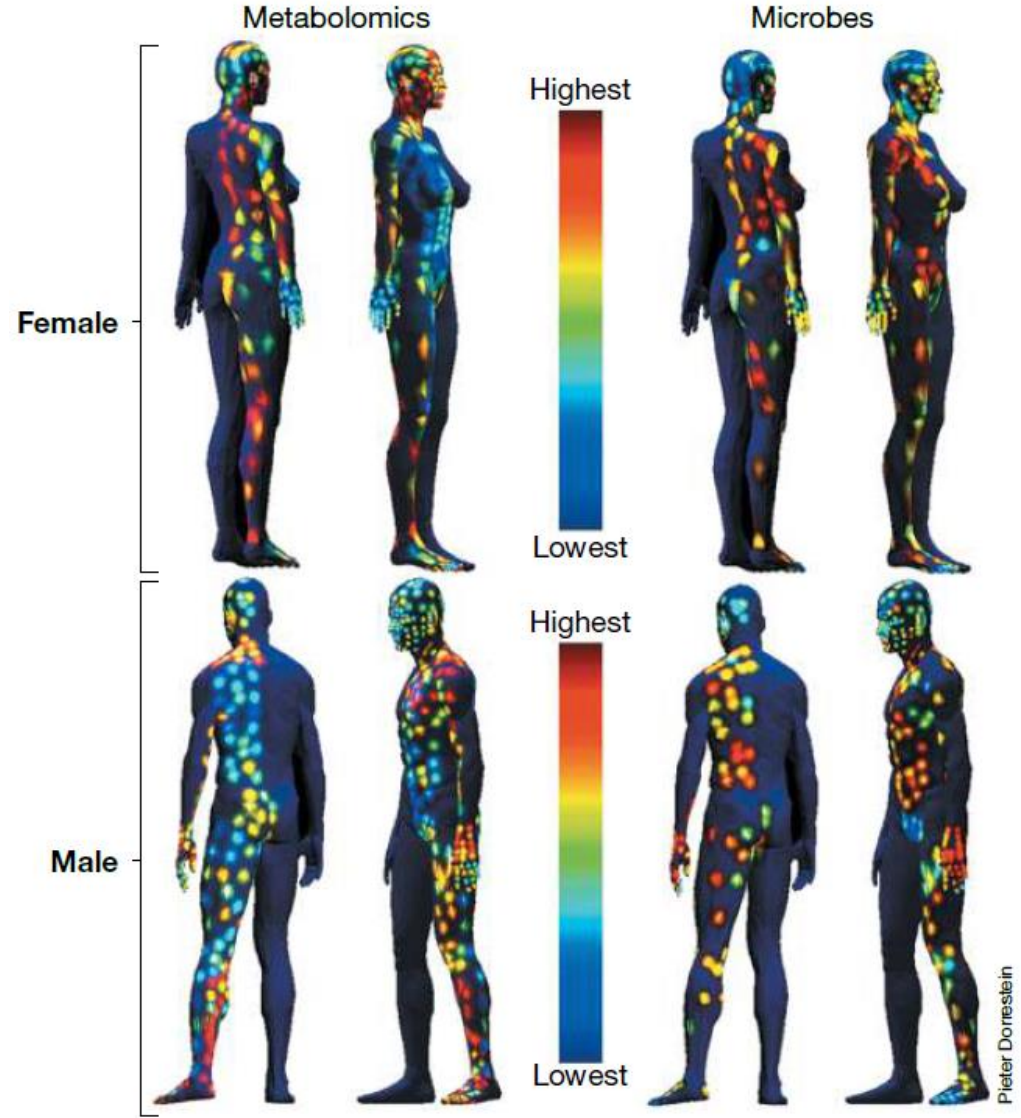
Metabolomik ve İnsan Mikrobiyomu

- Metabolomik, insan mikrobiyomunun karakterize edilmesinde de önemli bir araç olarak kullanılmaktadır.
- Deri epiteli yalnızca insan hücrelerinden değil, aynı zamanda epitelyal sağlığa katkı veren mikroorganizmalardan da oluştuğu için hem konak hücrelerine hem mikroplara hem de kişisel hijyen ürünlerine ait metabolitler birlikte bulunur.



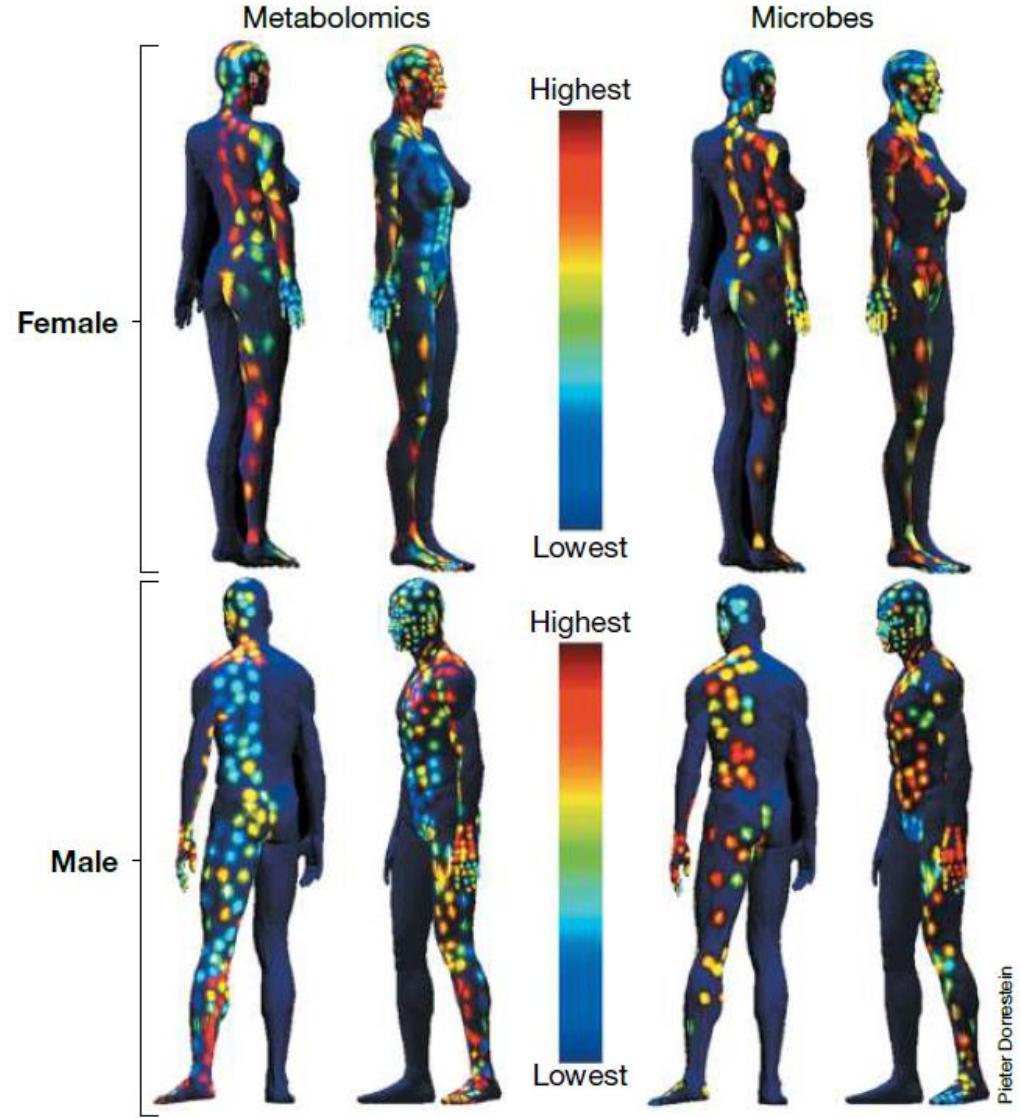
Metabolomik ve İnsan Mikrobiyomu

- Yandaki figür, iki insan deneğin derisinde metabolit desenlerini ve mikrobiyal çeşitliliği insan vücudunun üç boyutlu topografik bir ısı haritası üzerinde eşzamanlı olarak göstermektedir.
- Bu tür çalışmaların hedeflerinden biri, belirli metabolitlerin belirli mikrobiyal türlerle ilişkili olup olmadığını ortaya koymaktır.



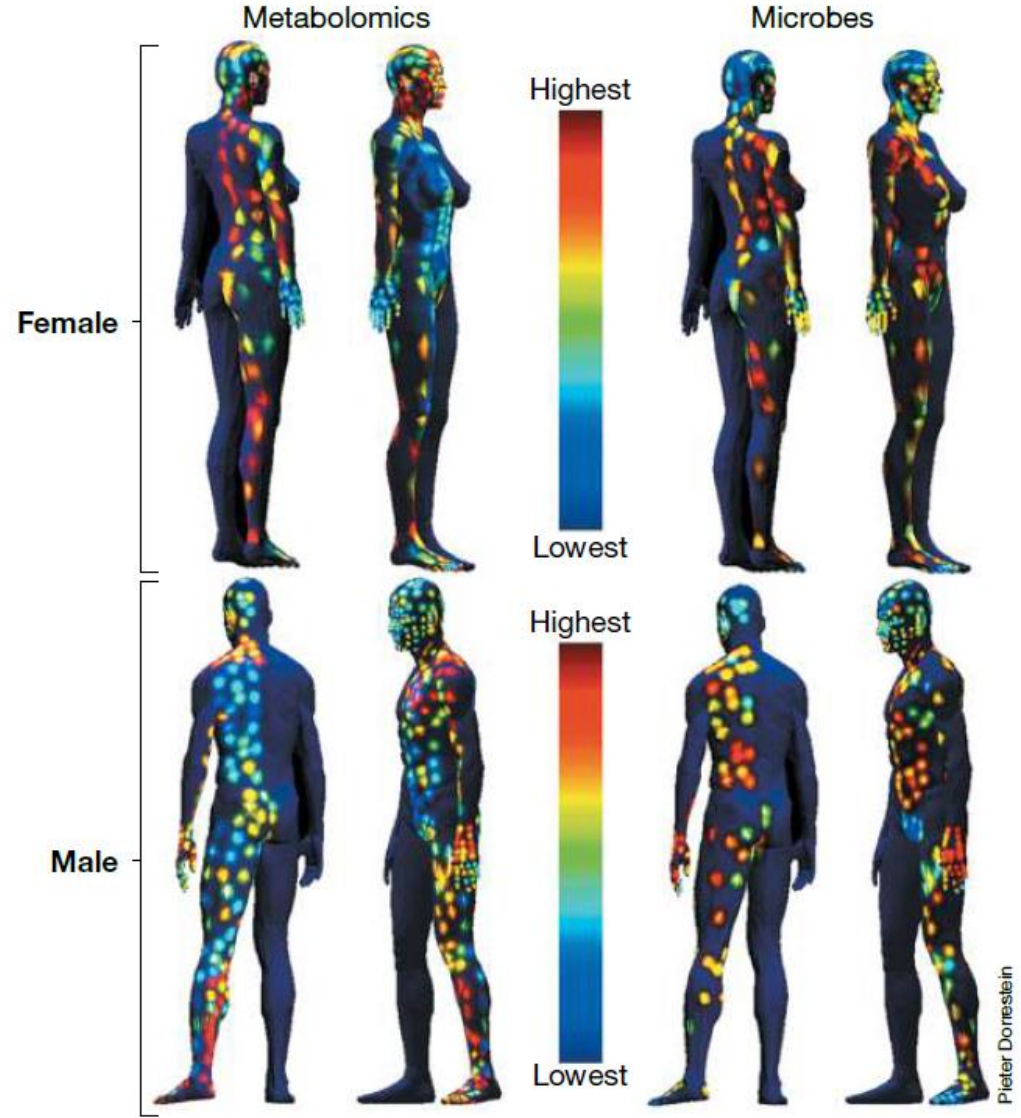
Deri Mikrobiyomunda Metabolit ve Mikroorganizma Çeşitliliği

- Yandaki omik analiz, daha önceki çalışmalardan bilinen birçok deri mikroorganizmasının yine tespit edildiğini göstermiştir.
- İnsan hücreleri tarafından üretilen triaçilgliserit ve diaçilgliserit gibi yaygın bileşikler kolayca belirlenirken, bu bileşiklerin mikrobiyal işlenmesiyle oluşan çeşitli metabolitler de saptanmıştır.



Deri Mikrobiyomunda Metabolit ve Mikroorganizma Çeşitliliği

- Vücudun belirli bölgelerindeki metabolit çeşitliliği mikrobiyal çeşitlilikle iyi bir korelasyon göstermemiştir.
- Bulgular, deri metabolomunun karmaşıklığının mikrobiyal profilden daha yüksek olduğunu ve her bir türün muhtemelen birkaç farklı metabolit ürettiğini düşündürmektedir.

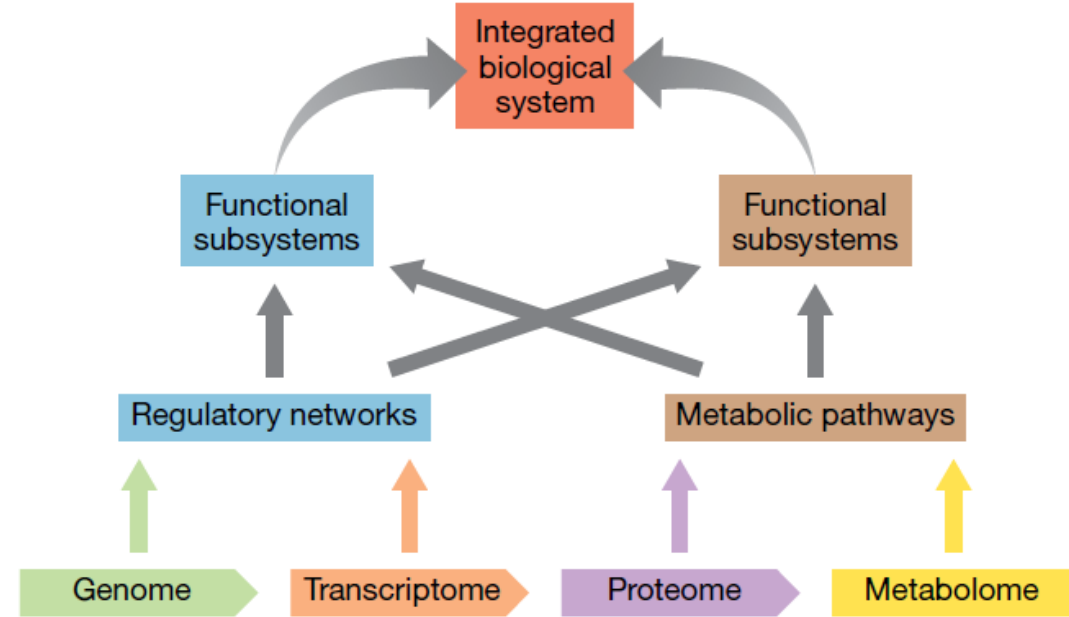


Kişisel Hijyen Ürünlerinin Etkisi

- Çalışmanın dikkat çekici bulgularından biri, insan derisindeki metabolitlerin büyük bölümünün kişisel hijyen ürünlerinden kaynaklandığının ortaya konmasıdır.
- Bu gözlem, derinin kimyasal bileşiminin yalnızca biyolojik süreçlerle değil, günlük yaşam alışkanlıklarıyla da güçlü bir şekilde şekillendiğini gösterir.
- Metabolomik, bu etkileşimleri inceleyerek deri sağlığının ya da hastalık durumunun gelecekte daha doğru değerlendirilmesine katkıda bulunabilir.
- Bu kapsamda, omik veriler klinisyenlere ve mikrobiyologlara deri ekolojisini daha iyi anlama imkânı sunar.

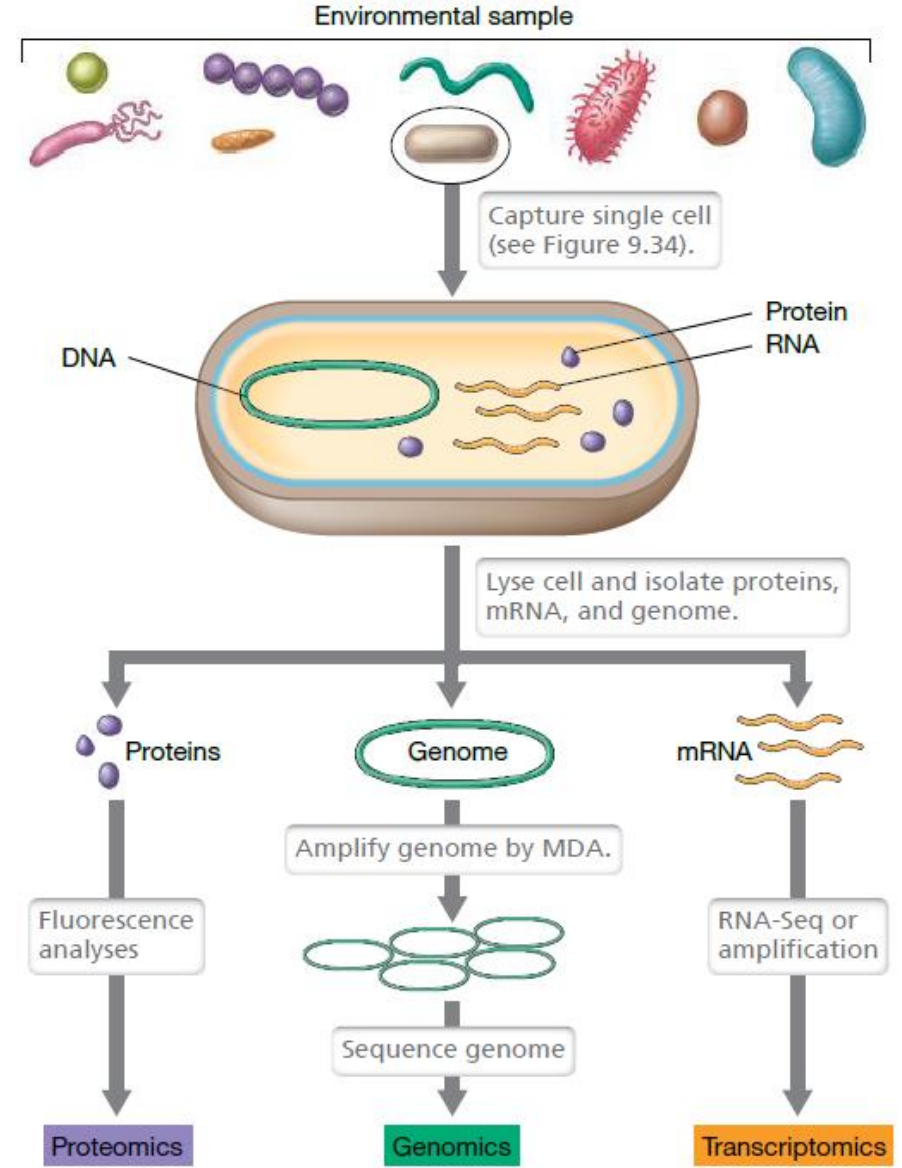
Sistem Biyolojisine Geçiş

- Bölüm boyunca omikleri genellikle birbirinden ayrı araçlar olarak ele aldıktan sonra, şimdi bu verileri birleştirerek tüm organizmayı anlamayı hedefleyen sistem biyolojisine yönelelim.
- Sistem biyolojisinin temel stratejisi, organizmanın yalnızca omik öncesi dönem gözlemlerinden çıkarılamayan davranış veya özelliklerini öngören kapsamlı modeller oluşturmaktır.
- Bu yeni davranış ya da özellikler organizmanın “ortaya çıkan özellikleri” (emergent properties) olarak adlandırılır.
- Yandaki figür, farklı omik veri setlerinin bütünleştirilmesiyle anlamlı biyolojik modellerin elde edilmesini hedefleyen bu yaklaşımı özetlemektedir.



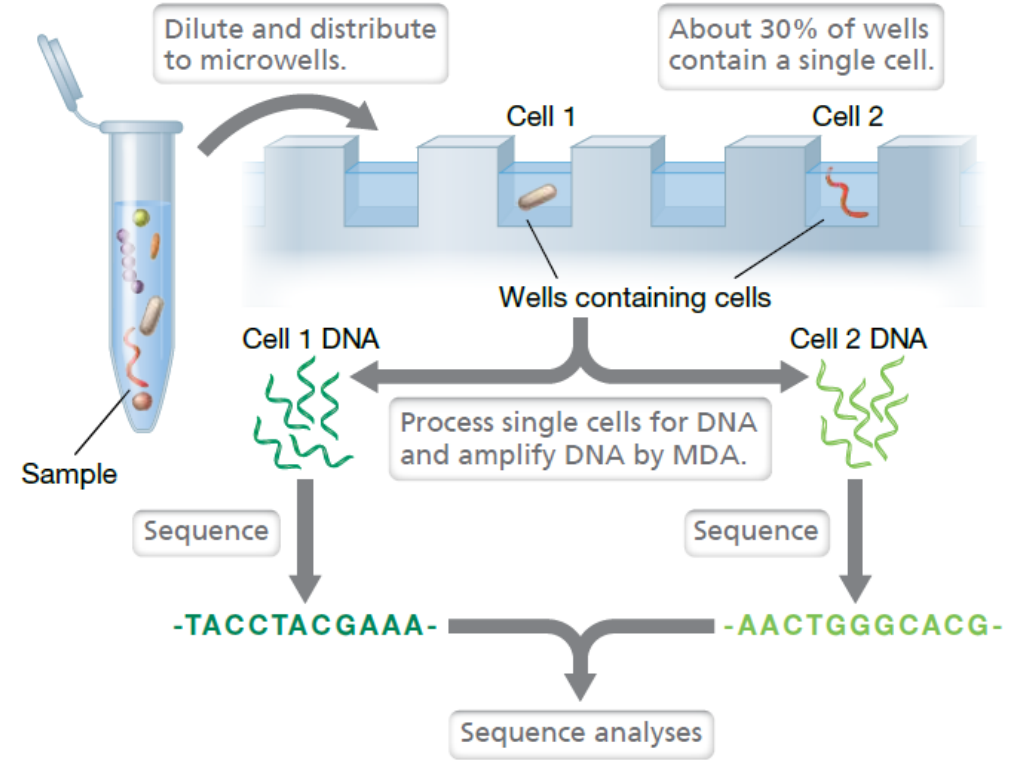
Tek Hücre Genomğine Giriş

- Metagenomikte olduğu gibi çevresel DNA'nın bütünü incelenebilse de, tek bir hücrenin genomunun dizilenmesi de mümkündür ve bu teknik tek hücre genomı (SCG) olarak adlandırılır.
- Bu yaklaşım, çok küçük miktarlardaki DNA'nın çoğaltılabilmesi sayesinde uygulanabilir hale gelmiştir.
- Tek hücre genomı, doğal mikrobiyal topluluklarda bulunan mikroorganizmaların metabolik potansiyelini anlamada kritik bir araçtır.
- Genom dizilemenin yanı sıra, tek hücre seviyesinde transkriptom ve proteom analizleri de yapılabilir.



Hücre İzolasyonu: Mikrodroplet ve FACS Yöntemleri

- Tek hücre genomu için hücre izolasyonu zorunludur ve bunun için mikrowell dilüsyonları, kapsülleme ve floresanla aktive hücre sıralaması (FACS) gibi fiziksel yöntemler kullanılır.
- Kapsülleme tekniğinde örnek seyreltilip steril yağ içinde mikrodamlacıklar oluşturulur ve damlacıkların yaklaşık %30'u yalnızca hücre içerir.
- Damlacık kapsülleme FACS ile birleştirildiğinde, içi boş damlacıklar optik olarak tespit edilip elenebilir.
- Bu yöntemin, tek virionların omik analizleri için izole edilmesinde de etkili olduğu gösterilmiştir.



Tek Hücre DNA'sının Dizilenmesi ve Zorlukları

- Tek hücreden DNA dizilemesi, polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) özel bir varyantı olan multiple displacement amplification (çoklu yer değiştirme amplifikasyonu) (MDA) ile gerçekleştirilir.
- MDA, tek bir bakteriyel hücredeki femtogram düzeyindeki DNA'yı dizileme için gereken mikrogram düzeylerine kadar milyar kat çoğaltır.
- Ancak MDA'nın yüksek duyarlılığı nedeniyle kontaminasyon büyük bir sorundur ve hem örnekten hem laboratuvar malzemelerinden gelen DNA ciddi sorunlara yol açabilir.
- Kontaminasyon kontrol edilmezse, genom montajı ve sonraki analizler önemli ölçüde bozulur.



Tek Hücre RNA ve Protein Analizleri

- Tek bir hücrenin genomu yanında RNA'sı da RNA-Seq kullanılarak analiz edilebilir ve bunun için RNA önce modifiye PCR yöntemleriyle cDNA'ya dönüştürülür.
- Tek hücre proteom analizleri, nükleik asit çalışmalarından daha zorludur çünkü proteinde amplifikasyon yapılmaz.
- Yine de son derece duyarlı floresans yöntemleri tek hücre proteomunu incelemek için kullanılabilir.
- Bu analizler, bir mikrobiyal ekosistemdeki tek bir hücrenin fonksiyonel rolünün çok katmanlı bir omik yaklaşımla değerlendirilmesini sağlar.

Tek Hücre Omikleri ile Biyolojik Bilgiyi Hücre Düzeyinde Anlamak

- Tek hücre omikleri, bir organizmanın biyolojisine ait birçok özelliği hücre popülasyonları üzerinden değil, doğrudan tek bir hücreden elde etmeye olanak sağlar.
- SCG kullanılarak bir çevredeki metabolik genler yalnızca tanımlanmakla kalmaz, aynı zamanda bu genlerin hangi türlere ait olduğu da belirlenir.
- Bu yaklaşım, hangi organizmanın hangi besin maddesini parçaladığını ortaya koyarak çevresel süreçlerdeki görev dağılımını netleştirir.
- Örneğin, kirlenmiş ortamlardaki hidrokarbonların bakteriler tarafından nasıl parçalandığı tek hücreli genomik analizlerle daha iyi anlaşılmıştır.

Plazmid ve Virüslerin Doğru Konağa Atanması

- Tek hücre genomunun dizilenmesi sayesinde bir plazmidin ya da virüsün hangi konağa ait olduğu doğru biçimde belirlenebilir.
- Bu yöntem, karmaşık çevresel örneklerde genetik elemanların doğru organizmalarla eşleştirilmesini mümkün kılar.
- Böylece çevresel mikrobiyal etkileşimlerin daha doğru çözümlenmesi sağlanır.

Mikrobiyal Dark Matter'ın (Karanlık Madde) Aydınlatılması

- SCG, 16S rRNA taramalarında tespit edilen fakat laboratuvarında henüz kültüre alınamayan Bacteria ve Archaea aday filalarının genomlarını incelemek için de kullanılmıştır.
- Bu kültüre alınmamış mikroorganizmalar mikrobiyal “dark matter” olarak adlandırılır.
- Bir çalışmada, dokuz farklı çevreden alınan 200'den fazla kültüre alınmamış hücre SCG ile analiz edilmiştir.

Dark Matter Bulgularının Çarpıcı Sonuçları

- Bulgular, bazı Archaea RNA polimeraz sigma faktörlerinin bakteriyel sigma faktörlerine benzediğini göstermiştir.
- Bazı stop kodonlarının yeniden tanımlanarak gerçek tRNA'ları kodladığı ortaya çıkmıştır.
- Bazı bakteriyel hücrelerin genomlarında daha önce yalnızca ökaryotlarda görülen bir oksidoredüktazın yer aldığı belirlenmiştir.

Archaea'da Beklenmedik Evrimsel Özellikler

- Bazı Archaea genomlarının bakteri-benzeri bir stringent response (sıkı yanıt) sistemine sahip olduğu bulunmuştur.
- Ayrıca bazı Archaea'da, normalde yalnızca Bacteria'ya özgü olan peptidoglikan sentezinde görev alan bir enzimin üretildiği anlaşılmıştır.
- Bu sonuçlar, Archaea ve Bacteria arasındaki evrimsel sınırların düşündüğümüzden daha esnek olabileceğini göstermektedir.

Tek Hücre Genomğinde Serendipite (Tasadüfi Keşif) ve Yeni Ufuklar

- SCG, başlangıçta hücre popülasyonlarını incelemek için tasarlanan yöntemlerin tek bir hücrenin biyolojisini inceleyecek biçimde geliştirilmesiyle ortaya çıkan bir “serendipite (tesadüfi keşif)” örneğidir.
- Bu teknik, tek hücre düzeyinde daha önce mümkün olmayan biyolojik ayrıntıları açığa çıkarmıştır.
- SCG, tüm kültüre alınmış Bacteria ve Archaea tip suşlarının genomlarını arşivlemeyi amaçlayan Earth Microbiome Project (Dünya Mikrobiyom Projesi) çalışmalarını tamamlayıcı bir yapı sunar.

Dark Matter Türlerinin Arşive Dahil Edilmesi

- Mikrobiyal dark matter içinde yer alan türler için SCG, bu türlerin genom arşivlerine dahil edilmesi için önemli bir araçtır.
- Aynı zamanda bu yöntem, söz konusu organizmaların gelecekte laboratuvarı kùltüre alınmasını kolaylaştıracak ipuçları sağlar.

Mycobacterium tuberculosis: Omik Yaklaşımların Entegrasyonu

- *Mycobacterium tuberculosis*, dünya nüfusunun üçte birini enfekte eden ve her yıl yaklaşık 2 milyon kişinin ölümüne neden olan bir patojendir.
- Bu bakteri, çoklu ilaç direncine sahip olması ve stres altında kısa süreli uyku durumuna girebilmesiyle tedavi edilmesi zor bir yapıya sahiptir.
- Bu nedenle yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi kritik bir gereksinimdir.



M. tuberculosis'in Hipoksiye Uyum ve Sistem Biyolojisi Yaklaşımı

- Araştırmalar, *M. tuberculosis*'in hücre içi bir patojen olarak konak hücrelerde oluşan oksijen yetersizliğine (hipoksi) nasıl uyum sağladığını anlamaya odaklanmıştır.
- Sistem biyolojisi yaklaşımı ile hem hücresel yanıtlar hem de olası yeni ilaç hedefleri belirlenmeye çalışılmaktadır.

Dual RNA-Seq ile Patojen ve Konak Tepkilerinin Eşzamanlı Analizi

- RNA-Seq, bir organizmanın tüm ifade profilini ortaya çıkarırken dual RNA-Seq tekniği hem patojenin hem de konağın transkriptomlarını aynı anda incelemeye olanak sağlar.
- Bu yaklaşım, enfeksiyon sürecinde her iki tarafın nasıl tepki verdiğinin anlaşılmasında büyük katkı sunar.
- Bu teknik özellikle *M. tuberculosis*'in konak savunmasından nasıl kaçtığını anlamada değerlidir.

Gen İfade Modelleri ve Besin Kullanımı

- Dual RNA-Seq verileri ile 600'den fazla ifade deneyinin entegrasyonu sonucunda gen ifade modelleri oluşturulmuştur.
- Bu modeller, fagosit edilen *M. tuberculosis* hücrelerinin birincil enerji kaynağının konak kolesterolü olduğunu göstermiştir.
- Ayrıca konak tarafından üretilen aspartatın bakteriye hem azot kaynağı sağladığı hem de makrofajların ürettiği reaktif oksijen türlerine karşı koruma sunduğu belirlenmiştir.

ChIP-Seq ile Düzenleyici Ağların Ortaya Çıkarılması

- Araştırmalar, transkriptom verilerini diğer omik verilerle, özellikle de ChIP-Seq analizleriyle birleştirmiştir.
- ChIP-Seq, DNA'ya bağlanan özgül proteinlerin antikolar kullanılarak izole edilmesi ve bağlandıkları DNA bölgelerinin dizilenmesi esasına dayanır.
- Bu yöntemle *M. tuberculosis* patogeneğine kritik katkı sağlayan birçok transkripsiyon faktörü ve düzenleyici ağ tanımlanmıştır.

- Çalışmalar, LexA'nın DNA hasar yanıtıyla ilişkili bazı genleri düzenlediğini göstermiştir.
- Ayrıca DevR regulonunun *M. tuberculosis*'in dormansiye giriş sürecini kontrol ettiği belirlenmiştir.



Mutant Taramaları ile Yeni İlaç Hedeflerinin Keşfi

- 1000'den fazla *M. tuberculosis* mutantının taranması sonucunda olası yeni ilaç hedefleri belirlenmiştir.
- Bu analiz, daha önce tanımlanmamış 18 genin bakterinin persistanlık (kalıcılık) yanıtıyla ilişkili olduğunu göstermiştir.
- Bu bulgular, omik verilerin mutant analizleriyle birleştirilmesinin patojenite ile ilişkili önemli genlerin tanımlanmasında güçlü bir yaklaşım olduğunu kanıtlamaktadır.



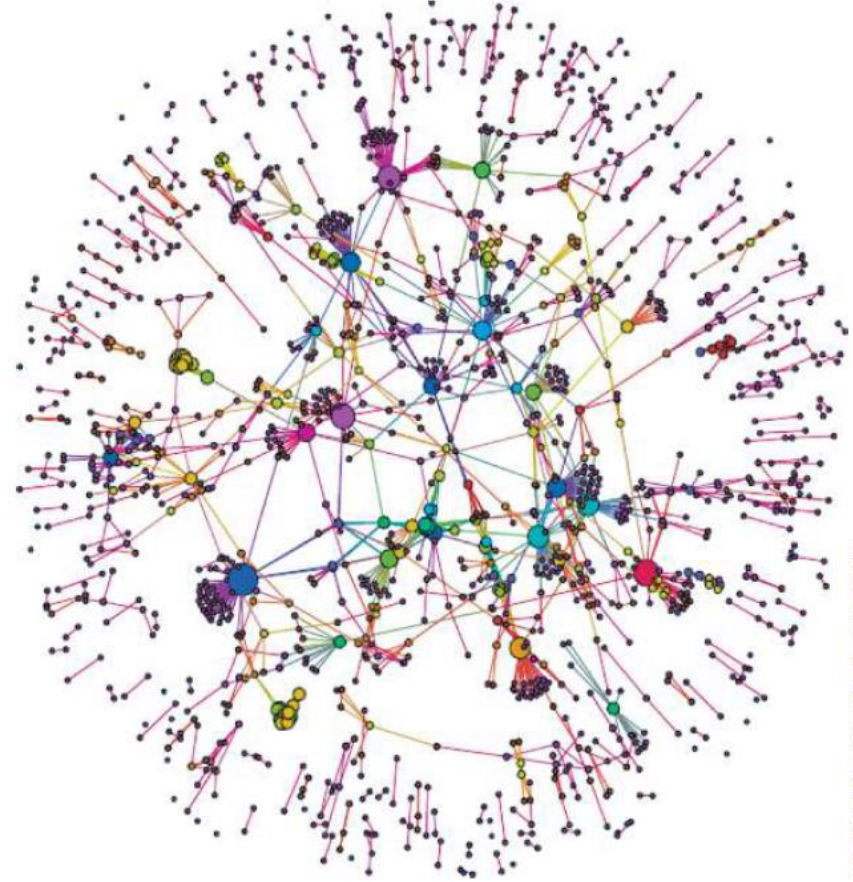
M. tuberculosis'in Hipoksi Yanıtında Proteomik Yaklaşımlar

- Proteomik analizler, *M. tuberculosis*'in hipoksiye yanıtında gerekli olan proteinleri tanımlamış ve beklendiği gibi süperoksit dismutaz gibi reaktif oksijen türleriyle savaşan proteinleri ortaya koymuştur.
- Ayrıca, toksin–antitoksin sistemleri ile bakteriye özgü lipoproteinlerin biyosentezine katılan proteinlerin de bu süreçte tespit edildiği görülmüştür.
- *M. tuberculosis* anaerobik solunuma geçtiğinde enerji metabolizmasını sürdürebilmek için nitrat ve nitrit taşıyıcılarının üretimi artmıştır.
- Bunun yanında, N-terminali “Pro-Glu/Pro-Pro-Glu” dizisi içeren en az 160 farklı karakterize edilmemiş proteinin varlığı belirlenmiş ve bu diziyi hedefleyen ilaçların potansiyel tedavi seçenekleri olabileceği öne sürülmüştür.



Tuberkülozda İnteraktom Haritalaması ve Kolektif Bilimsel Çalışmalar

- İnternet tabanlı bağış toplama ve sosyal medya, yeni tüberküloz ilaçlarının keşfi için araştırmacıları bir araya getiren Connect to Decode girişimiyle birleştirilmiştir.
- Bu girişime katılan 800'den fazla araştırmacı, *M. tuberculosis*'in tüm interaktomunu haritalamayı hedefleyerek 10.000'den fazla deneysel veri setini analiz etmiştir.
- Yapılan analizler sonucunda, genomdaki proteinlerin %87'si işlevsel olarak açıklanmış olup bu oran orijinal genom dizisindeki %52'lik açıklanmaya kıyasla büyük bir gelişmedir.
- Çalışmanın bir çıktısı olarak, 1400'den fazla proteinin 2500'den fazla fonksiyonel ilişki ile bağlandığı tam bir interaktom haritası oluşturulmuştur.



Vashisth, R. et al. 2012. *PLoS One* 7 (7): e39809

Yeni İlaç Hedeflerinin Belirlenmesi

- Connect to Decode girişimi kapsamında şimdiye kadar 17 potansiyel ilaç hedefi ve bu hedeflerin interaktomları tanımlanmıştır.
- Bu hedef proteinlerin, insan proteinleriyle veya insan ağız ve gastrointestinal mikrobiyomu proteinleriyle benzerlik göstermemesi yan etki riskini azaltan önemli bir özellik olarak değerlendirilmektedir.
- Bu durum, tüberküloz için daha güvenli ve hedefe yönelik ilaç geliştirme ihtimalini güçlendirmektedir.

M. tuberculosis Metabolomisinde Lipit Çeşitliliği

- Metabolomik çalışmalar henüz erken aşamada olsa da virülan ve attenüe *Mycobacterium* suşlarının karşılaştırılması 1000'den fazla farklı lipidin varlığını ortaya koymuştur.
- Bu lipidlerin çoğu *M. tuberculosis*'e özgü lipoproteinler olup bakterinin biyolojisi açısından kritik öneme sahiptir.
- Bu nedenle, *M. tuberculosis*'in lipid metabolizmasına ait proteomun tüberküloz tedavisi için çok sayıda potansiyel hedef içerdiği düşünülmektedir.



M. tuberculosis Sekretomu ve Tanısal Biyobelirteçler

- Bakterinin salgıladığı metabolitlerin envanteri olan sekretom profilinin çıkarılması, özellikle virülan suşlara özgü moleküllerin tanımlanmasını sağlamıştır.
- Bu moleküllerden biri olan 1-tuberculosinyladenosine adlı modifiye nükleotidin, *M. tuberculosis* ile enfekte insanlarda idrarda bulunduğu gösterilmiştir.
- Bu keşif, omik yaklaşımların patojeni belirli bir moleküle bağlama gücünü ortaya koymakta ve klinik tanıda kullanılabilecek yeni hastalık belirteçleri sağlamaktadır.
- Eğer bu modifiye nükleotid bakterinin yaşamı için zorunluysa, onun sentezini ya da işlevini bozan ilaçlar potansiyel anti-tüberküloz tedavileri arasında olabilir.



İnsan Genomu ve Sistem Biyolojisinin Rolü

- 2003 yılında 3 milyar baz çifti içeren insan genom dizisi tamamlanmış ve uluslararası bir çalışmayla kamuya açılmıştır.
- Başlangıçta yaklaşık 100.000 protein kodlayan gen olduğu düşünülse de güncel bilgi ile bu sayının 20.000 civarında olduğu anlaşılmıştır.
- Genomda proteini kodlayan kısımların çok daha az yer kaplaması, geri kalan DNA'nın görevine ilişkin temel soruları ortaya çıkarmıştır.
- Sistem biyolojisi yaklaşımı, genomun büyük kısmının “çöp DNA” olmadığını göstererek bu bölgelerin önemli işlevlere sahip olduğunu ortaya koymuştur.

ENCODE Projesi ve İnsan Genomunun İşlevsel Elemanları

- ENCODE projesi, insan genomundaki işlevsel elemanları tanımlamayı amaçlayan uluslararası bir girişimdir.
- Bu proje kapsamında RNA ekspresyonu ölçülmekte, DNA ve RNA ile etkileşen proteinler belirlenmekte ve farklı koşullarda epigenetik etkileşimleri anlamak için DNA metilasyonu incelenmektedir.
- Şimdiye kadar elde edilen bulgular, insan genomunun %80'inin en az bir hücre tipinde işlevsel olduğunu göstermiştir.
- Protein kodlamayan bu DNA bölgeleri, gen aktivitesini etkileyen protein bağlanma bölgeleri, gen susturulmasına yol açan kimyasal modifikasyon bölgeleri veya düzenleyici RNA'ların kaynağı olarak görev yapmaktadır.



ENCODE Bulgularının Hastalık ve Tanı Açısından Önemi

- ENCODE deneyleri, farklı kişilerde aynı genin hafif dizisel varyasyonlarını ortaya koyarak bu varyasyonların belirli genetik hastalıklarla ilişkisini aydınlatmıştır.
- Bu bulgular, insan DNA'sının nasıl çalıştığına dair derin bir anlayış sunmakta ve tanısal tıpta pratik uygulamalar üretmeye başlamıştır.
- Böylece sistem biyolojisi, genomun karmaşık düzenleyici yapısını anlamaya yönelik önemli katkılar sağlamış ve biyomedikal araştırmalara yeni perspektifler kazandırmıştır.

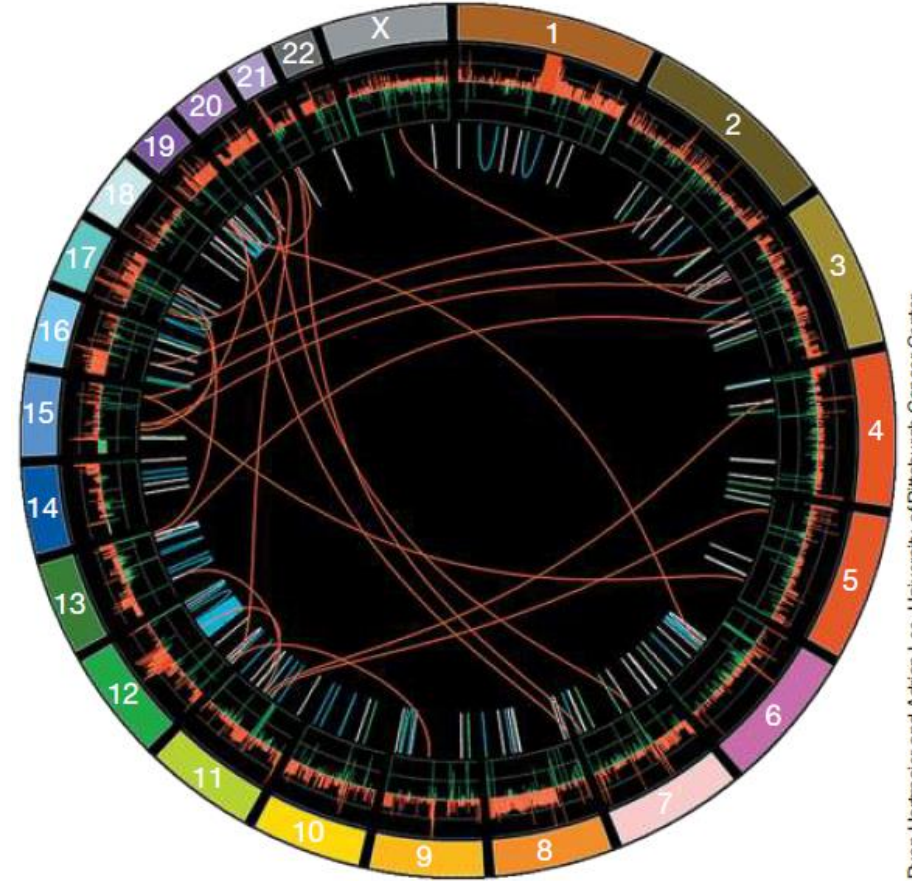
Genomik Çağ ve Sağlık Uygulamaları

- Yeni nesil dizileme teknolojilerinin gelişmesiyle insan genomunu dizileme maliyeti 1000 doların altına düşmüş ve çok büyük miktarda genom verisi üretilmiştir.
- Farklı kıtalardan 2500'den fazla kişinin genomlarının karşılaştırılmasıyla 88 milyondan fazla varyasyon bölgesi tanımlanmıştır.
- Bu genomik varyantlar tek nükleotid değişiklikleri, insersiyon ve delesyonlar ile yeniden düzenlenmelerden oluşur ve bunların hastalıkla ilişkisi her birey için farklı sonuçlar doğurabilir.
- Genomik varyantların hastalık riskine nasıl katkı verdiğini anlamak, tanılar geliştirilmesi, tedavilerin iyileştirilmesi ve hastalıkların önlenmesi için önemli bir temel sağlar.



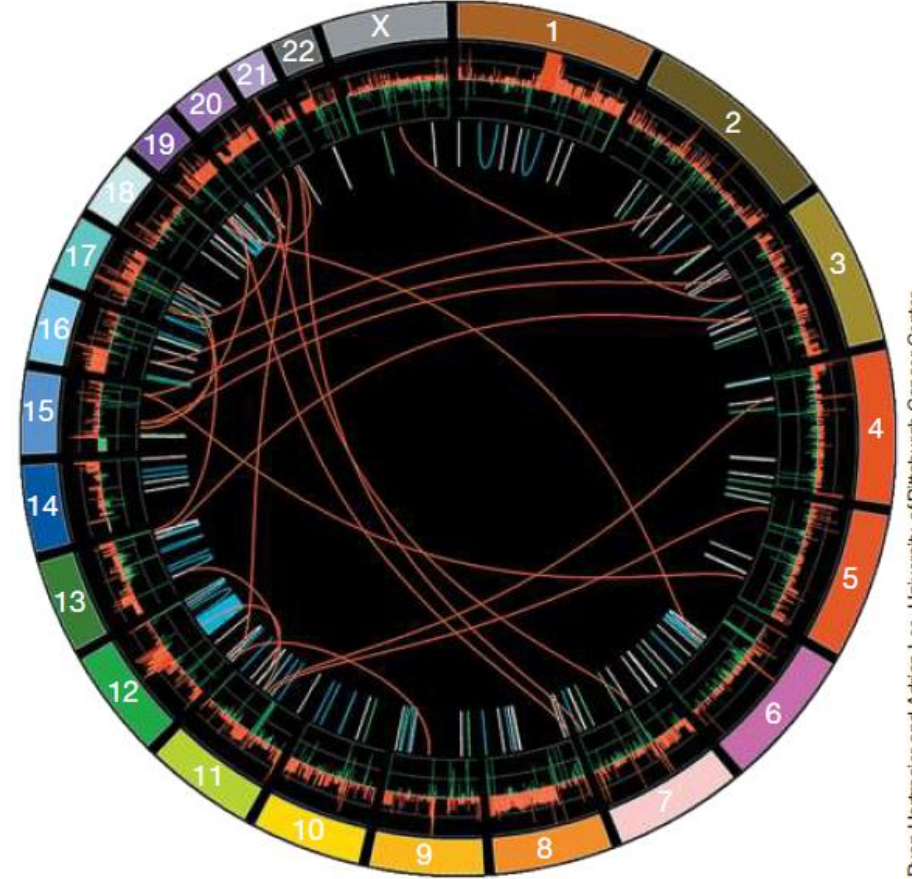
Kanser Genomiği ve Kişisel Risk Değerlendirmesi

- Genomik çağın sağladığı ilerlemeler, tümör genomlarının rutin olarak dizilenmesine olanak tanımış ve bu veriler Kanser Genom Atlas içinde toplanmıştır.
- Analizler her kanser türünün kendine özgü somatik mutasyon kombinasyonlarına sahip olduğunu göstermiştir.



Kanser Genomiği ve Kişisel Risk Değerlendirmesi

- Yandaki figür, metastatik bir meme kanseri örneğindeki kopya sayısı değişimlerini ve genomik yeniden düzenlemeleri göstermektedir.
- Bireyler belirli gen bölgeleri dizilenerek genotiplendirilebilir ve BRCA1 ile BRCA2 gibi tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar meme kanseri riskinin artıp artmadığını belirlemeye yardımcı olur.



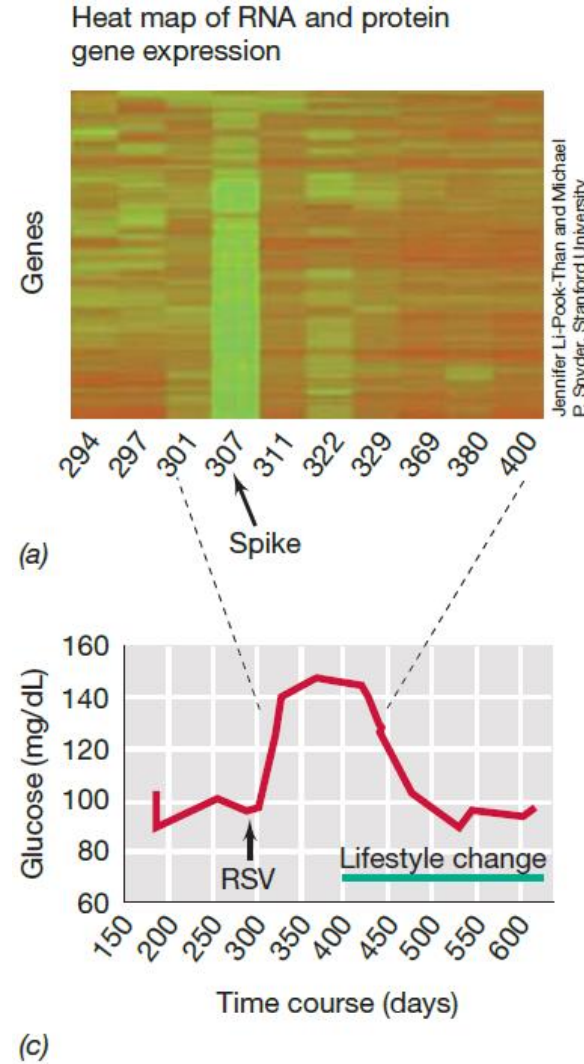
Omics Yaklaşımları ve Kişiselleştirilmiş Tıp

- Genomik, transkriptomik, proteomik, metabolomik ve farmakogenomik veriler birleştirilerek normal ve hastalık durumlarının birlikte değerlendirildiği kişiselleştirilmiş tıp anlayışı gelişmiştir.
- Kişiselleştirilmiş tıbbın ilk adımı, bireyin farklı omics katmanlarını bir araya getiren bütünlük bir Personal Omics Profile (iPOP) (Kişisel Omik Profili) oluşturulmasıdır.
- Bu profilin sağlıklı ve hastalık durumları boyunca izlenmesi, tıbbi risklerin değerlendirilmesi ve tanı ile tedavinin yönlendirilmesine katkı sağlar.
- iPOP uygulamaları, hastalık süreçlerini moleküler düzeyde takip etmeye olanak sağlayarak modern tıbbın kapsamını genişletmektedir.

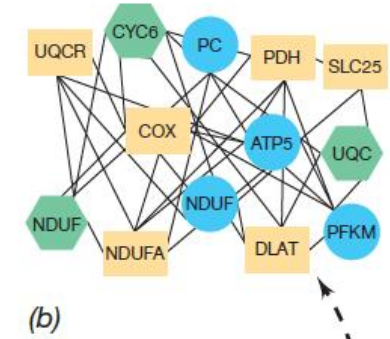


iPOP'un Uygulamaya Yansıması: Takip Çalışması

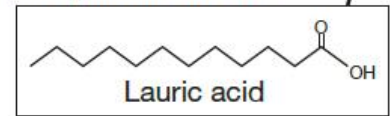
- Bir erkek bireyden iki yıl boyunca yirmi kez alınan kan örnekleri 5000 protein ve 4000 metabolitin düzeylerini kapsayan proteomik ve metabolomik analizlere tabi tutulmuştur.
- Çalışma bireyin tıbbi geçmişi ile uyumlu olarak koroner arter hastalığı riskini göstermiş ancak aynı zamanda tip 2 diyabet açısından da yüksek risk işaretleri ortaya koymuştur.



Sample pathway: glucose regulation of insulin secretion

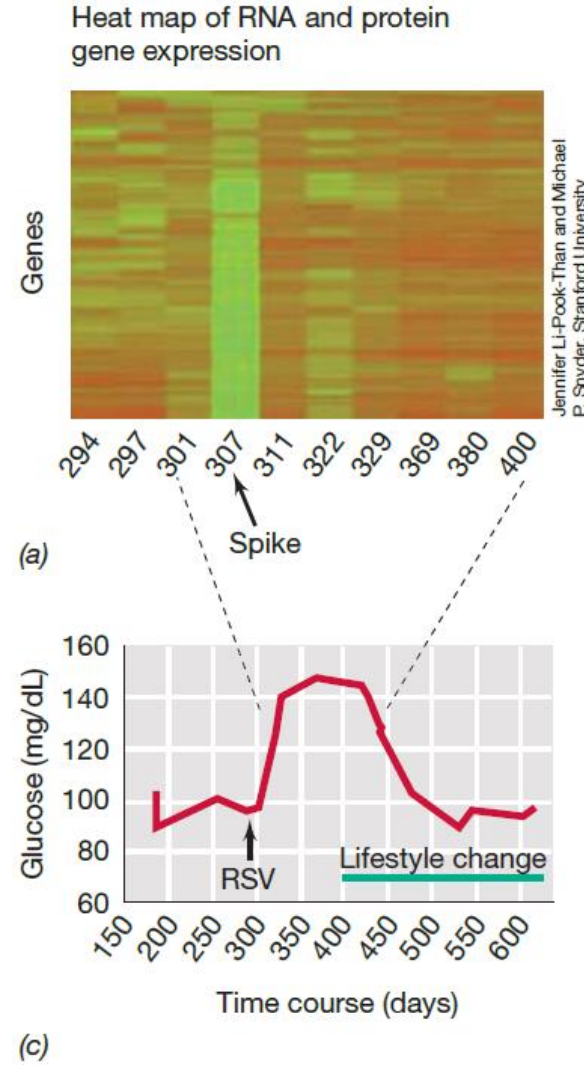


Sample metabolite:

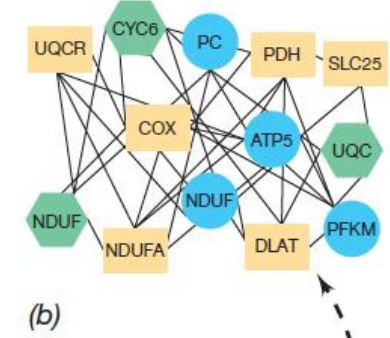


iPOP'un Uygulamaya Yansıması: Takip Çalışması

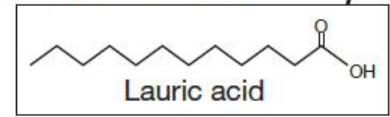
- Diyabet riski, viral enfeksiyon sırasında insülin reseptörüne bağlanan bir proteine karşı otoantikor artışı ve insülin yanıtıyla ilişkili gen ekspresyon değişimleri üzerinden belirlenmiştir.
- iPOP verilerinin ortaya koyduğu öngörünün ötesinde, birey, araştırma süresi içinde diyabet geliştirmiştir.



Sample pathway: glucose regulation of insulin secretion

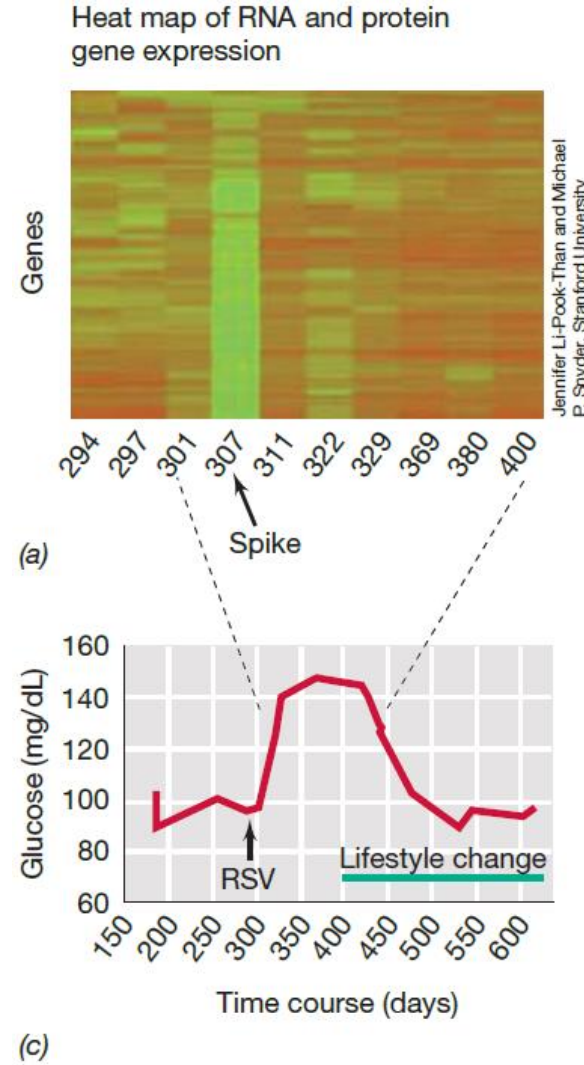


Sample metabolite:

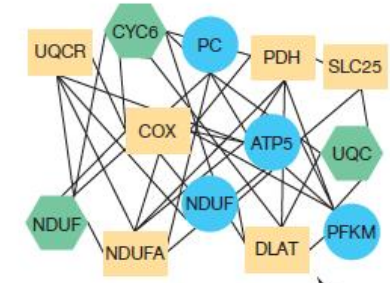


Diyabetin Moleküler İzlenmesi

- Diyabetin başlangıcı, glukoz metabolizmasıyla ilişkili RNA, protein ve metabolitlerdeki artışlarla, özellikle hemoglobin A1c ve laurik asit düzeylerindeki yükselmelerle takip edilmiştir.
- iPOP'un zaman içinde izlenmesi, bağışıklık yanıtındaki değişikliklerin hastalık gelişimini nasıl öngörebildiğini somut olarak göstermektedir.

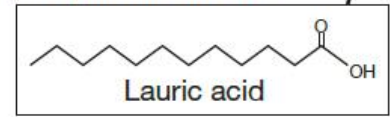


Sample pathway: glucose regulation of insulin secretion



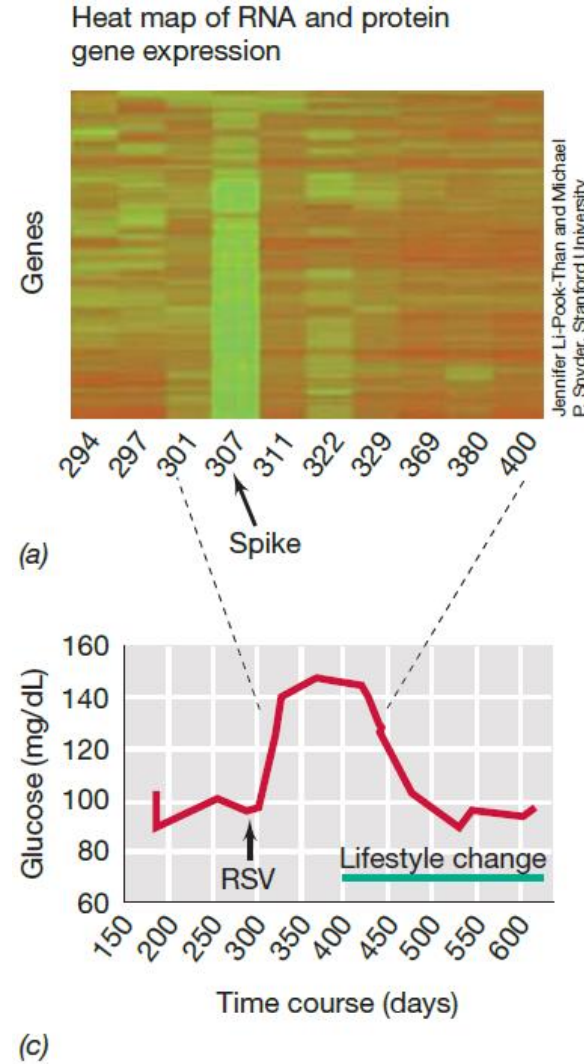
(b)

Sample metabolite:

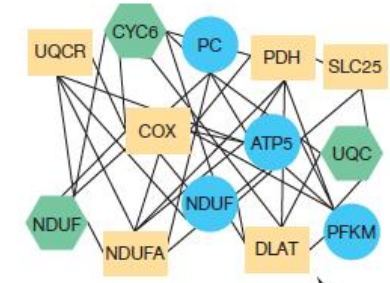


Diyabetin Moleküler İzlenmesi

- Bu çalışma, kişiselleştirilmiş tıbbın birey düzeyinde hastalık süreçlerini yakından izleyebilme potansiyelini ortaya koymaktadır.
- Bununla birlikte, veri analiz hataları, büyük veri depolama gereksinimleri, eşlik eden hastalıkların değerlendirilmesi ve etik konular iPOP'un rutin klinik kullanıma geçişinde çözülmesi gereken başlıca sorunlardır.

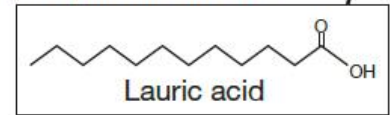


Sample pathway: glucose regulation of insulin secretion



(b)

Sample metabolite:



Genomik Devrimin Mikroorganizma Bilimine Etkisi

- Genomik çağ, mikrobiyolojiyi ve genel biyolojiyi köklü bir biçimde dönüştürmüş ve daha önce yanıtlanması güç pek çok bilimsel sorunun ele alınmasını mümkün kılmıştır.
- Bu bölümde sunulan örnekler, omics yaklaşımlarının sunduğu olanakların yalnızca yüzeyine değinildiğini göstermektedir.
- Omics alanındaki büyük sıçramalar genellikle yeni bir teknolojik gelişmeyle ortaya çıktığından, gelecekte çok daha kapsamlı ilerlemelerin beklenmesi doğaldır.
- Bir sonraki bölümde genomik tema sürdürülerek odak hücrelerden virüslere kaydırılacak ve Dünya'daki en bol ve genetik açıdan en çeşitli mikroorganizmaları ele alınacaktır.



Teşekkür ederim

Prof. Dr. Bektaş TEPE

