

ZBK458 Bitki Korumada Moleküler Yaklaşımlar



Hafta 3. Entomolojide omics yaklaşımları

Umut Toprak, Ph.D

Omics ve Om Nedir?

Omiks (ing. –omics): Biyolojide çalışılan alanı ifade eder, eklendiği kelimeye bütünlük, tümlük anlamı katmaktadır. Örneğin; genomiks, transkriptomiks, proteomiks,

-Om (ing. –ome): Çalışma alanların hedeflerini gösterir, karmaşık sistemleri bütüncül bir bakış açısıyla ele almayı ifade eder. Örneğin; genom, transkriptom, proteom.

Genomiks

- **Genom:** Bir organizmanın tüm kromozomlarındaki genetik bilginin tamamıdır.
- **Genomiks:** Bir canlının genomunu tanımlamak, ilgili organizmanın genlerini belirlemek ve gen bankaları gibi veri tabanlarında depolanmasını ifade eder. Bu çalışmalarda rekombinant DNA, DNA dizileme yöntemleri ve biyoinformatik yaklaşımlardan faydalanılarak gen ve DNA kütüphanelerin oluşturulmaktadır.

DNA İzolasyonu



Fragmentasyon



Dizi Analizi



Bioinformatik



BLAST

Genom analizleri ile hem ekzon hem de intron alanlarındaki SNP ya da mutasyonlar hakkında da bilgi sahibi olunabilir. Gen ekspresyonuna yönelik bilgi elde edilmez.

Genomiks

- Genomiks, genomun (yani DNA'nın) analizi ile ilgili tüm çalışmalarını kapsamaktadır.
- Genomiks çalışmaları genom projelerinin başladığı 90'lı yıllarla birlikte ivme kazanmıştır. DNA dizileme tekniklerinin ve biyoinformatik programlarının gelişimine bağlı olarak genomiks alanında yapılan çalışmalarda önemli ilerlemeler sağlanmıştır.
- Yapılan çalışmaların niteliği bakımından Genomiks'i yapısal genomiks ve işlevsel genomiks olarak iki alana ayırmak mümkündür.
- Yapısal genomiks DNA dizi bilgisinin ortaya çıkarılmasıyla ilgili tüm çalışmaları kapsar (ör: belli genlerin dizilenmesi veya genom dizilemeleri)
- İşlevsel (fonksiyonel) genomiks ise genlerin ürünü olan mRNA'ların analizlerini de kapsar. İşlevsel genomiks'in amaç fonksiyonel veri eldesi ile DNA dizi bilgisine biyolojik veya biyokimyasal bir anlam kazandırmaktır. Bu bağlamda Crisper/Cass, RNA interferans önemli fonksiyonel genom yaklaşımlarıdır.

Transkriptomiks

Transkriptom:

Bir organizmada belirli bir zamanda bir hücrede veya dokuda üretilen tüm mRNA'ları tanımlar.

Transkriptomiks: Hücre genomundan transkripsiyonla oluşan mRNA transkriptlerinin eş zamanlı incelenmesidir.

Total RNA İzolasyonu



mRNA İzolasyonu



cDNA'ların oluşturulması



Dizi Analizi



Bioinformatik



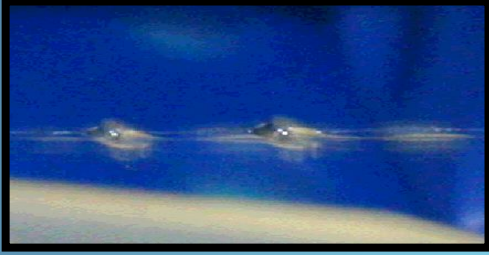
BLAST

Transkriptomiks

- Tek bir çalışma ile ilgili organizma ya da biyolojik sistemde ya da doku/organda çevresel değişken faktörlere de bağlı olarak tüm gen ekspresyon profili elde edilebilir. Oysaki bir proteomiks çalışmasında daha sınırlı sayıda protein üzerinden bilgi edilmektedir. Ayrıca bütün genlerin protein kodlamadığı (bakınız protein coding genes vs RNA coding genes) dikkate alındığında transkriptom yaklaşımı organizma biyolojisi açısından çok önemli bilgiler sağlayabilir.
- Ekspresyon profili farklı koşullar altında göreceli olarak değişen mRNA seviyelerinin tespitinde kullanılabilir.
- Bu çalışmalarda aktif olarak ifade edilemeyen genler belirlemek mümkün değildir.
- Genlerin ekspresyon verisi ile protein seviyeleri tutarlı olmayabilir.

araç gereçler

Proteomiks



Peritrofik Matriks



1-D+2-D PAGE



Diseksiyon

Araştırma Materyali

Spodoptera littoralis
Mamestra configurata
Lepidoptera:Noctuidae



Karşılaştırma

Transkriptomiks

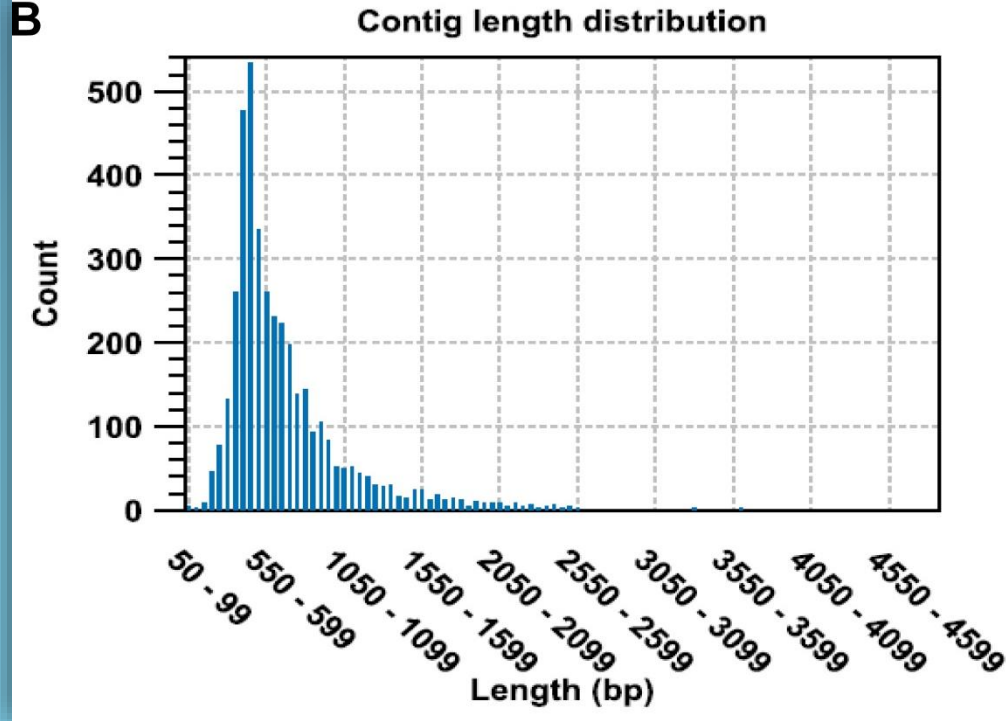


Mide



cDNA Kütüphanesi

Spodoptera littoralis mide transkriptomu

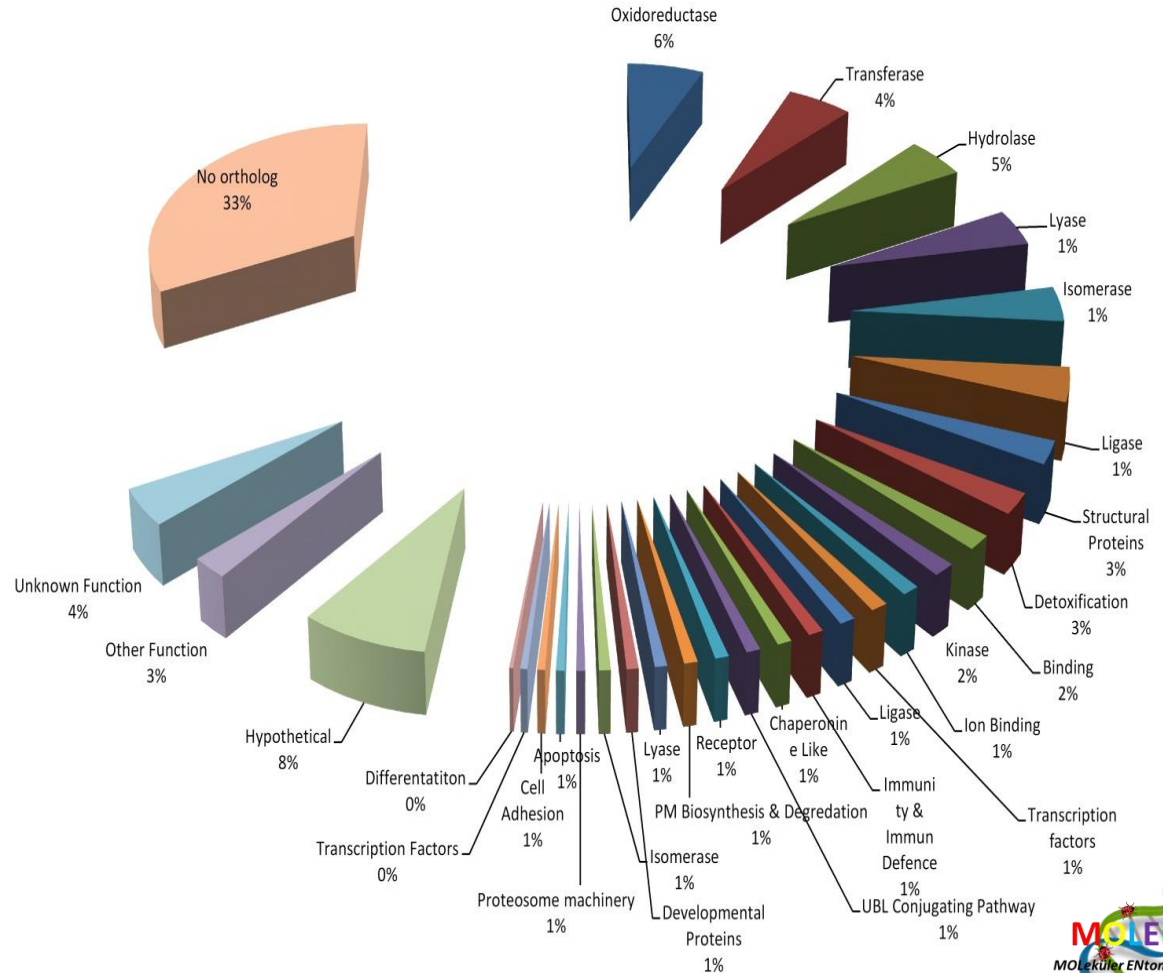


- Kontig (mRNA) sayısı: 3,945
- Ortalama kontig uzunluğu: 698 bp
- Toplam kontig uzunluğu: 2,757,478
- GC içeriği: %42,95

Spodoptera littoralis Mide Transkriptomu

Transporter proteinler:262
Oksiredüktazlar:223
Sindirim enzimleri: 203
Hidrolazlar:180
Transferaz: 169
Protein biyosentezi:165
Yapısal proteinler: 110
Detoksifikasyon:102
Bağlanma:69
Transkripsiyon faktörü:64
Kinaz: 61
İyon bağlayıcı:47
Ligaz: 42
Bağışıklılık&Savunma: 40
Şaperon: 38
UBL Konjugasyon: 37
Reseptör: 36
PM sentezi-yapısal: 35
Lyase:32
Gelişme proteinleri: 31
İzomeraz: 30
Proteozom : 23
Apoptosis: 22
Cell adhesion: 20
Farklılaşma: 10
Hipotetik: 335
Diğer fonksiyonlar: 100
Bilinmeyen fonksiyonlar: 176
Ortoloğu bulunmayan: 1282
Toplam: 3945

Spodoptera littoralis mide cDNA'larının Kategorizasyonu



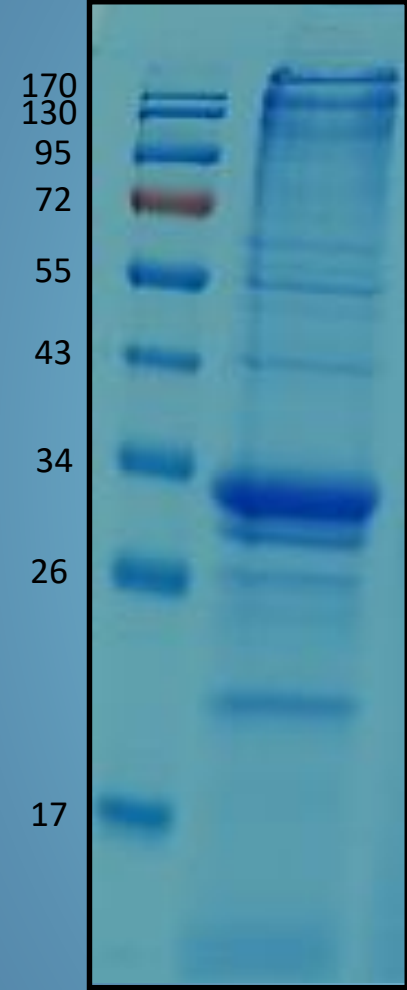
RPKM (Read of per kilobase exon per million reads): Bir örnekteki tek bir mRNA fragmantına karşılık gelen toplam okumaların sayısını bildiren bir değerdir.

FPKM (Fragments Per Kilobase Million): İki taraflı okumalarda kullanılır. Böylece genin tahmini ekspresyon düzeyi hakkında bilgi alınır.

Transkriptom analizleri ile ekzon alanlarındaki SNP ya da mutasyonlar hakkında da bilgi sahibi olunabilir.

Proteomiks

Proteom: Bir organizmada ya da biyolojik sistemde ya da doku/organda ifade edilen (bulunan) tüm proteinleri tanımlar.
Proteomik(s): Proteomun kalitatif kantitatif analizini ve proteinlerin birbirleriyle etkileşimlerini içeren çalışmalar.



<u>Protein</u>	<u>Protein sayısı</u>
1. PERİTROFİNLER	
1.1 Musin olmayanlar	3
1.2 Musinler	3
2. ENZİMLER	
2.1 Kitin düzenleme enzimleri	
Kitin deasetilazlar	2
2.2 Sindirim enzimleri	
Serin proteazları	33
Ekzopeptidazlar	11
Lipazlar	8
Beta-1,3-glukanazlar	1
Amilazlar	1
2.3 Diğer Enzimler	
Alkalin fosfataz	1
dsRNaz	1
Astasin	1
Panteinaz	1
3. DiĞER PROTEİNLER	
3.1 HMG176 Ortologları	6
3.2 Lsti99-Lsti201 Ortologları	2
3.3 Serpin	1
3.4 C Lektin	1
3.5 Polikalın	1
3.6 REPAT	1
3.7 Homolođu olmayan proteinler	3

M. Configurata Mide Proteinlerinin LC-MS/MS ile analizi

Toprak, Hegedus, Baldwin, Karcz, Coutu, Gillott, Erlandson. 2016. Insect Science 23:656-674.

Proteomiks

- Proteom, genom (hücre) tarafından ifade edilen proteinlerin tümünü kapsar;
- Proteomik; ise dinamik bir terim olup farklı koşullarda hücre, doku veya vücut sıvılarındaki proteinlerin analizidir ve kantitatif olarak bilgi sağlar.
- Proteomiks yaklaşımında proteinlerin rollerinin anlaşılması, protein-protein protein-glikan, ilişkileri, lokalizasyon ve .
- Genomik yaklaşımlardan farklı olarak, proteomik yaklaşımlar post-translasyonel modifikasyonlar ve etkileşimlerin incelenmesi konusunda da bilgi sağlar.
- Proteomik Araştırmalarda:
 - Örneklerin Hazırlanması (Saflaştırma, çözünürleştirme, yüksek miktarda bulunan proteinlerin uzaklaştırılması)
 - Protein ve Peptidlerin ayrılması (1D veta 2D-elektroforez; sıvı kromatografisi)
 - Ayrılan proteinlerin ve peptitlerin değerlendirilmesi (Kütle Spektrometrik Teknikler: MALDI-TOF, ESI-TOF, LC-MS/MS ve peptit kütle parmak izi)

Metabolomiks

Metabolit: Biyokimyasal reaksiyonlarda yer alan veya üretilen biyo-aktif küçük moleküllerdir. Diğer bir deyişle, metabolitler metabolizma faaliyetleri sonucu ortaya çıkan ara ürünleri ve ürünleri içerir. Metabolitlerin farklı işlevleri olabilir:

- Büyüme ve gelişme,
- Enerji kaynağı,
- Yapı taşı,
- Enzimleri stimüle ve inhibe etme,
- Savunma ve diğer organizmalarla etkileşimde yer alma (ör:feromonlar)

Ana metabolitler normal büyüme, gelişme ve üreme süreçleriyle doğrudan ilgilidir. Bunlara '**Primer metabolit**' denir. Primer metabolitler, aktif hücre çoğalması sırasında üretilirler. Örneğin, alkol tipik bir **primer metabolit**tir (maya ve bazı bakterilerin anaerobik metabolizması ürünüdür). Primer metabolitlere diğer örnekler olarak amino asitler, pürin, pürimidin ve vitaminler verilebilir.

Ürünlerin bazıları ise aktif üreme fazında değil de duraklama fazında oluşur. Bu metabolitlere '**Sekonder metabolit**' adı verilmektedir. Ekonomik açıdan değerli olan pek çok kimyasal aslında **sekonder metabolit**'tir. Sekonder metabolitlerin, primer metabolitlere kıyasla çok fazla üretimi mevcuttur. Örneğin antibiyotikler, miktoksinler, ve pigmentler sekonder metabolitlerdir.

Metabolomiks

Metabolom: Bir organizmada veya belirli bir biyolojik örnekte üretilen (bulunan) tüm metabolitleri inceler.

Metabolomiks: Metabolomun kalitatif ve kantitatif analizini içeren tüm çalışmaları kapsar.

- Bu yaklaşım ile metabolitlerin tanımlaması amaçlanır.
- Metabolomik yaklaşım, esas olarak transkriptomik ve proteomik yaklaşımlarla birlikte değerlendirildiğinde anlam ifade ederler.
- Metabolitler büyük varyasyon (yapı, moleküler ağırlık ve konsantrasyonları farklı olan yüzlerce metabolit olabilir). Aynı metabolitler ise farklı metabolik yollardan da gelebilir. Dolayısıyla farklı metabolik yolların ortaya konulması önemlidir.
- Metabolom proteom ve genoma göre daha spesifik ve hassas bir yaklaşımdır.
- Metabolitler değişken kimyasal yapılara sahiptirler, bu durum MS kullanılarak yapılan tanımlamalarda zorluklara neden olmaktadır.
- Böceklerde solunumdan sindirime, deri değiştirmeden diyapozaya kadar pek çok metabolit üretilir (sorbitol, kitosan, vitaminler, etc).
- Böceklerde karbohidrat, lipid, ve amino asit metabolizması memeli ve omurgalı modellerle pek çok benzerlik içermektedir.

Lipidomiks

Lipidom: Bir organizmada belirli yer ve zamanda üretilen (bulunan) tüm lipidler.

Lipidomiks: Bir biyolojik sistemde kalitatif ve kantitatif olarak genel lipid sınıfları ve spesifik lipidleri içeren tüm çalışmaları kapsar.

Glikomiks

Glikom: Bir hücre veya biyolojik sistemde üretilen (bulunan) glikan yapılarının tümüne denir.

Glikomiks: Bir hücre veya biyolojik sistemde üretilen (bulunan) glikan yapılarının kalitatif ve kantitatif analizini içeren tüm çalışmaları kapsar.

Glikomiks çalışmalarında farklı metotlar kullanılabilir.

Örneğin:

1. Nükleer Manyetik Rezonans (Nuclear Magnetic Resonans, NMR)
2. Kütle spektrometresi (Mass Spectrometry, MS)
3. Glikosidazlar
4. Lektin