

“

Bölüm 10

CAENORHABDITIS ELEGANS MODEL ORGANİZMASINDA TRANSKRİPTOM VE METABOLOM ANALİZLERİ

Şeyda BERK^{1,2}

Ayşe Nur PEKTAŞ¹

”

1 Dr. Öğr. Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Sivas, Türkiye.

e-posta:aysenurpektas@cumhuriyet.edu.tr, ORCID ID: 0000-0001-5621-2844,

Öğr. Gör. Dr. Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Fen Fakültesi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, 58140, Sivas, Türkiye, e-posta:sberk@cumhuriyet.edu.tr, ORCID ID: 0000-0003-4687-0223

GİRİŞ

Metabonomi veya metabolomik, spektrometri ve genomik araştırmaları sonrası bu teknolojiler ile geliştirilen yeni bir “omik” disiplini olup, genellikle, canlı sistemlerdeki tüm metabolitlerin ve eksojen uyarılara, genetik veya çevresel modifikasyona yanıt olarak metabolik varyasyonların eş zamanlı olarak ölçülmesini ifade eder. Metabonominin ana amacı, bir hücrenin veya canlı sistemin biyolojik durumunun, biyoakışkanlardaki metabolitlerin kimyasal profil modellerini ortaya çıkarmaktır. Bu nedenle, metabonomik çalışmaların odağı, küçük molekül metabolitlerinin kalitatif ve kantitatif karakterizasyonudur. Metabonominin toksikoloji, hastalık teşhisi, biyobelirteç keşfi ve ilaç alanındaki çalışmalar ile sağlık alanında büyük bir potansiyele sahip olduğu kanıtlanmıştır.

Metabolom doğası gereği büyük ve karmaşıktır. *Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisiae* gibi mikropların sırasıyla 3.700 ila 16.000 metaboliti vardır (Ramirez-Gaona ve ark., 2017; Sajed ve ark., 2016). Tek tek bitkilerin 30.000–80.000 metabolite sahip olduğu düşünülürken, tüm bitkiler âleminde 200.000 ila 1.000.000 arasında metabolitten oluşur (Binning, 2004; Saito & Matsuda, 2010). En çok sayıda bitki bileşikleri, ikincil metabolitler ve lipitlerdir. Omurgalılar, bitkilerde görülen daha “egzotik” ikincil metabolitlerin aksine, metabolitlerin çoğunluğu farklı lipit türleri olmak üzere, büyük olasılıkla tek tek bitkilere benzer boyutta bir metaboloma sahiptir. Serbest yaşayan insanlar çok çeşitli bir diyetle sahip oldukları ve çok çeşitli ilaçlara, gıda katkı maddelerine, kozmetiklere ve ev kimyasallarına maruz kaldıkları için, insan metabolomunun muhtemelen bir milyondan fazla endojen ve eksojen bileşikten oluştuğuna inanılmaktadır (Uppal ve ark., 2016). Ancak bugüne kadar *Homo sapiens*’te sadece yaklaşık 114.000 kadar metabolit tanımlanmıştır (Wishart ve ark., 2018).

Son yirmi yıl, genomik dizileme teknolojilerinde patlayıcı bir büyümeye tanık olmuştur. Artan verim, daha yüksek doğruluk ve daha düşük maliyetlerin bir sonucu olarak, son yirmi yılda genomik dizi veritabanlarında üstel bir büyüme olmuştur. Bununla birlikte, moleküler biyolojideki büyük bir zorluk, aynı genomun farklı doku tiplerinde, gelişim aşamalarında ve çevresel koşullarda farklı fenotiplere karmaşık haritalanması olmaya devam etmesidir. Transkriptlerin ve gen regülasyonunun ifadesinin daha iyi anlaşılması önemsiz olmamakla birlikte bu zorluğun merkezinde yer alır (Wang ve ark., 2019).

Transkriptomik, gen yapısı, ekspresyonu ve düzenlenmesi hakkında önemli bilgiler sunar ve birçok organizmada geniş çapta incelenmiştir. Nematod *Caenorhabditis elegans* da bu alanda çokça çalışılmış bir model organizmadır.

Nematod *C. elegans*'ın Transkriptom Analizleri

İnsan genomunun ve nematod *C. elegans*'ın DNA dizilerinin tamamlanması, ayrıntılı genetik ve moleküler analizlere uygun bir organizmadaki insan genlerinin ortologlarının büyük ölçekli tanımlanmasına ve analizine olanak tanımaktadır. *C. elegans*'ın gen düzenleyici ağların ayrıntılarını araştırmak için bir platform olarak kullanılmasının birçok önemli avantajı vardır. İki önemli avantajı, tam bir sekansa sahip en basit çok hücreli organizma olmasıdır (Consortium, 1998) ve tamamen belgelenmiş bir hücre soyuna sahip tek çok hücreli organizmadır (Sulston & Horvitz, 1981; Sulston ve ark., 1983). *C. elegans* hem forward hem de reverse genetiğe uygundur (Riddle ve ark., 1997). *C. elegans*'ın 2 haftalık yaşam süresi ve yalnızca 3 günlük üretim süresi, genomik analizler için fare veya zebra balığı modellerinin kullanımına kıyasla deneysel prosedürlerin çok daha kısa, daha esnek ve daha uygun maliyetli olmasını sağlamaktadır. Son olarak, solucanın küçük boyutu, şeffaflığı ve sınırlı hücre sayısı, daha karmaşık organizmalarda kolayca gözlemlenemeyen birçok karmaşık hücresel ve gelişimsel süreci gözlemlemeyi mümkün kılmaktadır. Organ ve dokuların morfogenezini tek bir hücre düzeyinde gözlenebilmektedir (White ve ark., 1986). *C. elegans* biyolojisinin ayrıntılarını araştırmak, insan sağlığı ve biyolojisi hakkında temel gözlemlere elde etmemize sağlayabilmektedir (Ellis & Horvitz, 1986; Hedgecock ve ark., 1983; Sulston, 1976).

Bir genomun protein kodlayan genleri, onun temel niteliklerinden biridir, ancak daha genel olarak *Caenorhabditis elegans* ve metazoanlar için, büyük intronlar, karmaşık alternatif ek biçimleri ve çok sayıda psödojen, protein kodlayan transkriptlerin doğru ve kapsamlı bir ek açıklamasını zorlu bir görevidir. Örneğin, *C. elegans* için, son derece doğru genom dizisi (Consortium, 1998), ifade edilen dizi etiketi (EST), cDNA ve açık okuma çerçevesi dizi etiketi (OST) dizileri ve son on yılda diğer ekspresyon veri setlerini toplamaya yönelik sistematik girişimler (Kohara, 1996; Reboul ve ark., 2003; Reboul ve ark., 2001; Waterston ve ark., 1992) ve son on beş yılda diğer ekspresyon veri setleri (Merrihew ve ark., 2008; Rogers ve ark., 2008; Wei ve ark., 2005), ilk gen tahminlerinin çoğunu doğrulamıştır ve diğerlerini değiştirmiştir. Yine de Ocak 2007 itibarıyla, yalnızca 7825 gen (%34) tüm ekleme bağlantıları ve sonuçta ortaya çıkan açık okuma çerçeveleri için tam deneysel desteğe sahipken, genlerin beşte biri herhangi bir deneysel destekten yoksun olarak kaydedilmiştir (L. W. Hillier ve ark., 2009). Desteklenmeyen genlerin çoğu muhtemelen önceki çabalardan kaçmıştır çünkü transkriptler düşük seviyelerde ve/veya yalnızca çok özel aşamalarda veya koşullarda ifade edilmektedir. Gen öngörüsünde kullanılan temel sıra ve bileşimdeki yanlışlıklar genellikle yetersiz ifade edilen genlerde daha zayıf olduğundan, bu genlerin tahmin edilmesi bile problemlili olabilmektedir (L. W. Hillier ve ark., 2009). Bu desteklen-

meyen gen modelleri, OST dizilişinden elde edilen sonuçların önerdiği gibi, kaynaşmış veya bölünmüş genler, yanlış ekleme bağlantıları ve eksik alternatif eklemeye biçimleri içerebilmektedir (Reboul ve ark., 2003; Reboul ve ark., 2001). Ek olarak, shotgun proteomik verileri, bazı genlerin veya ekzonların mevcut WormBase tahminlerinde tamamen eksik olduğunu göstermektedir (Merrihew ve ark., 2008).

RNA transkriptleri, bir genomda depolanan bilgilerin doğrudan okunmasını temsil eder. Bunların diferansiyel bolluğu da organizmada işleyen düzenleyici ağları yansıtır. RNA transkript seviyelerinin doğru ve kapsamlı karakterizasyonu, bir organizmanın genomunun onun özelliklerini ve davranışını nasıl belirlediğini anlamının merkezinde yer almaktadır (Boeck ve ark., 2016). Nematod *C. elegans elegans*'ta, çok sayıda farklı çalışma, farklı aşamalarda ve farklı dokularda RNA içeriğini analiz etmiştir. Elle seçilmiş az sayıda embriyonun kullanıldığı ayrıntılı bir embriyonik zaman süreci de dahil olmak üzere mikroarray çalışmaları, erken gelişim boyunca genel gen ifadesinin bir resmini vermiştir (Baugh ve ark., 2003; Stuart K Kim ve ark., 2001; Levin ve ark., 2012). *C. elegans* genlerinin tüm organizmadaki ifadesini incelemek için DNA mikroarray analizi veya seri gen ifadesi analizi (SAGE) kullanan birkaç çalışma yapılmıştır (Hill ve ark., 2000; Jones ve ark., 2001; S. K. Kim ve ark., 2001; Reinke ve ark., 2000). SAGE, mikrodizi analizini tamamlayıcı niteliktedir ve şu anda ifade edilen RNA'lar hakkında niteliksel ve niceliksel bilgi elde etmek için en hassas ve spesifik yöntemdir (Velculescu ve ark., 1995). SAGE etiketleri, çeşitli aşamalarda ve belirli dokularda veya hücre tiplerinde bulunan transkriptlerin daha derin bir analizini sağlamıştır (McGhee ve ark., 2009; Shin ve ark., 2008). Daha yakın zamanlarda, CEL-seq, ayrıntılı bir embriyonik zaman serisi oluşturmak için bireysel embriyolar üzerinde kullanılmıştır (Hashimshony ve ark., 2015). Bu çalışmaların her biri, yaşam döngüsü sırasında mevcut olan RNA transkriptleri hakkında yararlı bilgiler sağlamıştır, ancak hiçbiri tüm yaşam döngüsünü kapsamaz ve her birinin kendi eksiklikleri vardır. Mikroarray çalışmaları sınırlı bir dinamik aralığa sahiptir, genellikle yalnızca açıklamalı genleri tahlil eder, yakın paralogları ayırt edemez ve genellikle farklı izoformları göz ardı eder. Az sayıda embriyo kullanan çalışmalar, birden fazla amplifikasyon turu gerektirir ve muhtemelen ifade ölçümlerinde önemli bozulmalara neden olur. SAGE etiketleri, eklemeyi göz ardı ederek poliadenile [poli(A)] transkriptlerin yalnızca 3' ucunu test etmeye çalışır; A yönünden zengin sitelerde dahili hazırlama, yanlış pozitif etiketler oluşturabilir. Ek olarak, erken dönem SAGE etiketlerinin kısa olması, genom dizilişinde belirsizliğe yol açabilir. Bireysel embriyolar üzerindeki CEL-seq, çok kesin zaman noktalarını tahlil edebilir, ancak yine yöntem, poli(A) mRNA'ların yalnızca 3' ucunu saymayı amaçlar. Ek olarak, CEL-seq'in RNA'yı DNA'ya

kopyalamadaki sınırlı etkinliği ve sonraki amplifikasyon, daha düşük bolluk transkriptlerinin düzensiz temsiline yol açar. Tüm yaşam döngüsü boyunca tek bir kapsamlı veri setinin olmaması, farklı aşamalardaki gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır (Boeck ve ark., 2016).

Boeck ve arkadaşları, *C. elegans* için kapsamlı, yüksek kaliteli, tek biçimli olarak toplanmış bir ifade veri seti sağlamak için, dört hücreden başlayan ve 30 dakikalık aralıklarla örneklenen embriyonik örnekler dahil olmak üzere tüm yaşam döngüsü boyunca senkronize hayvanlardan alınan toplu örnekler üzerinde RNA-seq gerçekleştirmişlerdir (Boeck ve ark., 2016). Bu embriyo verilerinin elde edilmesi, toplu embriyo popülasyonlarını senkronize etmek için yeni bir yöntemin geliştirilmesini ve bireysel gelişimsel serilerdeki gen ekspresyonu tahminlerini iyileştirmek ve çoklu serileri birleştirmek için bir Bayesian yaklaşımı uygulanmıştır. Elde edilen yeni embriyo verileri, önceki yapılan çalışmalarda kullanılan larva evreleri, yavrular, erkekler ve yaşlı yetişkinlerden alınan ifade verileriyle birleştiğinde (Gerstein ve ark., 2010; Gerstein ve ark., 2014; LaDeana W Hillier ve ark., 2009), protein kodlayan genlerin yanı sıra tüm yaşam döngüsü boyunca kodlamayan transkriptlerin, ek bağlantılarının ve eklenmiş lider dizilerin modellerini içermiştir. Dauer aşamalarının yanı sıra genç erkekler de dahil olmak üzere hermafroditin tüm yaşam döngüsünü kapsayan veri setlerimiz, topluluk için zengin bir katalog olarak sunarak yaşam döngüsünün her aşamasında tüm hayvanda bulunan transkriptlerin kapsamlı bir resmini ortaya çıkarmışlardır.

C. elegans ve insan genomlarının en az 4.300 ortolog gen çiftine sahip olduğu tahmin edilmektedir. Bu genlerin birçoğunun işlevi her iki organizmada da bilinmemektedir, ancak nematod anatomisinin basitliği ve güçlü genetik araçlar işlevlerinin anlaşılmasına katkıda bulunması gerekmektedir. Temporal ve dokuya özgü promotörler vardır, ancak tek hücre promotörleri çok azdır veya hiç yoktur. Bir doku içindeki bireysel hücre kimliğinin kombinatoriyal örtüşmelerden kaynaklandığı bilinmektedir. SAGE teknolojisi, nematodda en az 14.600 genin ifadesini doğrulamıştır. Teknoloji geliştikçe bu sayı artacaktır. SAGE, *C. elegans*'taki genlerin yarısı için çok sayıda farklı etiket ortaya çıkarır; bu da, bu organizmada genlerin alternatif olarak eklenmesinin yaygın olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, SAGE etiketlerinin çoğu, nematod genomunun açıklama yapılmamış bölgelerine eşlenir ve bu nedenle yeni genleri tanımlayabilir.

Nematod *C. elegans*'ta Metabolom Analizleri

C. elegans araştırmalarına en son eklenen yaklaşımlar, nematod metabolizmasına ilişkin yeni ve daha derin araştırmalara olanak sağlayan metabolomik ve lipidomiktir. *C. elegans* gibi genetik olarak izlenebilir bir

model organizmanın fonksiyonel okuma metabolomik ve/veya lipidomik ile kombinasyonu, metabolizma ve metabolik düzenleme konusundaki bilgilerimizi ilerletme konusunda büyük umut vaat etmektedir.

C. elegans, karmaşık bir metaboloma sahiptir ve birkaç yeni molekül, örneğin yeni ascarosides, dafachronic asitler gibi bileşikler rutin olarak tanımlanır (Falcke ve ark., 2018; Izrayelit ve ark., 2012; Pungaliya ve ark., 2009; Von Reuss ve ark., 2012). Bu nematodun metabolomunu ve lipidomunu analiz etmek için farklı türde analitik yöntemler kullanılmıştır (Salzer & Witting, 2021).

***C. elegans* Metabolomikleri için Analitik Yöntemler**

• ***Ekstraksiyon Yöntemleri***

Metabolom ve lipidomun analizine yönelik ilk adım, ilgili bileşiklerin nematodlardan ekstraksiyonudur. Hedeflenmemiş metabolom analizinde mümkün olduğu kadar çok maddenin ekstraksiyonu gereklidir. Farklı solvent sistemleri her zaman belirli metabolitleri ve metabolit sınıflarını diğerlerine göre tercih edeceğinden, gerçekten hedefsiz bir ekstraksiyonun mevcut olmadığı belirtilmelidir. Ayrıca ekstraksiyon, biyolojik soruya ve analiz için kullanılacak analitik yöntemle bağlıdır. Metabolomu olabildiğince doğru bir şekilde analiz etmek için, ekstraksiyon sırasında metabolitlerin bozunmasını önlemek de gereklidir.

Bu nedenle, ekstraksiyonlar mümkün olan en düşük sıcaklıklarda yapılmalıdır. Nematod, ekstraksiyondan önce kırılması gereken sert bir kütiküle sahip olduğundan, *C. elegans*'tan metabolitlerin ekstraksiyonu zordur. *C. elegans*'ta manuel öğütme, homojenleştirme ve doku değirmenlerinde farklı öğütme ortamları dâhil olmak üzere farklı parçalama teknikleri denenmiştir (Geier ve ark., 2011). Bununla birlikte, numune bozulmasına neden olabileceğinden, boncuklu parçalama sistemleri kullanılırken numunelerin aşırı ısınmasını önlemek için özen gösterilmelidir. *C. elegans*'a farklı ekstraksiyon yöntemleri uygulanmıştır. En yaygın olarak (soğuk) metanol, etanol ve kloroform, tek tek veya kombinasyon halinde (farklı oranlarda) uygulanmıştır (Aguilaniu ve ark., 2016; Müthel ve ark., 2019; Teo ve ark., 2019; Zdraljevic ve ark., 2019).

Spesifik metabolitlerin veya lipitlerin analizi genellikle bunların başka numune hazırlama adımları kullanılarak zenginleştirilmesini gerektirir. İnce tabaka kromatografisi (TLC), lipit bileşimini belirlemek için analitik amaçlarla veya belirli madde sınıflarının hazırlanması için ek bir adım olarak kullanılan bir yaklaşımdır. TLC'de gliserofosfolipidler, seramidler, glikosfingolipidler, yağ asitleri veya steroller gibi ana lipid sınıfları ayrılabilir ve miktarları belirlenebilir. Kromatografik çözünürlük, ikinci

bir solvent sistemi kullanılarak iki boyutlu TLC'ye genişletilmesi yoluyla geliştirilebilir (Klapper ve ark., 2016; Salzer & Witting, 2021).

- ***Nükleer Manyetik Rezonans (NMR)***

Metabolomikte çoğunlukla tek boyutlu ¹H NMR spektroskopisi, organik bileşiklerin evrensel tespiti için hızlı ve çok uygun olduğu için kullanılır. NMR, minimum numune hazırlama ve müdahale ile kantitatif ve tahribatsızdır, bu nedenle diğer tekniklere kıyasla en düşük analitik varyasyonla sonuçlanır (Szeto ve ark., 2011). Yüksek hassasiyeti, metabolit bolluklarındaki küçük değişikliklerin bile tespit edilmesini sağlar. NMR, kalitatif (yapı) ve kantitatif bilgileri tek seferde sunar. Güçlü yanları özellikle MS'de iyonlaşması zor olan veya türevlendirme gerektiren maddelerde belirgindir. Bununla birlikte, MS ile karşılaştırıldığında NMR'nin önemli bir dezavantajı daha düşük hassasiyettir. Bu nedenle, yalnızca az miktarda bileşik 1D-¹H NMR kapsamındadır (Markley ve ark., 2017).

Hedeflenmemiş metabolomikte metabolit kapsamını artırmak için 1D-¹H NMR genellikle DI-MS, GC-FID, GC-MS veya LC-MS gibi diğer analitik platformlarla birleştirilir (Castro ve ark., 2013; Castro ve ark., 2012; Lourenço ve ark., 2015; Wan ve ark., 2017).

- ***Kütle Spektrometresi (MS)***

Kütle Spektrometresi (MS), metabolomikte NMR ile birlikte kullanılan güçlü analitik teknolojilerden biridir. Bir kütle spektrometresi, iyonları üreten ve bunları ilgili kütle-yük oranlarına (m/z) göre ayıran bir araçtır. İyonlar, kullanılan kütle spektrometresinin tipine bağlı olarak farklı fiziksel yaklaşımlar nedeniyle ayrılır. MS'de iyonların m/z oranları, hem kalitatif (m/z) hem de kantitatif (yoğunluk) bilgileri birleştirerek karşılık gelen yoğunluklarıyla birlikte ölçülür. Bununla birlikte, aynı moleküler formüle sahip metabolitler aynı kütle ve dolayısıyla aynı m/z değerine sahiptir. Benzer şekilde, toplam formülü çok benzer ancak aynı olmayan kütlelere ve m/z değerlerine sahip olabilirler. Bu tür bileşikler, ardışık MS (MS² veya MS/MS) deneyleri kullanılarak daha fazla analiz edilebilir. Burada, ilgilenilen iyonlar çoğunlukla çarpışma kaynaklı ayrışma (CID) kullanılarak parçalanır ve parça iyon m/z değerleri analiz edilerek potansiyel alt yapılar hakkında bilgi verilir. Hedeflenmemiş metabolomikte, MS/MS verilerini oluşturmak ve elde etmek için çoğunlukla veriye bağlı edinim (DDA) kullanılır. DDA'da, belirli kullanıcı tanımlı eşikleri karşılayan en yoğun iyonlar seçilir ve parçalanır. Hedeflenmemiş metabolomikte giderek daha fazla kullanılan başka bir yaklaşım, veriden bağımsız edinim (DIA) ya da Tüm Teorik fragman iyon spektrumlarının MS Sıralı Pencere Edinimi (SWATH) gibi yaklaşımlardır. DIA'nın yararı, her öncül iyonun parçalanacak olması ve yeniden edinmeye gerek kalmadan geriye dönük veri analizine izin vermesidir (Salzer & Witting, 2021).

MS, önceden kromatografik veya elektroforetik ayırma olmaksızın veya bunlar ile birlikte kullanılır. Kullanılan iyonizasyon kaynağı, örneğin GC için elektron iyonizasyonu (EI) veya kimyasal iyonizasyon (CI), doğrudan infüzyon, LC veya CE için elektrosprey iyonizasyon (ESI) ve atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon (APCI) gibi ön numune giriş sistemine bağlıdır. Doğrudan infüzyon (DI) MS’de numune, önceden ayrılmadan doğrudan iyonizasyon kaynağına enjekte edilir. İzobarik yapılar arasında ayırım yapmak için uçuş süresi (TOF) MS, Fourier dönüşümü iyon siklotron rezonans (FT-ICR) MS veya Orbitrap MS gibi yüksek çözünürlüklü (HR) MS’lerin kullanılması, bir DI-MS’de ön koşuldur. Ayırma, iyon bastırmayı azaltmak ve tek başına MS veya MS/MS ile ayrılamayan izomerik ve izobarik yapıları ayırmak için kullanılır. Ayrıca, ilgili ayırma özelliklerine dayalı olarak tespit edilen metabolitlerin fizikokimyasal özellikleri hakkında ek bilgiler sağlanır (Salzer & Witting, 2021).

C. elegans araştırmalarında kullanılan teknikler

Yukarıda bahsedilen analitik tekniklerin çoğu, *C. elegans* metabolomunun analizi için kullanılmıştır. Tablo 1. avantajları ve dezavantajları dâhil olmak üzere *C. elegans* metabolomik ve lipidomikte kullanılan analitik yöntemleri özetlemektedir (Salzer & Witting, 2021). Her yöntemin avantajları ve sınırlamaları bulunmaktadır. Örneğin, DI-MS sıklıkla *C. elegans* lipidomunun analizi için kullanılır. Böylece lipitlerin tanımlanması, doğru kütleleri ve/veya MS/MS karakterizasyonları üzerinde gerçekleştirilir. GC-MS, yağ asitlerini, amino asitleri veya organik asitleri tanımlamak için *C. elegans*’ta metabolomikler için kullanılmıştır.

Tablo1. *C. elegans* metabolomik/lipidomikte kullanılan analitik yöntemlere ve bunların avantajlarına, dezavantajlarına genel bakış (Salzer & Witting, 2021)

	Metod	Avantajları	Dezavantajları
NMR	¹ H NMR	Kantitatif, tahribatsız, minimum numune hazırlama	Sadece sulu, bol miktarda bulunan metabolitler
	DANS	Metabolitlerin biyolojik fonksiyonla basit bağlantısı	Sadece bol miktarda bulunan metabolitler
	HR-MAS	Metabolit ekstraksiyonu gerekmez, bozulmamış solucanlar	<i>C. elegans</i> ’ın büyük popülasyonları gereklidir, yalnızca bol miktarda bulunan metabolitler.
	HR-MACS + ¹ H NMR	Az sayıda solucan analiz edilebilir.	Sadece bol miktarda bulunan metabolitler
	¹³ C HMN + ¹³ C-işeretleme	¹ H-ID NMR’den çok daha fazla metabolit tespit edilir.	¹³ C- ¹³ C kuplajı nedeniyle azaltılmış hassasiyet, uygun puls programı gerekir (ct-HSQC)

MS	DI-MS	Hızlı ve yüksek verim	İzomerler ayırt edilemez
	GC-MS	Yüksek çözünürlük, Mutlak ölçüm mümkün. Lipitlerin ve metabolitlerin analizi mümkün	Türevlendirme gerekli
	LC-MS	Mutlak kantifikasyon mümkün, izomerlerin ayrılması, birçok metabolit tanımlanabilir.	GC'den daha düşük çözünürlük

SONUÇ

Mevcut transkriptom çalışmaları, büyük ölçüde, en yaygın şekilde kullanılan yüksek verimli cDNA dizileme teknolojilerine özgü kısa okuma uzunluklarına dayanmaktadır. Örneğin, *C. elegans* transkriptomunun analizi, transkript izoformlarının yarısından fazlası tam uzunluk desteğinden yoksundur ve bunun yerine izoformun tüm uzunluğunu kapsamayan kısa okumalardan elde edilen çıkarıma dayanmaktadır. *C. elegans*, değişmez hücre sayısı, kolay ve hızlı ekimi ve kısa ömrü nedeniyle metabolomik araştırmalar için ideal bir organizmadır. Metabolomik alanındaki en yaygın uygulamalardan biri, uzun ömürlü mutantlar ve solucanda yaşlanma çalışmalarıdır. Bu nedenle en çok çalışılan uzun ömürlü mutant *daf-2*'dir. Bununla birlikte, metabolizmadaki hangi değişikliklerin uzun ömürü olmayı desteklediği ve hangilerinin ilişkili olmadığı hala belirsizliğini korumaktadır. Metabolomik çalışmalar, ağırlıklı olarak, tek tek veya kombinasyon halinde, 1D ve 2D-NMR yaklaşımları gibi analitik platformlar ve MS'e bağlı farklı kolon seçiciliğine sahip GC ve LC kullanılarak gerçekleştirilir. Özellikleri metabolitlerden çok farklı olduğu için lipitler çoğunlukla kendi yöntemleriyle tek tek incelenir. Ağırlıklı olarak ya doğrudan infüzyonda ya da kromatografik ayırmadan sonra kütle spektrometresi ile analiz edilirler.

KAYNAKÇA

- Aguilaniu, H., Fabrizio, P., & Witting, M. (2016). The role of dafachronic acid signaling in development and longevity in *Caenorhabditis elegans*: digging deeper using cutting-edge analytical chemistry. *Frontiers in Endocrinology*, 7, 12.
- Baugh, L. R., Hill, A. A., Slonim, D. K., Brown, E. L., & Hunter, C. P. (2003). Composition and dynamics of the *Caenorhabditis elegans* early embryonic transcriptome.
- Binning, L. (2004). *Commercial vegetable production in Wisconsin*. University of Wisconsin--Extension.
- Boeck, M. E., Huynh, C., Gevirtzman, L., Thompson, O. A., Wang, G., Kasper, D. M., Reinke, V., Hillier, L. W., & Waterston, R. H. (2016). The time-resolved transcriptome of *C. elegans*. *Genome research*, 26(10), 1441-1450.
- Castro, C., Krumsiek, J., Lehrbach, N. J., Murfitt, S. A., Miska, E. A., & Griffin, J. L. (2013). A study of *Caenorhabditis elegans* DAF-2 mutants by metabolomics and differential correlation networks. *Molecular BioSystems*, 9(7), 1632-1642.
- Castro, C., Sar, F., Shaw, W. R., Mishima, M., Miska, E. A., & Griffin, J. L. (2012). A metabolomic strategy defines the regulation of lipid content and global metabolism by $\Delta 9$ desaturases in *Caenorhabditis elegans*. *BMC genomics*, 13(1), 1-13.
- Consortium, T. C. e. S. (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*, 282(5396), 2012-2018. <https://doi.org/doi:10.1126/science.282.5396.2012>
- Ellis, H. M., & Horvitz, H. R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44(6), 817-829. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90004-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90004-8)
- Falcke, J. M., Bose, N., Artyukhin, A. B., Rödelsperger, C., Markov, G. V., Yim, J. J., Grimm, D., Claassen, M. H., Panda, O., & Baccile, J. A. (2018). Linking genomic and metabolomic natural variation uncovers nematode pheromone biosynthesis. *Cell chemical biology*, 25(6), 787-796. e712.
- Geier, F. M., Want, E. J., Leroi, A. M., & Bundy, J. G. (2011). Cross-platform comparison of *Caenorhabditis elegans* tissue extraction strategies for comprehensive metabolome coverage. *Analytical Chemistry*, 83(10), 3730-3736.
- Gerstein, M. B., Lu, Z. J., Van Nostrand, E. L., Cheng, C., Arshinoff, B. I., Liu, T., Yip, K. Y., Robilotto, R., Rechtsteiner, A., & Ikegami, K. (2010). Integrative analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome by the modENCODE project. *Science*, 330(6012), 1775-1787.

- Gerstein, M. B., Rozowsky, J., Yan, K.-K., Wang, D., Cheng, C., Brown, J. B., Davis, C. A., Hillier, L., Sisu, C., & Li, J. J. (2014). Comparative analysis of the transcriptome across distant species. *Nature*, *512*(7515), 445-448.
- Hashimshony, T., Feder, M., Levin, M., Hall, B. K., & Yanai, I. (2015). Spatio-temporal transcriptomics reveals the evolutionary history of the endoderm germ layer. *Nature*, *519*(7542), 219-222.
- Hedgecock, E. M., Sulston, J. E., & Thomson, J. N. (1983). Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science*, *220*(4603), 1277-1279. <https://doi.org/10.1126/science.6857247>
- Hill, A. A., Hunter, C. P., Tsung, B. T., Tucker-Kellogg, G., & Brown, E. L. (2000). Genomic analysis of gene expression in *C. elegans*. *Science*, *290*(5492), 809-812. <https://doi.org/10.1126/science.290.5492.809>
- Hillier, L. W., Reinke, V., Green, P., Hirst, M., Marra, M. A., & Waterston, R. H. (2009). Massively parallel sequencing of the polyadenylated transcriptome of *C. elegans*. *Genome research*, *19*(4), 657-666.
- Hillier, L. W., Reinke, V., Green, P., Hirst, M., Marra, M. A., & Waterston, R. H. (2009). Massively parallel sequencing of the polyadenylated transcriptome of *C. elegans*. *Genome Res*, *19*(4), 657-666. <https://doi.org/10.1101/gr.088112.108>
- Izrayelit, Y., Srinivasan, J., Campbell, S. L., Jo, Y., von Reuss, S. H., Genoff, M. C., Sternberg, P. W., & Schroeder, F. C. (2012). Targeted metabolomics reveals a male pheromone and sex-specific ascaroside biosynthesis in *Caenorhabditis elegans*. *ACS chemical biology*, *7*(8), 1321-1325.
- Jones, S. J., Riddle, D. L., Pouzyrev, A. T., Velculescu, V. E., Hillier, L., Eddy, S. R., Stricklin, S. L., Baillie, D. L., Waterston, R., & Marra, M. A. (2001). Changes in gene expression associated with developmental arrest and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Res*, *11*(8), 1346-1352. <https://doi.org/10.1101/gr.184401>
- Kim, S. K., Lund, J., Kiraly, M., Duke, K., Jiang, M., Stuart, J. M., Eizinger, A., Wylie, B. N., & Davidson, G. S. (2001). A gene expression map for *Caenorhabditis elegans*. *Science*, *293*(5537), 2087-2092. <https://doi.org/10.1126/science.1061603>
- Kim, S. K., Lund, J., Kiraly, M., Duke, K., Jiang, M., Stuart, J. M., Eizinger, A., Wylie, B. N., & Davidson, G. S. (2001). A gene expression map for *Caenorhabditis elegans*. *Science*, *293*(5537), 2087-2092.
- Klapper, M., Findeis, D., Koefeler, H., & Döring, F. (2016). Methyl group donors abrogate adaptive responses to dietary restriction in *C. elegans*. *Genes & Nutrition*, *11*(1), 1-12.
- Kohara, Y. (1996). Large scale analysis of *C. elegans* cDNA. *Tanpakushitsu kakusan koso. Protein, nucleic acid, enzyme*, *41*(5), 715-720.

- Levin, M., Hashimshony, T., Wagner, F., & Yanai, I. (2012). Developmental milestones punctuate gene expression in the *Caenorhabditis* embryo. *Developmental cell*, 22(5), 1101-1108.
- Lourenço, A. B., Muñoz-Jiménez, C., Venegas-Calderón, M., & Artal-Sanz, M. (2015). Analysis of the effect of the mitochondrial prohibitin complex, a context-dependent modulator of longevity, on the *C. elegans* metabolome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1847(11), 1457-1468.
- Markley, J. L., Brüschweiler, R., Edison, A. S., Eghbalnia, H. R., Powers, R., Raftery, D., & Wishart, D. S. (2017). The future of NMR-based metabolomics. *Current opinion in biotechnology*, 43, 34-40.
- McGhee, J. D., Fukushige, T., Krause, M. W., Minnema, S. E., Goszczynski, B., Gaudet, J., Kohara, Y., Bossinger, O., Zhao, Y., & Khattri, J. (2009). ELT-2 is the predominant transcription factor controlling differentiation and function of the *C. elegans* intestine, from embryo to adult. *Developmental biology*, 327(2), 551-565.
- Merrihew, G. E., Davis, C., Ewing, B., Williams, G., Käll, L., Frewen, B. E., Noble, W. S., Green, P., Thomas, J. H., & MacCoss, M. J. (2008). Use of shotgun proteomics for the identification, confirmation, and correction of *C. elegans* gene annotations. *Genome research*, 18(10), 1660-1669.
- Müthel, S., Uyar, B., He, M., Krause, A., Vitrinel, B., Bulut, S., Vasiljevic, D., Marchal, I., Kempa, S., & Akalin, A. (2019). The conserved histone chaperone LIN-53 is required for normal lifespan and maintenance of muscle integrity in *Caenorhabditis elegans*. *Aging cell*, 18(6), e13012.
- Pungaliya, C., Srinivasan, J., Fox, B. W., Malik, R. U., Ludewig, A. H., Sternberg, P. W., & Schroeder, F. C. (2009). A shortcut to identifying small molecule signals that regulate behavior and development in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(19), 7708-7713.
- Ramirez-Gaona, M., Marcu, A., Pon, A., Guo, A. C., Sajed, T., Wishart, N. A., Karu, N., Djoumbou Feunang, Y., Arndt, D., & Wishart, D. S. (2017). YMDB 2.0: a significantly expanded version of the yeast metabolome database. *Nucleic Acids Res*, 45(D1), D440-d445. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1058>
- Reboul, J., Vaglio, P., Rual, J.-F., Lamesch, P., Martinez, M., Armstrong, C. M., Li, S., Jacotot, L., Bertin, N., & Janky, R. s. (2003). *C. elegans* ORFeome version 1.1: experimental verification of the genome annotation and resource for proteome-scale protein expression. *Nature genetics*, 34(1), 35-41.
- Reboul, J., Vaglio, P., Tzellas, N., Thierry-Mieg, N., Moore, T., Jackson, C., Shin-i, T., Kohara, Y., Thierry-Mieg, D., & Thierry-Mieg, J. (2001). Open-reading-frame sequence tags (OSTs) support the existence of at least 17,300 genes in *C. elegans*. *Nature genetics*, 27(3), 332-336.

- Reinke, V., Smith, H. E., Nance, J., Wang, J., Van Doren, C., Begley, R., Jones, S. J., Davis, E. B., Scherer, S., Ward, S., & Kim, S. K. (2000). A global profile of germline gene expression in *C. elegans*. *Mol Cell*, *6*(3), 605-616. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00059-9](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00059-9)
- Riddle, D. L., Blumenthal, T., Meyer, B. J., & Priess, J. R. (1997). In *C. elegans II*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Copyright © 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Rogers, A., Antoshechkin, I., Bieri, T., Blasiar, D., Bastiani, C., Canaran, P., Chan, J., Chen, W. J., Davis, P., Fernandes, J., Fiedler, T. J., Han, M., Harris, T. W., Kishore, R., Lee, R., McKay, S., Müller, H. M., Nakamura, C., Ozersky, P., . . . Sternberg, P. W. (2008). WormBase 2007. *Nucleic Acids Res*, *36*(Database issue), D612-617. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm975>
- Saito, K., & Matsuda, F. (2010). Metabolomics for functional genomics, systems biology, and biotechnology. *Annual review of plant biology*, *61*, 463-489.
- Sajed, T., Marcu, A., Ramirez, M., Pon, A., Guo, A. C., Knox, C., Wilson, M., Grant, J. R., Djoumbou, Y., & Wishart, D. S. (2016). ECMDDB 2.0: A richer resource for understanding the biochemistry of *E. coli*. *Nucleic acids research*, *44*(D1), D495-D501.
- Salzer, L., & Witting, M. (2021). Quo Vadis *Caenorhabditis elegans* Metabolomics—A Review of Current Methods and Applications to Explore Metabolism in the Nematode. *Metabolites*, *11*(5), 284. <https://www.mdpi.com/2218-1989/11/5/284>
- Shin, H., Hirst, M., Bainbridge, M. N., Magrini, V., Mardis, E., Moerman, D. G., Marra, M. A., Baillie, D. L., & Jones, S. J. (2008). Transcriptome analysis for *Caenorhabditis elegans* based on novel expressed sequence tags. *BMC biology*, *6*(1), 1-14.
- Sulston, J. E. (1976). Post-embryonic development in the ventral cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *275*(938), 287-297. <https://doi.org/10.1098/rstb.1976.0084>
- Sulston, J. E., & Horvitz, H. R. (1981). Abnormal cell lineages in mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, *82*(1), 41-55. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(81\)90427-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(81)90427-9)
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G., & Thomson, J. N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, *100*(1), 64-119. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(83\)90201-4](https://doi.org/10.1016/0012-1606(83)90201-4)
- Szeto, S. S., Reinke, S. N., & Lemire, B. D. (2011). ¹H NMR-based metabolic profiling reveals inherent biological variation in yeast and nematode model systems. *Journal of biomolecular NMR*, *49*(3), 245-254.
- Teo, E., Ravi, S., Barardo, D., Kim, H.-S., Fong, S., Cazenave-Gassiot, A., Tan, T. Y., Ching, J., Kovalik, J.-P., & Wenk, M. R. (2019). Metabolic stress is a

primary pathogenic event in transgenic *Caenorhabditis elegans* expressing pan-neuronal human amyloid beta. *Elife*, 8, e50069.

- Uppal, K., Walker, D. I., Liu, K., Li, S., Go, Y.-M., & Jones, D. P. (2016). Computational metabolomics: a framework for the million metabolome. *Chemical research in toxicology*, 29(12), 1956-1975.
- Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science*, 270(5235), 484-487. <https://doi.org/10.1126/science.270.5235.484>
- Von Reuss, S. H., Bose, N., Srinivasan, J., Yim, J. J., Judkins, J. C., Sternberg, P. W., & Schroeder, F. C. (2012). Comparative metabolomics reveals biogenesis of ascarosides, a modular library of small-molecule signals in *C. elegans*. *Journal of the American Chemical Society*, 134(3), 1817-1824.
- Wan, Q.-L., Shi, X., Liu, J., Ding, A.-J., Pu, Y.-Z., Li, Z., Wu, G.-S., & Luo, H.-R. (2017). Metabolomic signature associated with reproduction-regulated aging in *Caenorhabditis elegans*. *Aging (Albany NY)*, 9(2), 447.
- Wang, B., Kumar, V., Olson, A., & Ware, D. (2019). Reviving the transcriptome studies: an insight into the emergence of single-molecule transcriptome sequencing. *Frontiers in genetics*, 10, 384.
- Waterston, R., Martin, C., Craxton, M., Huynh, C., Coulson, A., Hillier, L., Durbin, R., Green, P., Shownkeen, R., & Halloran, N. (1992). A survey of expressed genes in *Caenorhabditis elegans*. *Nature genetics*, 1(2), 114-123.
- Wei, C., Lamesch, P., Arumugam, M., Rosenberg, J., Hu, P., Vidal, M., & Brent, M. R. (2005). Closing in on the *C. elegans* ORFeome by cloning TWINS-CAN predictions. *Genome Res*, 15(4), 577-582. <https://doi.org/10.1101/gr.3329005>
- White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N., & Brenner, S. (1986). The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 314(1165), 1-340. <https://doi.org/10.1098/rstb.1986.0056>
- Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Marcu, A., Guo, A. C., Liang, K., Vázquez-Fresno, R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Karu, N., Sayeeda, Z., Lo, E., Assempour, N., Berjanskii, M., Singhal, S., Arndt, D., Liang, Y., Badran, H., Grant, J., . . . Scalbert, A. (2018). HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res*, 46(D1), D608-d617. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1089>
- Zdraljevic, S., Fox, B. W., Strand, C., Panda, O., Tenjo, F. J., Brady, S. C., Crombie, T. A., Doench, J. G., Schroeder, F. C., & Andersen, E. C. (2019). Natural variation in *C. elegans* arsenic toxicity is explained by differences in branched chain amino acid metabolism. *Elife*, 8, e40260.