



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**METAMORFİK VE NEOTENİK AKSOLOTLAR'IN
METAGENOMİKS ANALİZİNİN YAPILMASI VE
KARŞILAŞTIRILMASI**

BERNA YILDIRIM

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. TURAN DEMİRCAN

İSTANBUL-2017



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**METAMORFİK VE NEOTENİK AKSOLOTLAR'IN
METAGENOMİKS ANALİZİNİN YAPILMASI VE
KARŞILAŞTIRILMASI**

BERNA YILDIRIM

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. TURAN DEMİRCAN

İSTANBUL-2017

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji
Tez Sahibi : Berna YILDIRIM
Tez Başlığı : Metamorfik ve Neotenik Aksolotlların Metagenomik
Analizinin Yapılması ve Karşılaştırılması
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kavacık Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 18.08.2017

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Yrd.Doç.Dr. Turan DEMİRCAN

Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

İmza



Sınav Jüri Üyeleri

Doç.Dr.Muzaffer Başak ULKAY

İstanbul Üniversitesi

Yrd.Doç.Dr.İlknur KESKİN

İstanbul Medipol Üniversitesi



Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun .06./09./2017... tarih ve 2017...../..25..... - .06.... sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Selim ÇAMKILI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

BERNA YILDIRIM



TEŞEKKÜR

Desteğini ve güvenini esirgemeyen, kendisinden çok şey öğrendiğim danışmanım Yrd. Doç. Dr. Turan DEMİRCAN'a,

Eğitimim süresince bana kattıklarından dolayı Yrd. Doç. Dr. İlknur KESKİN'e,

Tecrübelerini paylaşan Prof. Dr. Tangül MÜDOK'a, Yrd. Doç. Dr. Şule AYLA'ya, Yrd. Doç. Dr. Bilal Ersan KERMAN'a, Yrd. Doç. Dr. Seda KARABULUT'a,

Desteklerinden dolayı Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK'e, Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ'a ve pek kıymetli tüm REMER Ailesi'ne,

Yardımsaver ve sevecen ekip arkadaşlarım Ece Cana FEŞÇİOĞLU'na, Harbiye HACİBEKTAŞOĞLU'na, Özge BAŞSARAÇ'a,

Çalışmalarına katkılarından dolayı ekip arkadaşlarım Mahmut Erhan AVŞAROĞLU'na, Ayşe Elif İLHAN'a,

Tez çalışmam boyunca bana deneyimleriyle ve dostluklarıyla çok yardımcı olan Arş. Gör. Bircan KOLBAŞI'na, Arş. Gör. Nilüfer AYTÜRK'e, Öğr. Gör. Hilal EREN GÖZEL'e, Özge BİÇEROĞLU'na, Volkan BÜLBÜL'e Eşref ÇELİK'e, Arş. Gör. Duygu GÜRİSOY'a, Arş. Gör. Oya KORKMAZ'a,

Başladığım ilk günden beri hep yanımda olan canım arkadaşlarım Gülsena BAYDAŞ ve Sadık BAY'a,

Bana her zaman inanan, bu dünyada sahip olduğum en kıymetli varlıklar babam Kadir YILDIRIM'a ve annem Döndü YILDIRIM'a,

Hayatım boyunca her zaman en favori yol arkadaşlarım kardeşlerim Hasan Basri YILDIRIM'a, Nazlıcan YILDIRIM'a ve Elif Sude YILDIRIM'a,

En az annem ve babam kadar desteklerini gördüğüm Elif BALTACI ve İsmail BALTACI'ya sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU.....	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
TABLO LİSTESİ.....	vii
RESİM LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR.....	ivi
1.ÖZET.....	1
2.ABSTRACT.....	2
3.GİRİŞ VE AMAÇ	3
4.GENEL BİLGİLER.....	4
4.1.Aksolotl	4
4.1.1.Aksolotl'un sınıflandırması ve biyolojisi.....	4
4.1.2.Aksolotl'un rejenerasyon kapasitesi	5
4.2.Metamorfoz	6
4.2.1.Amfibilerde metamorfoz	6
4.2.2.Aksolotl'da metamorfoz.....	7
4.2.3.Troid hormonu ile metamorfoz	8
4.3.Mikrobiyota	11
4.3.1.Omurgalı canlılarda mikroorganizmalar	11
4.3.2.Mikrobiyota ve konak ilişkisi.....	16
4.3.3.Metamorfoz ve mikroorganizmalar arasındaki ilişki.....	19
4.3.4.Kültürden bağımsız mikroorganizma tanımlaması.....	21
4.3.5.Mikrobiyom araştırmalarında yeni nesil sekanslama.....	23

4.3.6. Alfa, beta, gama ölçütleri ve operasyonel taksonomik birimler.....	23
5. MATERYAL ve METOT.....	28
5.1. Aksolotllar'ın Bakımı ve Metamorfoza İndüklenmesi.....	28
5.1.1. Metamorfoza indüklenmesi.....	28
5.2. Biyolojik Replika Oluşturma.....	29
5.2.1. Neotenik Aksolotllar için biyolojik replikalar oluşturma.....	29
5.2.2. Metamorfik Aksolotllar için biyolojik replikalar oluşturma.....	30
5.3. Kullanılan Malzemeler.....	31
5.4. Aksolotl'ların Organ Örneklerinin Alınması ve Organ Örneklerinden DNA İzolasyonu.....	32
5.4.1. Anestezik hazırlama.....	32
5.4.2. Organ örneklerinin alınması.....	33
5.4.3. DNA izolasyonu.....	33
5.4.3.1. Dokulardan DNA izolasyonu.....	33
5.4.3.2. Fekal maddeden DNA izolasyonu.....	34
5.4.3.3. Qubit assay protokolü.....	35
5.4.3.3.1. Qubit assay sonuçları.....	36
5.4.3.3.2. Polimeraz zincir reaksiyonu.....	36
5.5. İzole Edilen DNA'lardan 16S Kütüphanesinin Hazırlanması ve Dizi Analizinin Yapılması.....	36
5.5.1. 16S primer seti.....	37
5.5.2.1. 16S analizinin yapılması.....	38
5.6. Aksolotl Organ Örneklerine Gram Boyama Yapılması.....	39
5.6.1. Katı besiyerlerine ekim.....	39
5.6.2. Gram boyama.....	40

5.6.2.1.Parafine gömülü dokularda gram boyama.....	40
5.6.2.2.Petrilere ekili dokulardan gram boyama.....	40
6.BULGULAR.....	41
6.1.Gram Boyama ile Mikrobiyal Kolonilerin Varlığının Tespiti.....	41
6.2.Mikrobiyal Çeşitlilik.....	50
6.3.Bakteri Kolonilerinin Alfa ve Beta Çeşitliliği.....	67
6.3.1.Alfa çeşitlilik.....	67
6.3.2.Beta çeşitlilik.....	72
6.4.Metabolizma ve Yolaklar.....	75
7.TARTIŞMA.....	77
8.SONUÇ.....	82
9.KAYNAKLAR.....	83
10.ETİK KURUL ONAYI.....	96
11.ÖZGEÇMİŞ.....	98

TABLO LİSTESİ

Tablo5.3.1. Kullanılan malzemeler.....	31
Tablo 5.4.3.3.1.Qubit assay sonuçları.....	36
Tablo5.5.1.1.PZR reaksiyonu için kullanılan enzimlerin miktarı.....	37
Tablo5.5.1.2.PZR reaksiyonu şeması.....	38
Tablo6.4.1.Tax4Fun'a dayanan KEGG analiziyle örneklerdeki mikroorganizmalar tarafından üretilen proteinler.....	76



RESİM LİSTESİ

Resim.4.2.2.1. Metamorfoza indüklenen Aksolotl'un belirli günlerdeki görünümleri.....	8
Resim.6.1.1. Neotenik Aksolotl mide gram boyaması.....	41
Resim.6.1.2. Neotenik Aksolotl bağırsak gram boyaması.....	42
Resim.6.1.3. Neotenik Aksolotl deri gram boyaması.....	42
Resim.6.1.4. Neotenik Aksolotl mide gram boyaması.....	43
Resim.6.1.5. Neotenik Aksolotl bağırsak gram boyaması.....	43
Resim.6.1.6. Neotenik Aksolotl deri gram boyaması.....	44
Resim.6.1.7. Metamorfik Aksolotl mide gram boyaması.....	44
Resim.6.1.8. Metamorfik Aksolotl bağırsak gram boyaması.....	45
Resim.6.1.9. Metamorfik Aksolotl deri gram boyaması.....	45
Resim.6.1.10. Neotenik Aksolotl mide petri gram boyaması.....	46
Resim.6.1.11. Neotenik Aksolotl bağırsak petri gram boyaması.....	46
Resim.6.1.12. Neotenik Aksolotl deri petri gram boyaması.....	47
Resim.6.1.13. Neotenik Aksolotl dışkı petri gram boyaması.....	47
Resim.6.1.14. Neotenik Aksolotl deri petri gram boyaması.....	48
Resim.6.1.15. Neotenik Aksolotl deri petri gram boyaması.....	48
Resim.6.1.16. Neotenik Aksolotl deri petri gram boyaması.....	49

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil.4.1.1.1.Aksolotl'un genel görünümü ve organlarının organizasyonu.....	5
Şekil.4.3.2.1.İnsan vücudunda mikroorganizmaların dağılımı.....	17
Şekil.4.3.2.2. Kommensal mikrobiyata ve konakçı ilişkisi.....	18
Şekil.4.3.4.1.Mikroorganizma ve virüslerden kültür ve kültürden bağımsız genom eldesi.....	21
Şekil.5.4.1.Metod işleyiş sırası.....	32
Şekil.6.2.1.Neotenik Aksolotl bağırsak, deri, mide ve dışkı örneklerinde filum düzeyinde mikrobiyal çeşitlilik.....	51
Şekil.6.2.2.Metamorfik Aksolotl bağırsak, deri, mide ve dışkı örneklerinde filum düzeyinde mikrobiyal çeşitlilik.....	52
Şekil.6.2.3.Neotenik ve metamorfik Aksolotl'da biyolojik replikaların filum düzeyinde ısı haritası.....	53
Şekil.6.2.4.Neotenik Aksolotl bağırsak, deri, mide ve dışkı örneklerinde sınıf düzeyinde mikrobiyal çeşitlilik.....	54
Şekil.6.2.5.Metamorfik Aksolotl bağırsak, deri, mide ve dışkı örneklerinde sınıf düzeyinde mikrobiyal çeşitlilik.....	55
Şekil.6.2.6.Neotenik ve metamorfik Aksolotl'da biyolojik replikaların sınıf düzeyinde ısı haritası.....	56
Şekil.6.2.7.Neotenik Aksolotl bağırsak, deri, mide ve dışkı örneklerinde takım düzeyinde mikrobiyal çeşitlilik.....	58
Şekil.6.2.8.Metamorfik Aksolotl bağırsak, deri, mide ve dışkı örneklerinde takım düzeyinde mikrobiyal çeşitlilik.....	59
Şekil.6.2.9.Neotenik ve metamorfik Aksolotl'da biyolojik replikaların takım düzeyinde ısı haritası.....	60

Şekil.6.2.10.Neotenic Aksolotl bağırsak, deri, mide ve dışkı örneklerinde familya düzeyinde mikrobiyal çeşitlilik.....	61
Şekil.6.2.11.Metamorfik Aksolotl bağırsak, deri, mide ve dışkı örneklerinde familya düzeyinde mikrobiyal çeşitlilik.....	62
Şekil.6.2.12.Neotenic ve metamorfik Aksolotl'da biyolojik replikaların familya düzeyinde ısı haritası.....	63
Şekil.6.2.13.Neotenic Aksolotl bağırsak, deri, mide ve dışkı örneklerinde cins düzeyinde mikrobiyal çeşitlilik.....	64
Şekil.6.2.14.Metamorfik Aksolotl bağırsak, deri, mide ve dışkı örneklerinde cins düzeyinde mikrobiyal çeşitlilik.....	65
Şekil.6.2.15.Neotenic ve metamorfik Aksolotl'da biyolojik replikaların cins düzeyinde haritası.....	66
Şekil.6.3.1.1.Türlerin çeşitliliğinin ve benzerlik derecelerinin Filogenetik Çeşitlilik metriğine göre değerlendirilmesi.....	68
Şekil.6.3.1.2.Türlerin çeşitliliğinin ve benzerlik derecelerinin Operasyonel Taksonomik Birimler metriğine göre değerlendirilmesi.....	69
Şekil.6.3.1.3.Türlerin çeşitliliğinin ve benzerlik derecelerinin Chao1 metriğine göre değerlendirilmesi.....	70
Şekil.6.3.1.4.Türlerin çeşitliliğinin ve benzerlik derecelerinin Shannon metriğine göre değerlendirilmesi.....	71
Şekil.6.3.2.1.Metamorfoz öncesi ve sonrası örneklerin beta çeşitlilik analizi.....	73
Şekil.6.3.2.2.Neotenic ve metamorfik Aksolotl örneklerinde beta çeşitliliğinin Weighted UniFrac Distance Metriğine dayanan bir PcoA plot ile gösterim.....	74

KISALTMALAR

mL	: mililitre
μ l	: mikrolitre
μ g	: mikrogram
g	: gram
ng	: nanogram
μ M	: mikromolar
nM	: nanomolar
rpm	: Rotations Per Minute
AGSC	: Ambystoma Genetic Stock Center
dH ₂ O	: Distile su
OTU	: Operasyonel Taksonomik Birimler
T3	: Triyodotironin
T4	: Tiroksin
TSH	: Troid Uyarıcı Hormon
TH	: Troid Hormonu
GNB	: Gram Negatif Basiller
PPMO	: Potansiyel Olarak Patojen Mikroorganizmalar
TRUC	: Things Resisting Uncompleted Classifications
AMPK	: AMP-aktive protein kinazın
AMP	: Adenozin Monofosfat
ACC	: Asetil-KoA-Karboksilaz
CPT-1	: Karnitin Palmitoil Transferaz-1
HDAC	: Histon Deasetilaz
SBP	: Spontan Bakteriyel Peritoniti

TEM	: Transmisyon Elektron Mikroskobu
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
NGS	: Yeni Nesil Sıralama
PPi	: İnorganik Pirofosfat
ITS	: İntergenik Transkripsiyonlu Aralayıcılar
LSU	: Büyük Öbek RNA Altbirimi
MEDİTAM	: İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Merkezi
PD Whole Tree	: Filogenetik Çeşitlilik
PCoA	: Temel Bileşen Analizi
NMDS	: Metrik Olmayan Çok Boyutlu Ölçekleme
KOs	: KEGG Ortologları
PCA	: Temel Bileşenler Analizi
UPGMA	: Aritmetik Ortalama İle Ağırlanmamış Çift Grup Yöntemi

1. ÖZET

METAMORFİK VE NEOTENİK AKSOLOTLLARIN METAGENOMİKS ANALİZİNİN YAPILMASI VE KARŞILAŞTIRILMASI

Memelilerin, doku ve organlarındaki kısıtlı rejenerasyon yeteneğine karşılık Amfibiler (Aksolotl ve Newt) kaybettikleri doku ve organlarını rejenere edebilmektedirler. Mikrobiyotanın, konak canlıının metabolizma ve enerjisinin düzenlenmesine olan katkısının keşfedilmesinin ardından, hangi mekanizmayı nasıl etkilediği merak konusu olmuştur. Yapılan araştırmalarla mikrobiyotanın, coğrafik köken, yaş, beslenme şekli ve dış etkenlerle türden türe hatta aynı tür içindeki bireyden bireye farklılık gösterdiği gösterilmiştir (1). Mikroorganizmaların konak canlılara olan birçok fizyolojik etkileri düşünüldüğünde, doğada kendi kendine metamorfoz geçiremeyen Aksolotlun indüklenme ile metamorfoz geçirdikten sonra canlıdaki mikroorganizmaların varlığı ve etkileri bizim için merak konusu olmuştur. Beslenme ve ortam koşulları sabit tutulursa, sadece metamorfozla mikrobiyom değişir hipoteziyle, metamorfoz öncesi ve sonrasında var olan mikrobiyota farklılığını incelemek adına tiroksin hormonu ile metamorfoza indüklediğimiz metamorfik Aksolotlların ve aynı sayıda Neotenik Aksolotlların bağırsak, mide, dışkı ve deri örneklerinde bulunan mikroorganizmalar ve yoğunlukları incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda; neotenik Aksolotl derisinde en çok görülen filumlar; *Firmicutes* ve *Bacteroidetes*, neotenik midesinde *Proteobacteria* ve *Firmicutes*, neotenik bağırsağında *Firmicutes* ve *Verrucomicrobia*, neotenik fekal maddesinde *Bacteroides* ve *Firmicutes*'tir. Metamorfik Aksolotl derisinde en çok görülen filumlar; *Proteobacteria* ve *Actinobacteria*, metamorfik midesinde *Proteobacteria* ve *Cyanobacteria*, metamorfik bağırsağında *Firmicutes* ve *Bacteroidetes*, metamorfik fekal maddesinde *Bacteroidetes* ve *Firmicutes*'tir.

Anahtar Kelimeler: Aksolotl, mikrobiyota, metamorfoz, rejenerasyon.

2.ABSTRACT

COMPARISON AND METAGENOMICS ANALYSIS OF NEOTENIC AND METAMORPHIC AXOLOTL

After discovery of the contribution of microbiota to the regulation of host organism's metabolism and energy, it has become a matter of curiosity about which mechanisms it affects. It has been shown that microbiota varies according to geographical origin, age, feeding, external factors, species and even between individuals within the same species (1). Amphibians (Axolotl and Newt) can regenerate their lost tissues and organs, as opposed to the mammals which have limited regeneration ability of tissues and organs. It is considered that microbiota have physiological effects to host organism and axolotl could not undergo metamorphosis itself than the existence and effects of living organisms after metamorphosis has become a matter of concern. In this study, we aimed to investigate the variation of microbiota in axolotls before and after metamorphosis without changing the nutritional and ambient conditions. In order to monitor this microbiota difference, the variety of microorganisms and their densities in the intestine, stomach, stool and skin of the neotenic and metamorphic axolotl's were investigated. In this thesis, analysis of microbial structures' dynamics and where and how they act on host mechanisms have been performed. As a result of the study; it has been found that the most common phylums on the neotenic Axolotl's skin are *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, in neotenic stomach *Proteobacteria* and *Firmicutes*, in the neotenic intestine *Firmicutes* and *Verrucomicrobia*, in the neotenic fecal material *Bacteroidetes* and *Firmicutes*. The most common phylums on the metamorphic Axolotl's skin are *Proteobacteria* and *Actinobacteria*, in the metamorphic stomach *Proteobacteria* and *Cyanobacteria*, in the metamorphic intestine *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, in the metamorphic fecal material *Bacteroidetes* and *Firmicutes*.

Key Words: Axolotl, microbiota, metamorphose, regeneration.

3.GİRİŞ VE AMAÇ

Aksolotl, rejenerasyon kapasitesi yüksek canlılar arasında memelilere en yakın türdür. Bütün hasarlardan mükemmel rejenerasyon kabiliyeti sayesinde başarıyla çıkması onu merak uyandıran bir model organizma haline getirmiştir. Doğada hep larval evrede yaşaması ve metamorfoz geçirememesi fakat troid hormonu ile metamorfoza indüklenebilmesi; metamorfoz öncesi ve sonrasında rejenerasyon kapasitesinin değişmesi bu canlının dikkat çeken özelliklerindedir. Mikrobiyotanın konağına olan yararlı etkilerinin bilinmesiyle, metamorfoz sonrası yaşamsal adaptasyona olan katkısının da var olup olmadığı ve eğer varsa ne boyutta olduğu araştırma konusu haline gelmiştir.

16S rRNA geni metamorfik ve neotenik bağırsak, deri, dışkı ve mide örneklerinden izole edilen DNA örnekleri içerisinde çoğaltarak sınıflandırma yapılmış ve hangi bakteri filumu ne derecede değişmiş analiz edilmiştir.

Amacımız, canlının beslenme, yaşadığı ortam gibi çevresel koşullarını değiştirmeksizin, metamorfoz öncesinde ve sonrasında, aynı organlarda değişen mikroorganizma çeşitliliğini göstermektir.

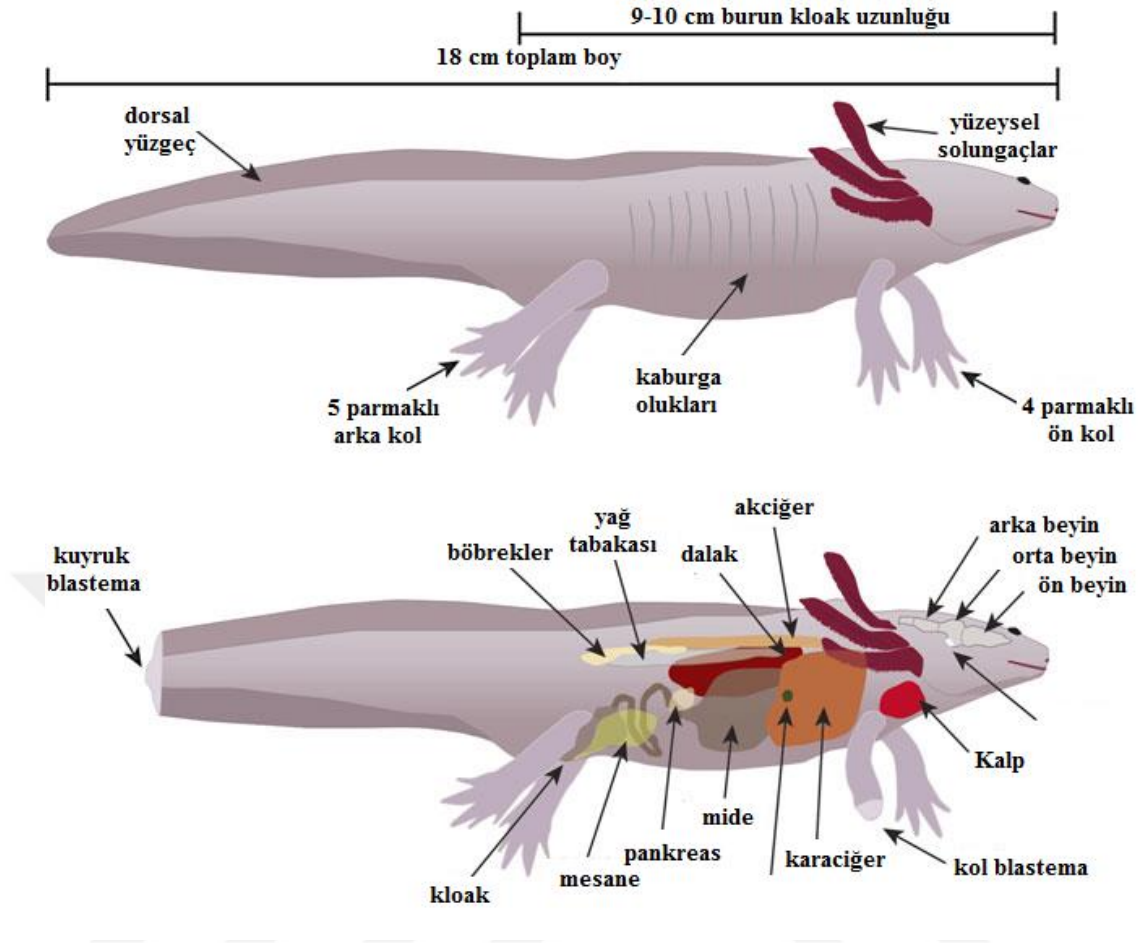
4.GENEL BİLGİLER

4.1.Aksolotl

4.1.1.Aksolotl'un sınıflandırılması ve biyolojisi

Aksolotl (*Ambystoma mexicanum*), kuyruklu amfibi üyesidir ve Kuzey Yarımküre'nin ılıman bölgelerindeki semender ailelerini oluşturmaktadır. Ambystomatidae'ye ait, genelde mol salamander denilen *Ambystoma* cinsidir ve Meksika'dan Alaska'ya kadar tüm Kuzey Amerika boyunca bulunan yaklaşık 30 türden oluşmaktadır (2). Meksika'nın orta kesimindeki dağlarda yaşayan 17 Meksika Ambystomatid semender türü bulunmaktadır. Bu türlerin beşi öncelikle veya zorunlu olarak neoteniktir; yani, metamorfoz geçirmezler ve yetişkin larval formda üreyebilmektedirler. Aksolotl, Meksika Vadisi'ndeki Xochimilco Gölü'nde endemiktir (3). Aztekler, deniz seviyesinden 2.200 metre yüksekliğindeki bu göl civarında yüzyıllar boyu yaşamıştır. Aztek tanrısı Xolotl'a göre hayvan adlandırıldığı için bu canlıya Aksolotl ismi verilmiştir (4). Günümüzde, yaşam alanının kaybı, istilacı türlerin ortaya çıkması ve su kalitesindeki düşüş nedeniyle Aksolotl'ların nesli tükenmektedir. Ne yazık ki, bugünkü Aksolotl'ların çoğunluğu dünyanın dört bir yanındaki akvaryumlarda ve laboratuvarlarda bulunmaktadır.

Aksolotl'lar rejenerasyon kabiliyetlerinin yanı sıra, büyük yumurta, dış gelişim, güvenilir üreme, embriyonik ve yetişkin doku greftlerinin kabulü ve yumurtadan çıkan larvaların büyüklüğü gibi deneysel avantajları nedeniyle, her organ sistemi için gelişimsel biyoloji araştırmalarında kullanılmaktadırlar (5). Aksolotl'ların avantajlarından birisi de uzun vadede bir laboratuvar ortamında kolayca yetiştirilebilmesidir.



Şekil.4.1.1.1. Aksolotl'un genel görünümü ve organlarının organizasyonu (Farkas JE., 2015)

4.1.2. Aksolotl'un rejenerasyon kapasitesi

Hem Newtler'i hem de Aksolotllar'ı diğer hayvan modellerinden farklı kılan önemli özellikleri, memelilerin çarpıcı yenilenme kabiliyetleri sergileyen omurgalı akrabaları olmalarıdır. Aksolotllar, onları öldürmeyen neredeyse tüm yaralanmalardan rejenerasyon kabiliyetleri ile kurtulabilmektedir. Rejenerasyonu kalp, kuyruk, çene, omurga, solungaç, beyinde ve tüm ekstremitelerde gerçekleştirebilmektedirler (6). Ayrıca bu iyileşme yara izsiz ve fonksiyon kaybı olmadan gerçekleşmektedir. Ve muhtemelen rejenerasyon, çok kere tekrarlanabilmektedir. Rejenerasyon larvalarda daha hızlı olmasına ve metamorfoza

indüklenen Aksolotllar'da daha başarısız olmasına rağmen, hayatın her aşamasında gerçekleşebilir (6).

Aksolotllar'ın yanı sıra diğer amfibiler ve hatta memeliler de sınırlı da olsa rejenerasyon yetenekleri sebebiyle bilimsel araştırmalarda model organizma olarak çalışılmaktadırlar. Afrika kurbağası *Xenopus laevis*'in iribaşları kuyruklarını ve omurgalarını rejenerate edebiliyorken, bazı maymun türleri (*Pleurodeles waltl*, *Notophthalmus viridescens* ve *Cynops pyrrhogaster*) ekstremitelelerini ve ikincil organlarını yenileyebilmektedir (7). Kuyuksuz kurbağagillerden olan *X. laevis*, sadece yaklaşık 260 milyon yıl önce kuyuklu amfibilerle ortak ataya sahiptir (7). Ayrıca *X. Laevis* geç larval dönemlerde rejeneratif kabiliyetlelerini kaybetmektedir. Amfibilerin diğer iki üyesi olan Newt ve Aksolotl görünüşte benzer anatomiye sahip ürodelalar olmalarına rağmen, en az 145 milyon yıl önce ortak bir atadan ayrılmışlardır (7). Son çalışmalar göstermiştir ki, Newt ve Aksolotl birbirlelerinden farklı rejenerasyon (8) ve iyileşme mekanizmalarına sahiptir (9).

4.2. Metamorfoz

4.2.1. Amfibilerde metamorfoz

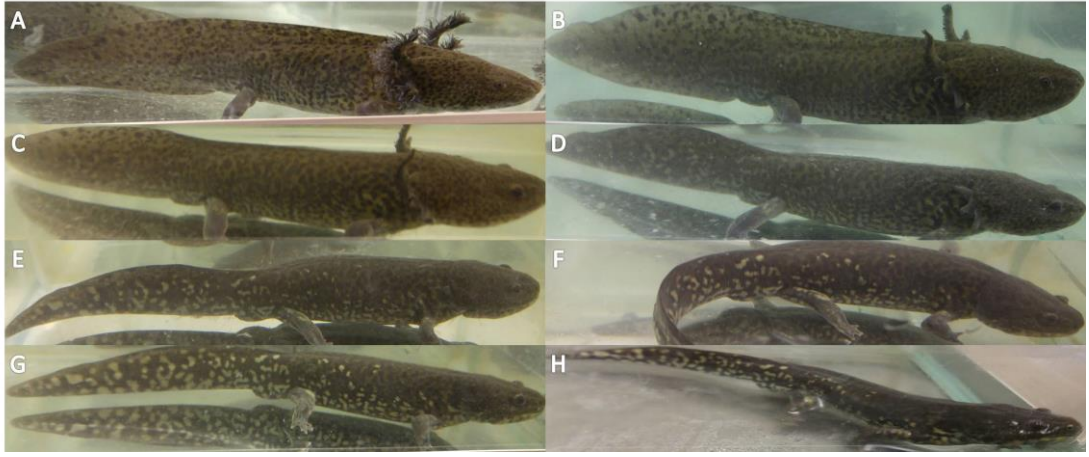
Amfibiler gelişirken birçok fizyolojik ve morfolojik değişikliğe uğramaktadırlar (32). İribaşlar tam gelişmiş dış ekstremitelere sahip değildirler, solungaç solunumu yaparlar ve tamamen suda yaşamaktadırlar. Metamorfoz ile, kurbağa ekstremitelere gelişimini tamamlar, akciğer solunumu yeteneği kazanır ve karasal yaşama adapte olurlar. Amfibiyelelerin beslenme şekilleri de metamorfoz ile büyük oranda değişir. İribaşken beslenme şekli neredeyse tamamen bitki olmasına karşın, erişkin bir kurbağayken böcekçildir (33). Böylece, erişkin kurbağa, iribaşa karşın, protein ve kitin bakımından daha yüksek ve selüloz bakımından daha düşük bir beslenme şekline sahiptir. Sindirim sistemi, bu canlı evreleleri arasında asidik olmayan midelerden asidik midelere, daha kısa ince bağırsaklara ve daha büyük arka bağırsaklara kadar hızlı ve köklü değişiklikler geçirmektedir (34). Bağırsağın

bağışıklık sistemi iribaşlarda metamorfoza uğramış kurbağalara kıyasla az gelişmiştir (35).

Metamorfozdan sonra, amfibilerin düz, primer bağırsak epitelinde hızlı dejenerasyona ve sekonder bağırsak epitelinin proliferasyonuna maruz kalmaktadırlar (34). Bu ikincil epitelyum katlanmış villuslar içerir ve birçok sindirim ve doğuştan gelen immünite genlerinin daha yüksek ekspresyonunu sergilemektedir (34). Epitelyal bağışıklık fonksiyonu da amfibilerde metamorfoz yoluyla değişir. Larva bağırsağı IgM veya IgX üreten B hücrelerinden yoksundur (35). Ayrıca iribaşlar, bağırsak müsinleri konusunda uzmanlaşmış bir cins olan *Akkermansia*'dan yoksundur (36). Bağırsak mikrobiyotası açlık sırasında pitonlarda (37) ve kış uykusu sırasında bir sincap türünde (*Ictidomys tridecemlineatus*) defalarca remodelize edilmiştir (38). Birkaç böcek türünün bağırsakları, antimikrobiyal bileşiklerden oluşan bir kokteyl üretiminden ötürü metamorfoz yoluyla sterilizasyona ve rekolonizasyona uğramaktadır (39). Aynı şekilde amfibiler, metamorfoz boyunca antimikrobiyal aktiviteye sahip yüksek seviyelerde lizozim üretmektedirler. Gelecekteki çalışmalar, metamorfoz boyunca çeşitli zaman noktalarında mikrobik çeşitlilik ve yoğunluk ölçümlerini gerçekleştirebilir durumda olacaktır.

4.2.2.Aksolotl'da metamorfoz

Ürodelaların büyük çoğunluğunun aksine, Aksolotllar tiroid hormonu ile indüklenmedikçe metamorfoz geçirmeyen, yetişkinlerinde juvenil özelliklerin hayat boyu korunduğu neotenik canlılardır (10). Erkekler cinsel olgunluğa 10, dişiler ise 12-18 ayda ulaşmaktadırlar. Cinsel dimorfizm, erkeklerin daha ince ve uzun olmalarıyla ve kloakal çıkıntıya sahip olmalarıyla mevcuttur. Dişiler yumurta taşıdıklarından dolayı daha yuvarlaktırlar. Vahşi ortamda yaşayan Aksolotllar'ın ömrünün yaklaşık 10-15 yıl olduğu düşünülmektedir. Aksolotllar, omurgaya paralel uzanan gelişmemiş akciğerlere sahiptirler. Üç çift harici solungaç ile oksijen alışverişinde bulunurlar ve kutanöz gaz değişimi yoluyla derileriyle de soluyabilirler (11).



Resim.4.2.2.1. Metamorfoza indüklenen Aksolotl'un belirli günlerde görünümü. (A: 0.Gün, B: 9.Gün, C: 18.Gün, D: 27.Gün, E: 36.Gün, F: 45.Gün, G: 51.Gün ve H: 57.Gün)

4.2.3.Tiroid hormonu ile metamorfoz

Amfibilerde metamorfoz, larva formundan erişkin forma geçerken görülen fizyolojik, davranışsal, morfolojik, biyokimyasal ve epigenetik değişiklikler bütünüdür (12). Bu değişikliklere, dolaşımdaki tiroid hormonları (T3:Triyodotironin ve T4:Tiroksin) ve onların, hedef hücrelerdeki tiroid hormon reseptörleri arasındaki etkileşimler neden olmaktadır (13). Neotenik canlılar larva özelliklerini koruyarak cinsel olarak olgunlaşmaktadırlar. Fakat *Ambystoma mexicanum* (Aksolotl) ve *Ambystoma tigrinum* (kaplan semender) gibi bazı ürodelalar tiroid hormona (TH) maruz kaldıktan sonra metamorfoz geçirme yeteneğine sahiptirler (14-16). Aksolotllarda metamorfozu indüklemek için peritoneal hormon enjeksiyonu veya yetiştirme suyuna hormon ilavesi şeklinde iki yöntem kullanılmaktadır (15, 17). Genelde metamorfoza indüklemek için T4 kullanılmaktadır çünkü tiroid tarafından salınan hormon ve deodinaz aktivitesi yoluyla T3'e dönüştürülen primer iyotun diğer dokulara dağıtıldığı düşünülmektedir (13). Toksisite eşiği 80 nM olduğu için ve morfolojik ve transkripsiyonel olayların sırasını değiştirmeden oranı en üst düzeye çıkardığı için 50 nM T4 kullanılmaktadır (13).

Tiroid hormonu ile indüklenen metamorfoz sırasında, Aksolotllar'da kilo kaybı ve büyüme hızlarında azalma meydana gelmektedir. Kuyruk yüzgeçlerinin, dorsal sırt yüzgeçlerinin ve solungaçlarının (giller) tamamen kaybolması şeklinde bir takım morfolojik değişikliğe uğramaktadırlar (18).

T3 hem larval epitel hücre ölümünü hem de erişkin epitel gelişimini uyarır. Bu bulgular, T3 ile indüklenen apoptozun metamorfoz sırasında erişkin kök hücrelerin yoğun proliferasyonundan daha erken meydana geldiğini ve proliferatif hücreler ile apoptotik hücrelerin, metamorfozun doruğundaki bağırsak epitelinde belirgin hücre popülasyonları olduğunu ortaya koymaktadır (19).

Yetişkin organa özgü kök hücreler, organ homeostazı, onarımı ve yenilenmesi için kritik önem taşımaktadır ve bu tür kök hücrelerin yanlış regülasyonu genellikle kanser gibi hastalıklara neden olmaktadır. Amfibilerde metamorfoz sırasında bağırsağın yeniden modellenmesi, memeli bağırsağının doğumdaki olgunlaşmasını andırmaktadır ve bu nedenle omurgalılarda gelişimini tamamlamış organa özgü kök hücrelerin gelişimini incelemek için güzel bir model olmuştur (19, 20). *Xenopus*'daki *in vivo* gen fonksiyonu çalışmaları bu eşsiz model sisteminin değerini daha da artırmaktadır (21). Metamorfoz sırasında oluşan yetişkin bağırsak kök hücrelerinin, metamorfozun zirvesinde çoğalan hücre kümeleri olduğu deneysel olarak gösterilmiştir. Yetişkin kök hücrelerin larval epitelden türetildiğine dair daha önceki bulgular göz önüne alınırsa, T3'e yanıt olarak epitel hücreleri yetişkin intestinal epitelyumun oluşumuna neden olan proliferasyon ile iki yol izlenmektedir; apoptoz veya diferansiyasyon (19).

Amfibi metamorfozunda tek bir hormonun bu kadar çok gelişimsel programı nasıl kontrol ettiği birçok açıdan merak konusu olmuştur. Aynı hücre tipi konumuna bağlı olarak başka yerde başka bir göreve sahip olabilmektedir (22). TH ile birlikte kuyruk kası yok olmaya başlamaktadır, aynı hormon ekstremite kaslarının büyümesine ve diferansiyasyona uğramasına sebep olmaktadır. Her organ TH'na farklı cevap vermektedir. Metamorfoz, omurgalı organogenezini incelemek için mükemmel bir modeldir. Örneğin; iribaş bağırsağı basit mide ve kalın bağırsak ile birlikte basit bir tüptür. Metamorfozun doruk noktasında 5 gün içinde uzunluğu %75 kısaltmakta ve yeni salgı bezleri ile yeni bir mide oluşturmaktadır (23). Tipik bir

omurgalı ince bağırsağı gibi villusları gelişmektedir. Plonefros metamorfozun sonunda gerileyen ve ortadan kaybolan bir tadopole yapısıdır (24). Mevcut iribaş organlarından ise deri, bağışıklık sistemi, solunum organları, karaciğer, beyin, burun, hipofiz, omurilik, göz, hematopoetik sistem ve iskeletin büyük bir kısmı yeniden yapılanmaktadır. Ayrıca TH, kurbağa metamorfozundan sonra, iribaşta işlevsiz olan veya mevcut olmayan organların ve hücre tiplerinin oluşumunu kontrol etmektedir (22).

TH'nin etkisini diğer bir yoldan izlemek için troid bezinde TH salgısını inhibe eden metimazol kullanılmış, iribaşlar aylarca izlenmiştir. Sonuç olarak da iribaşın iskeletini yeniden şekillendiremediği gözlenmiştir (22). Metamorfozda en çok kullanılan anuranlardan iki model canlı *X. Laevis* ve *Rana catesbeiana*'dır (22).

Metamorfozda yeniden şekillenen tüm dokuların içinde, gen ifadesinde en büyük değişiklikler deride görülmektedir (25). İribaş derisi, memeli fetüs derisine çok benzemektedir (26). Üç hücre tabakasından oluşur ve bunların hepsi alttaki kaslardan ince bir kollajen katman ile ayrılmaktadır. Dış apikal katman, memelideki periderme benzemektedir. Subepitelyal fibroblastlar kollajen tabakasını kaplamaktadır. Dermis yoktur (22). TH, deri hücrelerini öldürür ve bazal hücreler, omurgalıya özgü olan germinatif epitel oluştururlar (27). Sadece iribaş epidermisinin apikal hücrelerinde eksprese edilen genler, metamorfozda TH ile aşağı regüle edilir (28). Keratinleri kodlayan genler de metamorfozda değişir. Kurbağa derisi, alt katmanda bir dermise ve iki çeşit deri bezine sahiptir. *X. laevis* cDNA kütüphaneleri ve mikroarray analizleri, bu deri bezlerinde ifade edilen birçok geni ortaya çıkarmaktadır (29).

Metamorfozun en üst noktasında oluşan en büyük değişikliklerden biri bağırsağın yeniden biçimlendirilmesidir. İribaş bağırsağı basit ve uzun tüp bir olup, proksimal ucunda tiflosol denilen içe doğru bir kıvrıma sahiptir. Seyrek mezenşim, bir iç radyal ve bir dış longitudinal kas tabakası ile çevrili bir endotel hücre tabakası ile kaplanmıştır. Metamorfozun klimaksının (doruk noktası) 5. gününde bağırsak tüm uzunluğunun %75'i oranında kısalır ve tipik bir omurgalı karnı ve ince bağırsağı oluşturur. Kısalma birkaç gün içinde hızla gerçekleşmektedir ve epiteli kalın geçici çok hücreli bir astar haline getirmektedir (23, 30). Epitel, iribaş büyümesi boyunca

devamlı olarak çoğalmaktadır. Metamorfozda ise DNA sentezi seviyesi, en içteki epitelyal hücrelerin apoptozise girmesine rağmen yeniden şekillenme esnasında büyük ölçüde artmaktadır. Metamorfozun sonunda kriptler ve villuslar oluştuğunda bile DNA replikasyonu epitel boyunca devam etmektedir (31). Hücre - hücre etkileşimi bağırsak yeniden modellenmesinde etkindir. İribaşta genler TH kontrolündedir (32). Aynı genlerin birçoğu kuyruk ve bağırsakta TH tarafından indüklenir.

4.3.Mikrobiyota

4.3.1.Omurgalı canlılarda mikroorganizmalar

Bağırsak mikrobiyotası bir konakçı organizma içinde yer alan bir "mikrobik organ" olarak düşünülmektedir. Bağırsağın besin maddelerinin sindirimi ve emilimi rolüne ilaveten, insan gastrointestinal sistemi çeşitli mikroorganizma toplulukları içermektedir. Şu ana kadar insan bağırsak mikrobiyolojisi tam olarak açıklanamasa da, insan bağırsağının yaklaşık 10^{13} - 10^{14} bakteri hücresine ev sahipliği yaptığı bilinmektedir. Bir bütün olarak, insanlarda yaşayan mikroorganizmaların insan hücrelerinden 10 kat daha fazla olduğu tahmin edilmektedir. Mikrobiyom, genel olarak insan genomunun 100 katından fazlasını temsil etmektedir (67). Bağırsak mikrobiyotasının konakçı enerji metabolizmasının kontrolünde bir araç olduğu söylenmektedir (65).

İnsan vücudunun, kendi hücrelerinin sayısından en az 10 kat daha fazla bakteri ile yaşadığı bir süredir bilinmektedir ve bu bakterilerin çoğunluğunun insan gastrointestinal sisteminde yaşadığı bulunmuştur (33). Mikrobiyoloji tarihi boyunca insan çalışmalarının çoğu, insanlara veya insanlarda bulunan hastalık yaratan organizmalara odaklanmıştır. İnsanların içinde yaşayan yararlı ve zararlı mikroorganizmaların arasındaki ilişkinin aydınlatılması insanlığın yararına olacaktır (34).

Mikrobiyom, kelimenin tam anlamıyla vücut alanımızı paylaşan komünal, simbiyotik ve patojen mikroorganizmaların ekolojik topluluğunu ifade etmektedir

(35). Bir toplumdaki mikroorganizmaların sayısı ve filogenetik ilişkileri, 16S rRNA genlerinin analiz edilmesine bağlıdır. Yakın zamanda, 16S rRNA gen sıralama tekniğini kullanarak farklı biyolojik durumdaki insan mikrobiyomunu tanımlayan çalışmalar yayınlanmıştır (36).

Bağırsak, memeli ve prokaryotik bileşenlerinden oluşan kompleks bir ekosistemdir ve bunların tamamına “mikrobiyota” denmektedir (37). Bu iki unsur çeşitli mekanizmalar yoluyla sürekli etkileşim içindedir. Bağırsak mikrobiyotası, konağın metabolizma ve beslenme homeostazı, enerji harcamaları ve bağışıklık gibi çoklu fizyolojik süreçlerine katkıda bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan birçok çalışma, mikrobiyomun konakçının metabolik durumu kadar, bağışıklık gelişimi ve fonksiyonlarında da önemli bir rol oynadığını ileri sürmektedir. Bu fonksiyon, bağırsak lümeni ve mukozal yüzeyleri arasında küçük moleküllerin değişimi yoluyla ve sistemik dolaşım ile elde edilmektedir (38).

Genomlarımız yaşam boyunca büyük oranda (rastlantısal mutasyonların görülmediği durumlarda) statik olmasına rağmen, mikrobiyomlarımız doğal olarak dinamiktir (39). Vücudumuzda barındırdığımız mikrobik topluluklar, çocukluk çağında olgunlaşma, beslenmemizdeki değişiklikler, yolculuklar, hastalıklar, tıbbi tedaviler gibi birçok faktör nedeniyle hayatımız boyunca değişmektedir. Son teknolojik gelişmeler sayesinde, hayvan modellerinin ve insan popülasyonlarının mikrobiyom dinamikleri hakkında oldukça ayrıntılı çalışmalar yapılması artık mümkün olmaktadır (39).

Mikrobiyomlarımız karmaşık ve dinamik ekosistemlerden oluşmaktadır. Mikrobiyal kolonizasyon, doğumda başlamaktadır ve bebeklik dönemi boyunca vücutta giderek zenginleşmiş mikroorganizma toplulukları oluşmaktadır (40). Sağlıklı bir yetişkin mikrobiyotası; hormonal döngüler, cinsel aktivite ve diğer birçok faktör tarafından değiştirilebilmektedir (41). Dramatik değişiklikler, enfeksiyonlar veya inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi hastalıklarla ortaya çıkabilmektedir (42, 43). Antibiyotik tedavileri gibi tıbbi müdahaleler de mikrobiyotayı derinden etkileyebilmektedir (44).

Bir araştırmada 14 sağlıklı bebeğin bağırsak mikrodizisi kullanılmıştır. Araştırmacılar tarafından, bebeklerin mikrobiyomları arasındaki bireyler arası farklılığın genel olarak yaşamın ilk yılı boyunca çok yüksek olduğunu bulunmuştur. Her bir bebek için, farklı kolonizasyonlu bakteri türlerinden farklı bir kombinasyon elde edilmiştir. İlginçtir ki zamanla bebekler olgunlaştıka bireyler arası mikrobiyom değişkenliği azalmış ve mikrobiyolojileri ailelerininkilerle benzerlik kazanmaya başlamıştır (45).

Mikropsuz zebra balığına, *Firmicutes* bakımından zengin memeli mikrobik topluluğu aşılandığında, mevcut mikrobik topluluk *Proteobacteria* bakımından zengin bir topluluğa dönüşür. *Proteobacteria*, *Firmicutes* ve *Bacteroidetes*'e kıyasla oksijene daha fazla toleranslıdırlar. Ayrıca kurbağalarda bulunan fakat iribaşta bulunmayan gastrik bir mide mikrobiyotayı değiştirebilir (46).

Başka bir çalışmada, bir çocuğun doğumundan 2,5 yaşına kadar 60 adet dışkı örneğinin toplandığı mikrobik analizinde dizilemeye dayalı yöntemler kullanılmıştır. Tüm rnekler üzerinde 16S rRNA gen dizilemesi gerçekleştirilmiştir ve ayrıca örneklerin bir alt kümesi üzerinde de metagenomik dizilemesi gerçekleştirilmiştir. Bebeğin mikrobiyomunun filogenetik çeşitliliği zamanla kademeli olarak artarken, özellikle katı gıda ile beslenmeye başlanıldığı sırada bazı belli başlı taksonomik grupların bolluğunun aniden değiştiği gözlenmiştir. Metagenomik dizileme verilerinde, önce ve sonra alınan örnekler arasındaki mikrobiyal gen içeriğindeki farklılıklar gözlenmiştir. Örneğin, nceki örnekler ve sonraki örnekler arasında laktat metabolizması genlerinin zenginliği, karbonhidrat kullanımı, vitamin biyosentezi ve ksenobiyotik degradasyona katılan genlerde farklılıklar gözlenmiştir (47).

Bebek bağırsak kolonizasyonu sırasında bakteri suşları seviyesindeki değişiklikleri araştıran başka bir çalışmada, farklı yaştaki çocuklardan izole edilen 16 adet *Escherichia coli* suşunun genomları sıralanmıştır. Genel olarak, yaşamın ilk 2 haftasında ve daha sonra kolonize olan suşlar arasında zenginleştirilmiş yüzlerce gen bulunmuştur. Erken kolonize olan suşların kolisin direnci ve biyosentetik işlemler gibi işlevleri olan genlerce zengin olduğu gözlenmiştir. Daha sonra kolonize olan suşların, oksidasyon indirgemesi, arsenat ve siyanata karşı direnç gibi işlevlerle ilgili genler bakımından zengin olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak erken kolonizasyon

sırasında bağırsakta nispeten daha az metabolik bileşik bulunduğu ve daha sonra daha karmaşık ve rekabetçi bağırsak mikrobiyal ekosistemlerinin varlığı tespit edilmiştir (48).

Farklı vücut bölgelerinin erken mikrobik kolonizasyonunu araştıran bir çalışmada, farklı zamanlarda alınmak üzere 5 bebeğin deri, tükürük ve dışkı örneklerinden oluşan bir deney grubu oluşturulmuştur. Araştırmacılar, örneklerin 16S rRNA gen dizileme analizlerini kullanarak, aynı bireyden gelen tükürük ve dışkı örneklerinde bulunan mikrobiyotalarının, en azından yaşamın 15. gününe kadar önemli ölçüde farklı olmadığını keşfetmişlerdir (49).

Bir grup araştırmacı, farklı yaştaki ve farklı coğrafyadan olan 531 insan denekten alınan mikrobiyomları analiz etmiştir. Araştırmacılar, bireyler arası mikrobiyom değişkenliğinin, yetişkinlerdekilere kıyasla çocuklarda sürekli olarak daha yüksek olduğunu, mikrobiyal toplulukların çocuklar ~3 yaşına geldiğinde yetişkinlerinkine daha çok benzediğini keşfetmişlerdir. İlginç bir şekilde, yetişkinlerde zenginleştirilmiş vitamin B12, B7 ve B1 sentez yolları ve bebeklerde zenginleştirilmiş folat sentez yolları için, mikrobiyal gen içeriğinde coğrafyadan bağımsız farklar bulunmuştur (50).

Üreme yaşındaki kadınlar, özellikle vajinadaki mikrobiyomu etkilemesi beklenen menstrüasyon döngüsü boyunca önemli fizyolojik değişiklikler geçirmektedir. Bu etkileri analiz etmek adına yapılan bir çalışmada, sağlıklı üreme yaşındaki 32 kadından 16 haftalık bir süre zarfında, haftalık olarak iki kez toplanan vajinal örneklerden 16S rRNA genleri dizilenmiştir. Araştırmacılar, çoğunda bir veya iki *Lactobacillus* türünün egemen olduğu 5 çeşit vajinal bakteriyel topluluk tespit etmişlerdir. Ayrıca vajinal mikrobiyotanın değişkenliği ile menstrüasyon döngüsü süresinin artması arasında ve bakteri topluluğunun kompozisyonu ve cinsel aktivite arasında önemli ilişkiler bulunmuştur (41).

Birçok fizyolojik ve davranışsal değişiklik, normal yaşlanma sürecinde ortaya çıkmaktadır ve mikrobiyotanın da etkilenebileceği düşünülmektedir. Claesson ve ark., tarafından 65 yaş üstü 161 kişiyle bir araştırma yapılmıştır. Genel olarak, yaşlı

kişilerdeki *Firmicutes* filumuna kıyasla *Bacteroidetes* filum üyelerinin genç yetişkinlerde daha yüksek oranda bulunduğu tespit edilmiştir (51).

İnsanlar ve evcil hayvanlar sıklıkla antibiyotiklerle tedavi edilmektedir ve bu durum patojenlerde artmış antibiyotik direncine neden olmaktadır. Ancak kommensal mikrobiyal topluluklar üzerinde belirgin bir etkileri olmadığı düşünülmektedir. İnsanlardaki bu durumu araştırmak için 52 dışkı örneği toplanılmış ve 16S rRNA gen dizilimi kullanılarak analiz edilmiştir. Mikrobiyal çeşitlilik, antibiyotik tedavisi başladıktan 3-4 gün sonra tüm denekler için hızlı bir şekilde düşüş göstermiştir, ancak genellikle antibiyotik kesildikten birkaç gün sonra yeniden artmıştır. Bazı bakteri taksonları, *Ruminococcaceae* ve *Lachnospiraceae* familyaları gibi, antibiyotik tedavisiyle azalma eğilimi sergilemiştir. Genel mikrobiyal topluluk yapıları deneyin sonunda dengelenmiş gibi görünürken, ilk yapılarına göre değişmiştir (44).

Sağlıklı yetişkinler beslenmelerinde sıklıkla kilo kaybı, gelişmiş atletik performans, dini veya etik nedenlerle kasıtlı değişiklikler yapmaktadırlar. Wu ve ark., iki farklı beslenme şeklinin insan mikrobiyotası üzerine etkisini 10 denek içeren randomize bir çalışma dizaynı ile araştırmışlardır. Deneklerin, dışkı örnekleri günlük olarak toplanırken, 10 gün boyunca ya yüksek yağ/düşük lif ya da düşük yağ/yüksek lif şeklinde beslenmişlerdir. Örneklerin 16S rRNA gen dizilimi kullanılarak yapılan analizinde, kontrollü diyet başlattıktan 24 saat sonra mikrobiyal toplulukların genel yapısında hızlı değişimler gözlenmiştir (52).

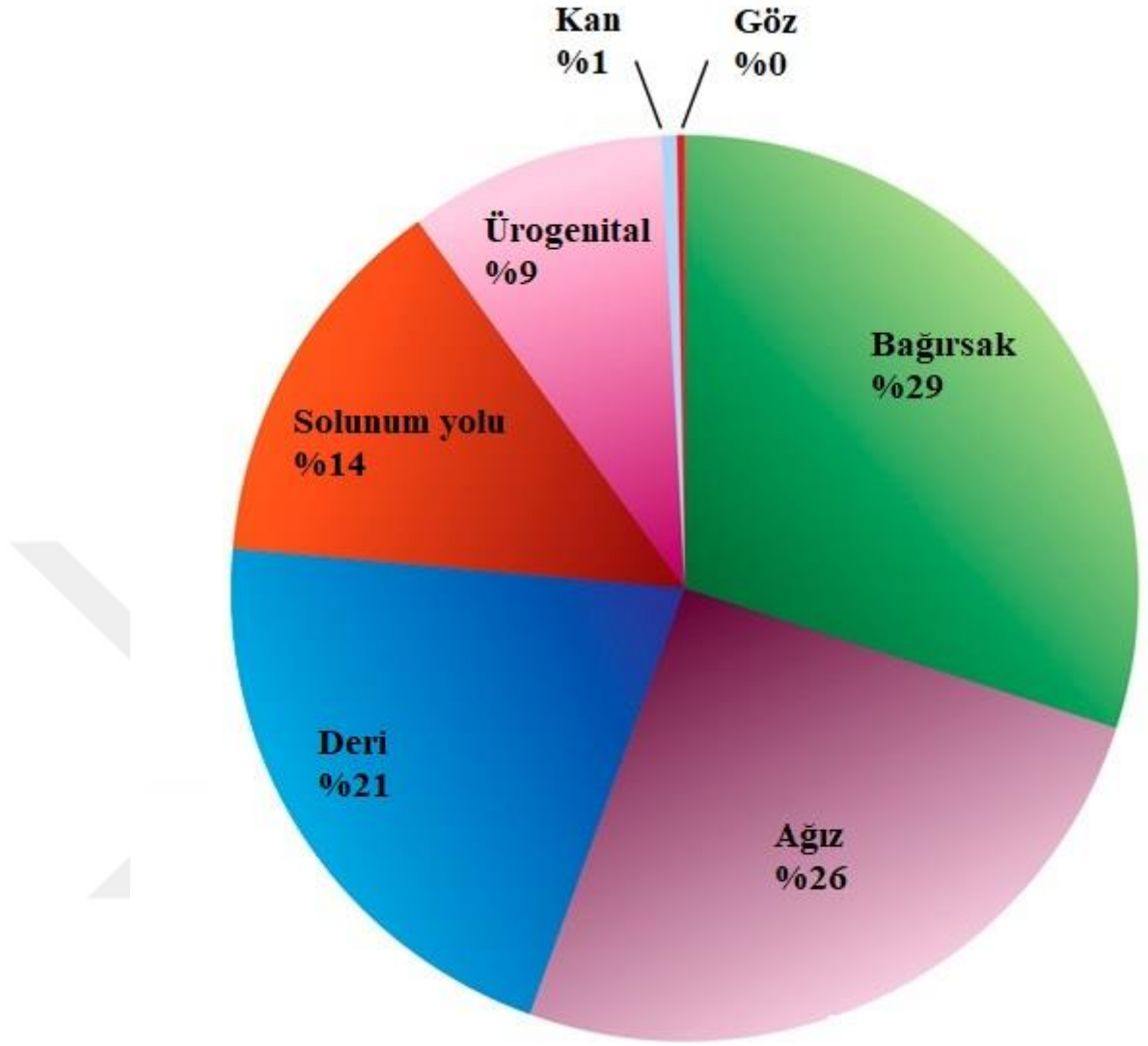
Daha kapsamlı başka bir diyet çalışmasında insanlar, ağırlıklı olarak bitki veya hayvana dayalı diyetle 5 gün süre ile beslenmişlerdir ve daha sonra diğer diyete geçmişlerdir. Toplam 15 denek için, 2 diyet şekline önce, sırasında ve sonrasında 15 dışkı numunesi toplanmıştır. 16S rRNA gen dizisi analizi, kısa zincirli yağ asidi ve safra asidi ölçümleri ve 18S gen dizisi analizi örneklerle uygulanmıştır. Genel olarak, hayvan ürünleri temelli diyetle, *Bilophila wadsworthia* ve *Alistipes putredinis* gibi safra asidine dirençli organizmaların bolluğunu içeren mikrobiyotaya sahip oldukları gözlenmiştir. Mikrobiyal genlerin ekspresyonunda; vitaminlerin biosentezi, polisiklik aromatik hidrokarbonların bozunması ve b-laktamazlar için

genlerin artan regülasyonu gibi değişikliklerin hayvan temelli diyet üzerinde gerçekleştiği gözlenmiştir (53).

4.3.2.Mikrobiyota ve konak ilişkisi

Bağırsak mikrobiyotası, insan sağlığı ve beslenmesinde önemli bir rol oynayan karmaşık bir ekosistemin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır (54). Gastrointestinal sistemin bakteriyel kolonizasyonu, konakçının mikrobiyolojik, fizyolojik, beslenme ve çevresel faktörler gibi çeşitli faktörlerinden etkilenmektedir (54). Ayrıca bağırsak mikrobiyotasında yaşlanmanın sebep olduğu değişiklikler, yaşlı bireylerin sağlığını etkileyebilmektedir (55). Psikososyal stres, hareketlilik ve beslenme gibi etkenler de bağırsak florasının değişmesini sağlayabilmektedir(56). Psikososyal stres faktörleri, bağırsak mikrobiyal kompozisyonunu etkileyebilecek anoreksinin veya bağışıklık sistemindeki değişikliklerin oluşmasına neden olabilmektedir (57).

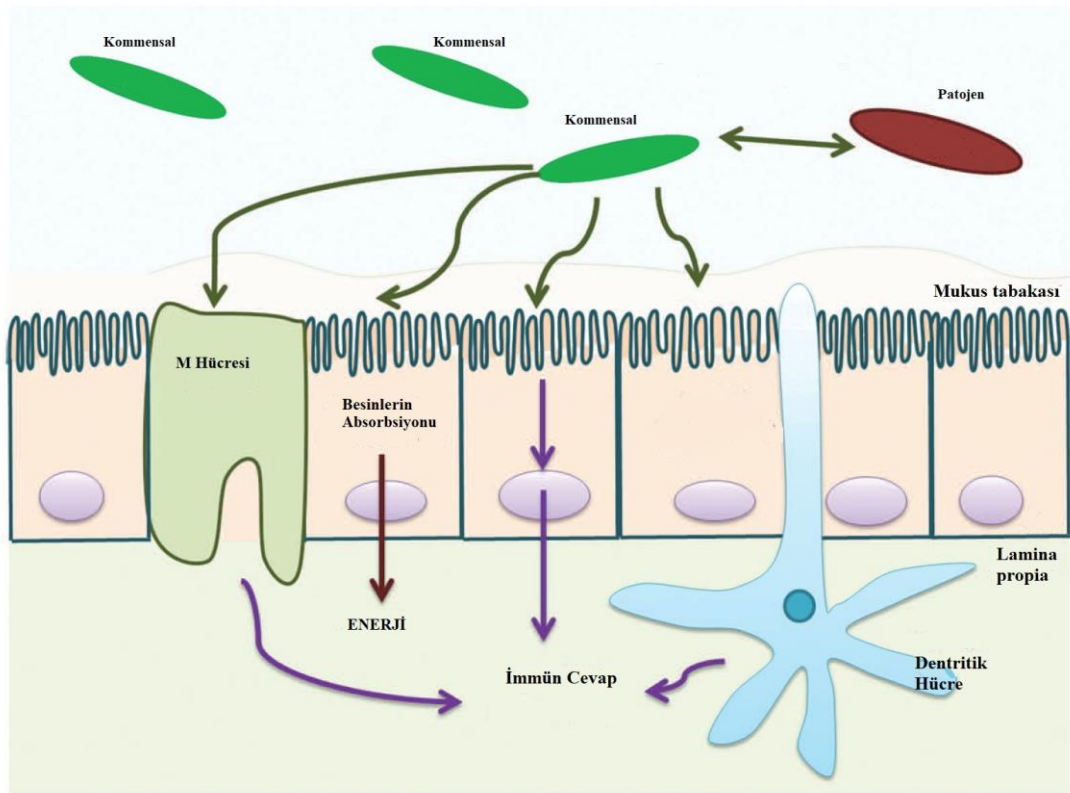
Yaşlanmanın ince bağırsakta desen değişikliğine sebep olabileceği belirtilmiştir ve buna ek olarak, yaşlı bir bireyin hareket kabiliyeti bağırsak hareketliliğini de etkileyebilmektedir. İndirgenmiş bağırsak hareketi sindirim üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir ve kabızlığa neden olmaktadır, dolayısıyla bağırsak mikrobiyotasında değişikliğe neden olabilmektedir (54).



Şekil.4.3.2.1.İnsan vücudunda mikroorganizmaların dağılımı. (Peterson, Jane., 2009.)

Çoğu bakteriyel patojen, konakçılarını solunum, ürogenital veya gastrointestinal sistemlerin mukozal yüzeyleri vasıtasıyla enfekte etmektedir (58). Mukozal yüzeyler mekanik ve immünolojik engellerle enfeksiyona karşı korunmuştur (59). Normal bağırsakta mikrobiyota ve konakçı arasında karşılıklı yarar ilişkisi vardır. Mikrobiyota konakçının anjiogenezisine, beslenmesine, bağışıklık sisteminin gelişimine ve yağ depolamasına katkıda bulunmaktadır (60-62). Bu şekilde bir etkileşim mikrobiyotanın türleşme yapısını dengede tutmaktadır ve patojenlerin kolonileşmesine engel olmaktadır. Kolonizasyon direncinin moleküler yapısı hala iyi anlaşılmamıştır (58).

Bağırsağın normal florası, 400'den fazla zorunlu anaerobik bakteri türü içermektedir (63). Aerobik floranın konsantrasyonu çok daha düşüktür ve bağırsakta bulunan tür sayısı azdır. Sağlıklı bireylerde, dışkıda aerobik gram-negatif basiller (GNB) arasında *Escherichia coli* hakimdir (64). *E. coli* dışındaki çok sayıda GNB, günlük gıdalar, özellikle salatalarla birlikte alınmaktadır (65). Bazı *E. coli* suşlarının varlığı aylarca ya da yıllarca devam edebilmekteyken, bazılarının ise görevi birkaç gün ya da hafta sürmektedir (66). Aerobik gram-pozitif koklar arasında ise enterokoklar baskındır. Enterokokların yanı sıra, stafilokoklar veya streptokoklar bazı insan dışkı örneklerinden kolonize olmaktadır. Normal floranın % 0,1'den azı aeroblardan oluşsa da, çoğu endojen enfeksiyona aerobik flora neden olmaktadır (Dubos, R. 1965).



Şekil.4.3.2.2. Kommensal mikrobiyata konakçı ile iş birliği halindedir. (Martin R., 2014)

4.3.3. Metamorfoz ve mikroorganizmalar arasındaki ilişki

Tam başkalaşım geçiren böcekler, gelişirken dramatik bir şekilde değişmektedirler. Larval evreden pupa evresine ve sonrasında yetişkine dramatik bir dönüşüme uğramaktadırlar. Pupa evresinde organların büyük bir kısmı bağırsak da dahil olmak üzere yenilenmektedir. Fakat bağırsak yenilenirken, böcek enfeksiyon riski altında olmakla birlikte yararlı mikrobiyota da zarar görebilmektedir. Bu durumda, konakçı ve simbiyonun, fırsatçı patojenleri birlikte kontrol etmeyi başarabildikleri gösterilmiştir (67).

Çoğu böcek türü, tüm anatomisini yeniden biçimlendirmeyi gerektiren metamorfoz ile ayrılmış farklı larval ve yetişkin aşamaları olan canlılardır (68). Metamorfozun evrimsel avantajı, genellikle adaptif ayrıştırma hipotezi ile açıklanır (69): larva ve yetişkinlerdeki özellikler, epigenetik olarak ve RNA ve protein düzeyinde farklıdır ve farklı yaşam şartlarına adaptasyonu kolaylaşmaktadır (70). Bununla birlikte, vücudun anatomik olarak yeniden düzenlenmesi, bağırsak bir mikrobiyotaya ev sahipliği yaptığı için sorun teşkil etmektedir. Ya organizma, ortamdaki mikrobiyotayı ortadan kaldırıp sonra yeniden tesis etmek zorundadır ya da fırsatçı mikropların dolaşıma girmesini ve enfeksiyonlara neden olmasını engellemek zorundadır (67).

Yapılan çalışmalar, *Lepidoptera* ve *Diptera*'daki metamorfoz sırasında bağırsaktaki bakterilerin varlığını ve muhafazasını açıkça ortaya koymuştur ve daha sonraki çalışmalar, *Coleoptera*, *Diptera*, *Lepidoptera* ve *Hymenoptera*'da da aynı fenomeni tanımlamıştır (71-74). Alternatif olarak konağın bağışıklık sistemi, bağırsak mikrobiyotası oluşumunda rol oynamaktadır (75).

Lepidoptera'nın bağırsak mikrobiyotası, beslenme ve habitat ile değişen ancak çoğunlukla metamorfoz ile var olan enterokokların hakim olduğu bir kaç bakteri türü ile sınırlıdır (76). *Lepidoptera*'da, bağırsak lümeninin içeriği ve peritrofik matris metamorfozun başlangıcında temizlenmektedir. Bazal orta bağırsak kök hücreleri, lizozim apikal vakuollerde biriken larval bağırsak epitelinin altında sürekli bir tabaka oluşturmak üzere çoğalmakta ve ayrılmaktadır (75). Larval epitelinde

vakuol içeriği bağırsak lümenine salınmakta ve septisemik enfeksiyonu önlediği düşünülen bir antibakteriyel aktivite meydana gelmektedir (75). Lipidopteri bağırsağında bulunan tek kaydadeğer mikrobun *E. Mundtii* olduğu bulunmuştur (67).

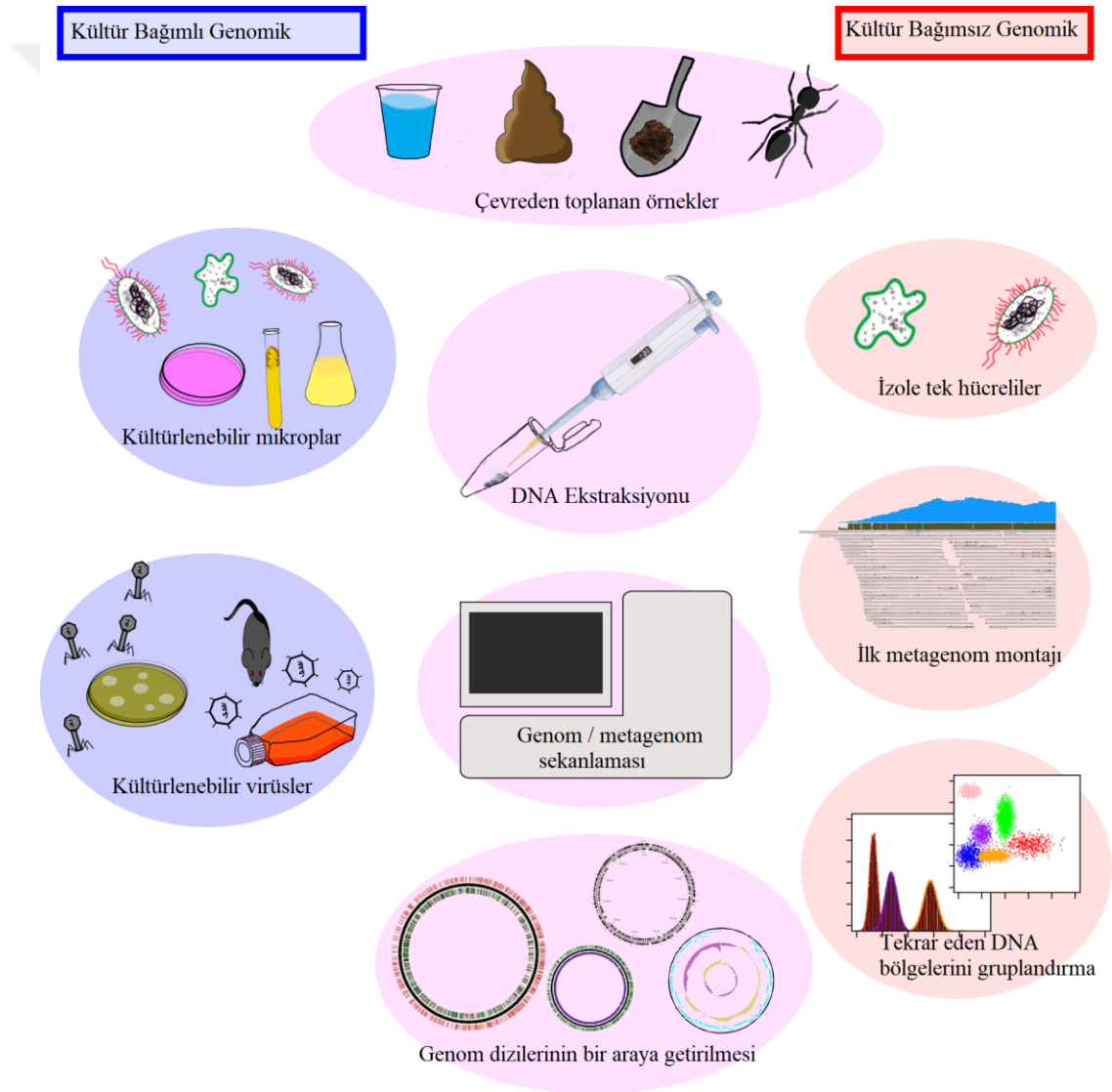
Antibiyotik tedavisi ya da mikropsuz farelerde mikrobiyal tükenme, doğuştan gelen bağırsak lenfoid hücrelerinin (ILC) epigenetiğinin yeniden yapılandırılmasına ve destekleyici bölgelerde birkaç bin histon modifikasyonuna neden olmaktadır. Ayrıca, intestinal mikrobiyotanın ILCler'deki değiştirilmiş gen ekspresyonu üzerindeki etkisi transkripsiyonel alt gruplar arasında farklılığa neden olmaktadır. Bu, ince bağırsak ILC popülasyonunda, farklı hücre gruplarının, epigenetik modifikasyonlar vasıtasıyla farklı mikrobiyal cevap verme modelleri bulunduğunu göstermektedir (77).

Yaklaşık 16 yıl önce tanıtılan 16S rRNA sekans analizi, mikroorganizmalar arasındaki bakteriyel taksonomi ve filogenik ilişkileri incelemek için son yıllardaki temel araçtır. 2000'li yıllarda, 16S rRNA geninin amplifikasyonuna dayanan yüksek verimli sıralama teknikleri, karmaşık mikrobiyotalardaki bakteri çeşitliliğinin anlaşılmasını sağlamıştır ve moleküler aletlerle tespit edilen bakterilerin % 80'inin aslında kültürlenmediğini göstermiştir (78). Fakat 16S rRNA gen sıralamasının sınırlılıkları vardır. 16S rRNA geni, spesifik cinsler için duyarlı değildir ve yüksek türler arası benzerlikleri ayırt edememektedir (79). Ayrıca gen dizisinin heterojenliğiyle birden fazla kopyaya sahip olan türlerde karşılaşılabilmektedir (80). 16 dışı örneğinde yapılan bir çalışmada, 16S rRNA geni üzerinde V6 bölgesi üzerinde yapılan piro sekanslamanın, transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile tespit edilen bazı gram negatif bakterileri ihmal ettiğini göstermiştir (81).

İnsanlardaki prokaryotik çeşitlilik ile ilgili yapılan bir çalışmada, 120'den fazla prokaryotik filum tespit edilmiş ve sadece 31 filumun kültürlenebilen türler içerdiği belirtilmiştir. Ayrıca, insan bağırsağında kültürlenebilen 12 bakteri filumu kaydedilmiştir. Bunlar: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Chlamydiae*, *Deinococcus-Thermus*, *Fusobacteria*, *Tenericutes*, *Lentisphaerae*, *Spirochaetes*, *Synergistetes* ve *Verrucomicrobia*'dır (82). İnsan bağırsağından izole edilen türlerin çoğunluğunu *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* ve *Bacteroidetes* filumları ve *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Corynebacteriaceae* ve

Bacteroidaceae familyasının birkaç üyesi oluşturmaktadır (82). Ayrıca *Lachnospiraceae* familyasının birkaç üyesi (*Eubacterium spp.*, *Anaerostipes spp.*, *Roseburia spp.*, *Coprococcus spp*) bütirat üreten bakterilerdir ve kültür ortamında yetiştirilmesi güçtür. Butirat üreten bakterilerin, anti-inflamatuvar ve antikarsinojenik özellikleri tespit edildiği için çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (36).

4.3.4.Kültürden bağımsız mikroorganizma tanımlaması



Şekil.4.3.4.1. Mikroorganizma ve virüslerden kültür ve kültürden bağımsız genom eldesi. (Garza D.R., 2015)

Metagenomik; mikrobiyal toplulukların kültürden bağımsız genomik analizine denmektedir (83). İstatistiksel meta-analiz kavramından (istatistiksel olarak ayrı analizleri birleştiren süreç) ve genomikten (bir organizmanın genetik materyalinin kapsamlı analizi) türetilmiştir (84). Metagenomik, kültüre edilemeyen ve bazı ortamlarda bulunan mikroorganizmaların % 99'undan fazlasını temsil etmektedir(85). Bu yaklaşım mikrobiyal genomik ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) amplifikasyonuna ve dizi benzerliğini paylaşan genlerin (Örn; 16S rRNA, nif, recA) doğrudan çevre örneklerinden klonlanmasına dayanmaktadır (86). PZR amplifikasyonunda, amplifikasyon için önce primer dizayn etmek gerekmektedir ve bunun için de gen sırası hakkında bilgi sahibi olmak gerekmektedir. Genomik için ise, bir DNA klonlamasının direkt ekstraksiyonuyla teorik olarak herhangi bir dizinin veya fonksiyonun genlerine erişilebilmektedir. Doğrudan genomik klonlama, operanlar veya antibiyotikler gibi karmaşık moleküllerin sentezini yönlendiren yolları kodlayan genleri yakalama fırsatı sunmaktadır. Bir genin dizi bilgisi, potansiyel olarak o genin genomik ortamı veya türetildiği organizmanın filogenetik üyeliği hakkında bilgi vermektedir. Ayrıca, metagenomik analizin uzun vadeli bir hedefi, metagenomik kütüphanelerde çakışan parçaları tanımlayarak ve her kromozomu birleştirmek için klonlayarak, kültürlenmemiş organizmaların genomlarını oluşturmaktır (83).

Metagenomik kütüphanelerinden biyolojik bilgi çıkarmak için fonksiyon odaklı analiz ve sekansa dayalı analiz olmak üzere iki yaklaşım türü ortaya çıkmıştır. Fonksiyona dayalı analiz, arzu edilen bir özelliği ifade eden klonların belirlenmesi, ardından aktif klonların sekans ve biyokimyasal analizlerle karakterizasyonu ile başlatılmaktadır. Bu yaklaşım, faydalı faaliyetleri olan doğal ürünler veya proteinler üzerine odaklanarak tıp, tarım veya endüstride potansiyel uygulamaları olan klonları hızla tanımlamaktadır. Yaklaşımın kısıtlamaları, konakçı hücredeki ilgi fonksiyonunun ifadesini ve fonksiyon için gerekli tüm genlerin kümelenmesini gerektirmektedir. Çalışılacak en uygun özellikler, antibiyotiklere karşı direnç veya olağandışı bir substrat üzerinde büyüme gibi seçilebilir bir fenotip sunanlardır (83).

Sıra kaynaklı analiz, ilgilenilen dizileri içeren klonlar için metagenomik kütüphanelerini görüntülemek için hibridizasyon problemleri veya PZR primerleri

tasarlamak için korunmuş DNA sekanslarının kullanılmasına dayanmaktadır. Önemli bulgular metagenomik klonların rastgele dizilişinden kaynaklanmaktadır. 16S rRNA geni ve *radA* Archaeal DNA tamir geni gibi filogenetik bağlantıları taşıyan klonların dizilimi, bu klonların bulunduğu organizmalar hakkında işlevsel bilgi türetilmesine yol açmıştır (87, 88).

4.3.5. Mikrobiyom araştırmalarında yeni nesil sekanslama

Mikrobiyal toplulukların DNA dizilimi, yoğun emek gerektiren bir klonlama sürecine dayanan Sanger sıralama yöntemlerinden, 454/Roche, Illumina/Solexa, ve Ion Torrent/Ion Proton platformu gibi Yeni Nesil Sıralama (NGS) yöntemlerine dönüşmüştür (89). Bu kısa okuma yaklaşımları metagenomik örneklerin taksonomik ve fonksiyonel profillemesi için özellikle uygundur çünkü bunlar içindeki dizilerin rasgele bir örneğini sağlamaktadırlar (90). Bu nedenle ve kısa okuma diziliminin hızla azalan maliyetinin bir sonucu olarak, bu profil analizi, son on yılda metagenomik alanın sürücüsü olmuştur. PacBio ve Oxford Nanopore sekanslama teknolojileri gibi maliyetlerin daha da düşürülmesi, sekans hacimleri ve okuma uzunluklarının artmasıyla, kültürlenmemiş genom dizilerinin birleştirilmesi artık giderek daha erişilebilir hale gelmektedir (91).

4.3.6. Alfa, beta, gama ölçütleri ve operasyonel taksonomik birimler

Mikroorganizmaların ekolojik dağılımının anlaşılması için iki önemli kavram önerilmiştir, bunlar; düzgünlük kavramı ve diferansiyel bolluğudur. Eşitlik ölçümü, az sayıda hakim olan türlerin ve nispeten nadir bulunan birçok tür topluluklarda eşitsiz temsilin sayısallaştırılmasına çalışmaktadır. İki topluluk karşılaştırıldığında, her ikisinde de aynı miktarda fakat farklı bollukta tür varsa, gözlemlenen ve varsayımsal dağılım arasındaki en kısa fark olan konsorsiyum (bolluk) daha çeşitli olacaktır. Bu nedenle, tür zenginliğinin çeşitliliği tanımlamak için tek parametre olmaması gerektiği düşünölmelidir (92). Toplulukları daha iyi tanımlamak ve karşılaştırmak için, metagenomikte kullanılan ölçüler vardır. Alfa (α), bir topluluğun

yerel çeşitliliği için bir ölçüdür. Bunun tersine birçok topluluğun bulunduğu toplam bölgesel çeşitliliği ölçen Gama(γ) ve son olarak da Beta (β); Alfa ve Gama'yı birbirine bağlayan farklı topluluk örneklerinin bir bölgede olduğunu göstermektedir (93). Alfa çeşitliliğin değerlendirmesinde, örnek etkinliğini değerlendirmek ve örnekleme problemlerini düzeltmek için türlerin birikimi veya Operasyonel Taksonomik Birimler (OTU) kullanılmıştır (94-96).

Önceden Sanger sıralama teknolojisi, mikrobiyal topluluk çalışmalarının erken aşamalarında büyük bir etkiye sahipti fakat sekanslama verimi ve sekans uzunluğu Sanger dizilemesinden bu yana çok değişmiştir. Şu anda, Sanger dizilimi, filogenetik markör analizi için kullanıldığında 650 bp uzunluğunda, çalışma başına en fazla 96 sekans alabilmektedir. Bununla birlikte, Yeni Nesil Sıralama Teknolojileri (Next Generation Sequencing) olarak bilinen düşük maliyetli platformlar, farklı alanlarda olumlu etkileri olan farklı verim ve sekans uzunluklarına sahip milyonlarca DNA molekülünün paralel sıralamasını yapabilmektedir (97-99).

Genomik ve metagenomik alanlarda devrim yaratan bu teknolojilerin ilki, 454 sekanslama platformu ya da "pirosekanslama" idi. Bu teknolojinin prensibi, DNA polimerizasyon reaksiyonundan salınan pirofosfatın (PPi) ışık yayan sinyal haline dönüştürülmüş bire bir nükleotid ilavesi siklusudur. Verilen bir DNA parçasını içeren milyonlarca mikrokuyucuktan gelen ışık emisyonu makine tarafından algılanır ve değeri olan ilişkili nükleotid dizilerine çevrilir (100).

Bu teknoloji, daha düşük bir maliyetle Sanger diziliminden daha yüksek verim sağlamıştır, ancak daha kısa okuma uzunluklarına sahiptir. Bu teknoloji metagenomiğe kazandırdığı avantajlara rağmen, yaygın olarak kullanılmamaktadır.

Ion Torrent platformu da 454'e benzeyen, benzer bir verim ve bir okuma uzunluğu üreten bir teknolojidir. Ion Torrent PGM, milyonlarca mikro dalganın oluşumunda sıralama reaksiyonunda bir nükleotid eklendikten sonra proton serbest bırakan hidrojen potansiyeli değişimini algılayabilen ve mevcut en küçük potansiyometre olarak kabul edilmektedir (101). Maksimum İyon Torrenti 400 bp'lik bir mod uzunluğunda ~500 milyon okumadır.

Daha yüksek verim ve hata oranları karşılığında okuma süresini kısaltması ve dizileme maliyetlerini azaltması ile Illumina teknolojisi, yüksek verimi ve düşük maliyetiyle en popüler teknolojilerden biri haline gelmiştir. Illumina kimyasının temeli, floresanla işaretlenmiş nükleotidlerin sentezi yoluyla reversible-termination (geri dönüşümlü sonlandırma) sekanslamadır. Özetle, DNA fragmanları sekanslama reaksiyonunun gerçekleştiği etiketli nükleotid eklenen yerlere eklenmektedir ve dağıtılmaktadır. Etiketli nükleotidler birleştiğinde ve floresan molekülleri bir lazer tarafından uyarılırsa, sinyal makineye kaydedilmektedir. Sonra florofor molekülü çıkarılır ve bir sonraki nükleotid dahil edilebilmektedir. DNA fragmanları sırasıyla bir okuma başına 300 baz çiftli maksimum okuma uzunluğuyla bir veya iki taraftan sıralı olarak tek uç veya çift uç sıralaması oluşturabilmektedir(102). Bu teknoloji, sekanslama teknolojileri arasında en yüksek seviyededir ve yüzlerce örneklem çoğaltma özelliğine sahiptir (103).

Mikrobiyal çeşitlilik iki farklı yaklaşım kullanılarak belirlenebilmektedir: (1) Amplicon dizilemesi ve (2) Shotgun metagenomik analizi. Birinci yaklaşımda, topluluklardan DNA'nın spesifik bölgeleri, prokaryotlar için 16S rRNA geni ve ökaryotlar için intergenik transkripsiyonlu aralayıcılar (ITS) veya büyük öbek RNA altbirimi (LSU) geni gibi taksonomik bilgilendirici primer hedefleri kullanılarak amplifiye edilmesidir (104, 105). Shotgun metagenomik ise daha önce izolasyon olmaksızın büyük parçaları yeniden inşa etmeye ya da bir topluluktaki organizmalardan genomları tamamlamaya yardım ederek, filogenetik belirteç olarak kullanılabilen çok sayıdaki kodlayıcı ve kodlamasız dizilerin karakterize edilmesine yardımcı olabilmektedir (92).

Bir bakteri türünü tanımlamak zor olsa da, mevcut tanım 16S rRNA'da en az % 97 özdeşlik gerektirmektedir. Bununla birlikte, 16S rRNA dizisi, düşük miktarda organizmaların en iyi ölçümü olmasına ve çapraz çalışma karşılaştırmalarına izin vermek için yaygın şekilde kullanılmasına rağmen, 16S rRNA gibi hedef bölgelere odaklanmadan daha kapsamlı sonuçlar bulunmuştur. Shotgun karakterizasyonu, bir toplulukta bulunan organizmaların genlerinin kataloglanmasına veya çalışma altındaki ekosistemdeki bireysel genomların analiz edilmesine izin vermektedir (113).

Her şeyden önce, "metagenomik" terimi, amplifikon dizisi analizini belirtmek için kullanılmamaktadır çünkü bu analiz, bir numunedeki tüm organizmalardan elde edilebilir genomlardaki tüm genlerin toplanması yerine sadece bir gen üzerine kuruludur. Önerilen daha iyi bir terim "metaprofil" olup, taksonomi veya filogenetik amaçlar için bir gen veya marköre (yani 16S rRNA geni) dayanan bir mikrobiyal toplumdaki tüm üyelerin çalışması olarak yorumlanması daha uygun görülmektedir. Metaprofilasyon, farklı yaşam alanlarındaki organizmalardaki büyük ve karmaşık örneklerde taksonomik ve filogenetik sınıflandırma yapmanın uygunluğundan dolayı yaygın bir şekilde kullanılmıştır (92).

Meta profillemeye, günümüzde Illumina MiSeq veya Ion Torrent PGM gibi platformlar tarafından 16S rRNA amplifikatör kitaplığı hazırlama ve dizileme için başka bir seçenek olduğu belirtilmiştir. Bu kütüphane dizi sıralayıcıları, mikrobik ekolojistlerin, uzunlamasına zaman çalışmalarından alınan çoklu kopyaları ve örnekleri kullanarak kendi laboratuvarlarında çeşitlilik çalışmaları yapmalarına izin vermektedir. HiSeq 2000 ile MiSeq teknolojileri arasındaki karşılaştırmalar, OTU'ların her iki teknolojiye önemli ölçüde farklı olmadığını göstermiştir (106, 107).

Amplikon dizilişinin avantajları ve 16S ribozomal gen veya bunun bir değişken bölgesi gibi yalnızca bir filogenetik işaretleyici (markör) kullanılarak yapılan çapraz tahmin metodunun (bias) sonuçları tezatlık oluşturmaktadır. Bu kısıtlamalardan bazıları türler seviyesinde düşük çözünürlük, bir çok türe ait gen kopya sayısındaki bir aralık, 16S rRNA geninin yatay ve toplam genomun $< 0.1\%$ 'inin ribozomal genler olması, bu markörün bir örnekteki çok düşük genomlardan amplifiye olmasını engellemesidir (108, 109). Filogenetik belirteçler olarak ribozomal genler, metagenomik bir örnekte bulunan hemen hemen tüm mikroorganizmaların taksonomik olarak tanınmalarına olanak tanıyan, bu veritabanında bu markörün geniş bir temsiliyle sonuçlanarak son 40 yıl boyunca kullanılmıştır. Daha önceki amplikon analiz programlarının çoğu, Sanger veya 454 ribozomal pirotag sekansları için tasarlanmıştır (110). Günümüzde, metagenomik yazılım geliştirme, Illumina gibi kısa dizileri veya PacBio reads gibi çok uzun dizileri ele almaktadır (111).

Tax4Fun, 16S rRNA veri kümelerine dayanan mikrobik toplulukların işlevsel yeteneklerini tahmin eden bir yazılım paketidir. Belirteç (*'marker'*) genlerin amplikon tabanlı dizilimi, farklı bölgelerden alınan birçok örnek veya zaman serilerini içeren büyük ölçekli çalışmalar için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ortak 16S rRNA gen bazlı analiz, bir metagenomun filogenetik dağılımını değerlendirmek için güçlü bir araç olduğu bilinmektedir. Ancak toplulukların metabolik potansiyeli hakkında bilgi sağlamamaktadır. Bu nedenle, belirteç gen verilerine dayanan bir mikrobiyal toplumun işlevsel yeteneklerinin tahmininin daha yararlı olacağı düşünülmektedir. Tax4Fun 16S rRNA verilerine dayanan, bir topluluğun fonksiyonellik profillemesi için yeni bir araçtır. Tax4Fun'da, 16S rRNA gen dizilerinin, dizilenmiş prokaryotik genomların işlevselliğiyle bağdaştırılması, 16S rRNA dizisi benzerliğine dayanan en yakın komşu tanımlamasıyla gerçekleştirilmektedir. Tax4Fun, sadece 16S rRNA sekans verilerinden gelen bir mikrobiyal toplumun fonksiyonel profilini tahmin etmektedir (112).

5.MATERYAL VE METOT

5.1.Aksolotlar'ın Bakımı ve Metamorfoza İndüklenmesi

Çalışmamız için; vahşi tip Aksolotlar (*Ambystoma mexicanum*), damızlık halde Ambystoma Genetic Stock Center (AGSC)'dan getirilip, İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Merkezi'nde (MEDİTAM) çoğaltılmış ve deneyler boyunca 1 yaşındaki vahşi tip Aksolotlar kullanılmıştır. İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı (Onay No: 38828770-604.01.01-E.2314) alınmıştır. Her bir akvaryumda, bir Aksolotl olacak şekilde ve yaklaşık ~18 °C sıcaklık altında tutulmuştur.

Deneyler boyunca toplam 10 neotenik ve 10 metamorfik Aksolotl kullanılmıştır. Deney planı için 3 biyolojik replika oluşturulmuştur. Her replika için hem neotenik hem de metamorfik Aksolotlar'dan üçer hayvan ile grup oluşturulmuştur. Ayrıca hayvanların organlarında bakteri varlığını göstermek için bir metamorfik ve bir neotenik Aksolotl kurban edilmiştir.

5.1.1.Metamorfoza indüklenmesi

12 aylık Aksolotlar'ı metamorfoza indüklemek için T4 (Tiroksin) kullanılmıştır (113). 20°C'de 50 nM T4 kullanıldığında, metamorfoz, yaklaşık 60 gün sonra tamamlanmıştır.

25 mL L-tiroksin stok solüsyonu (100 µM) ile karıştırılarak 50 nM T4 hazırlanmıştır. Son hacmi 50 litre olacak şekilde Holtfreter'ın solüsyonuyla karıştırılmıştır. Akvaryum başına 1 Aksolotl olacak şekilde T4 çözeltisi ile birlikte kaplara alınmıştır. Akvaryumların suyu her üç günde bir değiştirilmiştir.

~ 2 hafta kadar morfolojik değişiklikler gözlenmemektedir. 2 hafta sonra, kilo kaybı gözlenmiş, kuyruk yüzgeci ve dorsal sırt yüzgeci gözden kaybolmaya başlamıştır. Hayvanlar metamorfoz geçirirken, daha az suya ihtiyaç duyacakları bilinmektedir. 2 ay boyunca değişimler gözlenmiştir. Metamorfozdan sonra akvaryumlardaki su miktarı az seviyeye indirilmiştir. Bu iki aylık süreç boyunca

neotenik Aksolotllar da normal akvaryumlarında olmak üzere doğal ortam koşullarını sağlayan Holtfreter's Solüsyonu içerisinde, her iki günde bir pellet yem (JBL novolotl) ile beslenmişlerdir.

5.2. Biyolojik Replika Oluşturma

5.2.1. Neotenik Aksolotllar için biyolojik replikalar oluşturma

Replika 1 Mide: 3 Aksolotl'un mide örneği

Replika 2 Mide: 3 Aksolotl'un mide örneği

Replika 3 Mide: 3 Aksolotl'un mide örneği

Replika 1 Bağırsak: 3 Aksolotl'un bağırsak örneği

Replika 2 Bağırsak: 3 Aksolotl'un bağırsak örneği

Replika 3 Bağırsak: 3 Aksolotl'un bağırsak örneği

Replika 1 Fekal madde: 3 Aksolotl'un fekal madde örneği

Replika 2 Fekal madde: 3 Aksolotl'un fekal madde örneği

Replika 3 Fekal madde: 3 Aksolotl'un fekal madde örneği

Replika 1 Deri: 3 Aksolotl'un deri örneği

Replika 2 Deri: 3 Aksolotl'un deri örneği

Replika 3 Deri: 3 Aksolotl'un deri örneği.

5.2.2. Metamorfik Aksolotl'lar için biyolojik replika oluşturma

Replika 1 Mide: 3 Aksolotl'un mide örneği

Replika 2 Mide: 3 Aksolotl'un mide örneği

Replika 3 Mide: 3 Aksolotl'un mide örneği

Replika 1 Bağırsak: 3 Aksolotl'un bağırsak örneği

Replika 2 Bağırsak: 3 Aksolotl'un bağırsak örneği

Replika 3 Bağırsak: 3 Aksolotl'un bağırsak örneği

Replika 1 Fekal Madde: 3 Aksolotl'un fekal madde örneği

Replika 2 Fekal Madde: 3 Aksolotl'un fekal madde örneği

Replika 3 Fekal Madde: 3 Aksolotl'un fekal madde örneği

Replika 1 Deri: 3 Aksolotl'un deri örneği

Replika 2 Deri: 3 Aksolotl'un deri örneği

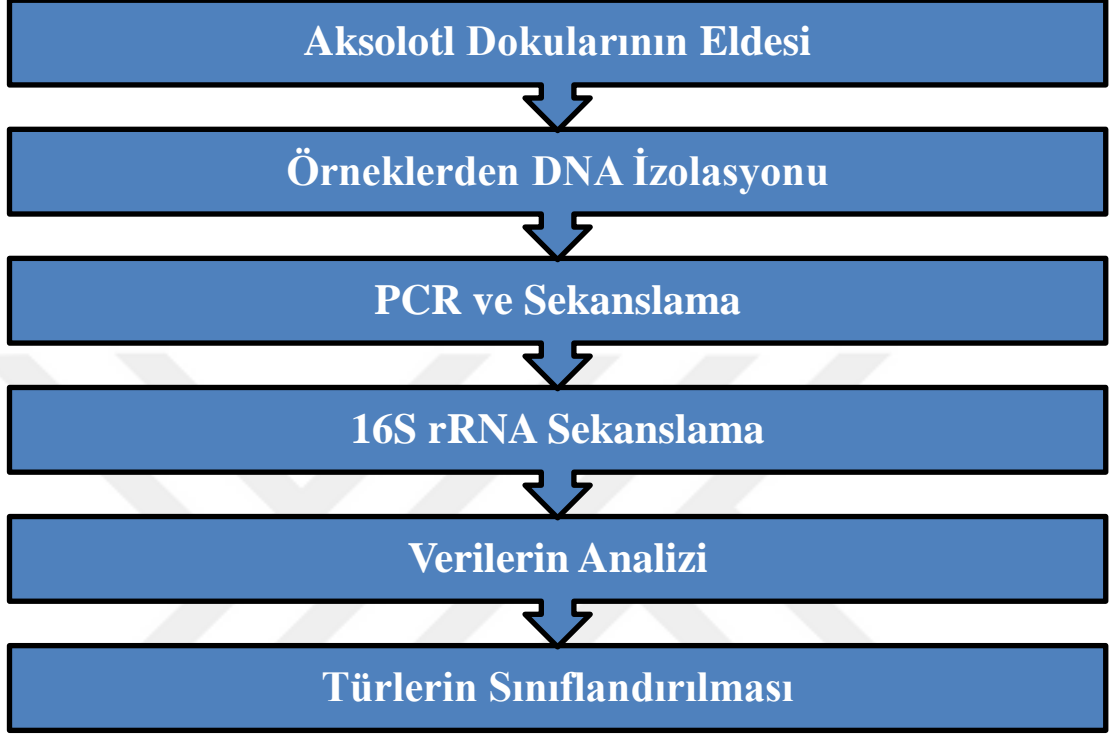
Replika 3 Deri: 3 Aksolotl'un deri örneği

5.3.Kullanılan Malzemeler

Tablo.5.3.1.Kullanılan kitlerin ve sarf malzemelerin listesi.

Sarf Malzeme Adı	Firma	Katalog Numarası
Benzocaine	Sigma	E1501-100G
DNeasy Blood & Tissue Kits	Qiagen	69504
QIAamp DNA Stool Mini Kit	Qiagen	51504
Qubit dsDNA Broad Range Assay Kit	ThermoFisher Scientific	Q32850
SYBR™ Safe DNA Gel Stain	ThermoFisher Scientific	S33102
DNA Gel Loading Dye (6X)	ThermoFisher Scientific	R0611
10x Bluejuice Loading Buffer	ThermoFisher Scientific	10816015
2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 kb)	NEB	N3200L
Taq 2x Master Mix	NEB	M0270L
Agarose	Wisent Bio Products	800-015-EG

5.4.Aksolotların Organ Örneklerinin Alınması ve Organ Örneklerinden DNA İzolasyonu



Şekil.5.4.1.Metod işleyiş sırası

5.4.1.Anestezi hazırlama

Sakrifiye edilecek Aksolotllar için stok olarak 1 litrelik anestetik şu şekilde hazırlanmıştır:

1 litre distile su içerisine 1 gram Benzokain (Sigma) katılarak manyetik karıştırıcı üzerinde bir gece bırakılarak iyice çözünmesi sağlanmıştır.

Aksolotllar birer birer yaklaşık 250 ml içerisine alınarak 20 dakika beklenmiştir. Forseps ile parmaklarının ya da kuyruklarının kısırılmasına tepki verip vermedikleri gözlenerek, anesteziye girip girmedikleri sinirsel tepkileri ölçülerek kontrol edilmiştir.

5.4.2. Organ örneklerinin alınması

Mide, bağırsak ve deri örnekleri için üçer adet, toplamda 9 adet, 15 ml hacimli falkon tüpü içerisine serum fizyolojik hazırlanmıştır. Organ örneklerini -80°C'ye saklamak için köpük kutuyla sıvı azot alınmıştır. Organları ve fekal maddeyi sıvı azot içerisine atmak için belli büyüklükte alüminyum folyolar kesilerek etiketleme yapılmıştır.

Steril koşullara uygun olacak şekilde, laminar kabin içerisinde her organ örneği (mide, bağırsak, deri) mide ve bağırsağın içleri iyice temizlenerek üç farklı serum fizyolojik dolu falkon tüpüne sırayla atılarak temizlenmiştir. Ardından etiketli alüminyum folyolara alınarak sıvı azot içerisine alınmıştır. Bu işlemin ardından bağırsaktan elde edilen fekal maddeler de, alüminyum folyo içerisine alınmış, böylece tüm örnekler sıvı azota alınmıştır. Bütün bu işlemler hücresel yapıların bozulmaması için hızlıca gerçekleştirilmiştir.

Organ ve fekal madde örnekleri, DNA izolasyonu gerçekleşene kadar -80°C'de saklanmıştır.

5.4.3.DNA izolasyonu

5.4.3.1.Dokulardan DNA İzolasyonu

Organ örneklerinden DNA izole etmek için, “Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit (Katolog No: 69504)” protokolü uygulanmıştır. Organ örnekleri 20 – 25 mg kadar küçük parçalara -havan ve sıvı azot yardımıyla- ayrılıp 1,5 ml hacimli ependorf tüplerine alınmıştır. Dokular bu esnada sıvı azotta bekletilmiştir.

Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit protokolü, üreticisinin belirttiği şekilde aşağıdaki gibi uygulanmıştır:

Ependorf tüpleri içerisindeki doku örneklerine 180 µl ATL Buffer ve 20 µl Proteinaz K Solüsyonu eklenmiştir. Ependorf tüpler, doku örnekleri tamamen çözülene dek 56 °C'de inkübe edilmiştir. Ependorf tüpler homojenize olmaları adına ~5 – 10 dakikada

bir vortekslenmiştir. Tamamen çözülen dokuların üzerine 200 µl AL Buffer eklenip tekrar vortekslenmiştir. Örnekler 56 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Ardından tüplere 200 µl saf etanol eklenerek homojenize olmaları için vortekslenmişlerdir. Doku çözeltileri iyice pipetlenerek DNeasy Mini kolon tüplerine alınmışlardır. 1 dakika, 6000 x g'de santrifüj edilmişlerdir. Bu aşamada, DNA, kolonlardaki membrana yapışmaktadır. Toplama tüplerindeki karışım atık çöpüne dökülmüştür. Spin kolonlarına 500 µl AW1 Buffer eklenmiştir. Ardından 1 dakika, 6000 x g'de santrifüj edilmiştir. Toplama tüplerindeki sıvılar atık çöpüne dökülmüştür. Spin kolonlarına 500 µl AW2 Buffer eklenmiştir. Ve ardından 3 dakika, 20000 x g'de santrifüj edilmiştir. 1,5 ml hacimli steril ependorf tüpleri kolonların altına yerleştirildi. Spin kolonlarına 100-200 µl AE Buffer eklendi. Oda sıcaklığında, 1 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 1 dakika, 20000 x g'de santrifüj edilmiştir. Bu basamakta membrana yapışan DNA membrandan alınmıştır. Toplanan örneklerdeki DNA miktarı Qubit cihazı ile ölçüm yapılarak tayin edilmiştir.

5.4.3.2.Fekal Maddeden DNA İzolasyonu

Bu deney için “Qiagen QIAamp DNA Stool Mini Kit (Katalog No/ID: 51504)” kullanılmıştır. Fekal madde örnekleri 20 – 25 mg kadar küçük parçalara - havan ve sıvı azot yardımıyla- ayrılıp 1,5 ml hacimli ependorf tüplerine alınmıştır. Örnekler bu esnada sıvı azotta bekletilmiştir. Üreticisinin protokolü uygulanmıştır:

2 ml hacimli ependorflara üçer fekal madde, R1, R2 ve R3 olacak şekilde rastgele koyulmuştur. Ependorflar buza alınmıştır. Örnekler 1,4 ml ASL Buffer eklenmiştir. Homojenize olana dek 1 dakika vortekslenmiştir. 70 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Son hızda, 1 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte kalan sıvının (süpernatant) 1,2 ml'i yeni 2ml hacimli ependorf tüplerine alınmıştır. Her ependorf içerisine kitte bulunan 'InhibitEX Tablet'ten birer tane atılmıştır. 1 dakika vortekslenmiştir. 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Son hızda, 3 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantın 1,5 ml'i yeni 1,5 ml hacimli ependorf tüplerine alınmıştır. Pelletler atılmıştır. Yeni tüpler son hızda, 3 dakika santrifüj edilmiştir. Boş, başka ependorflara 30 µl proteinaz K koyulmuştur. Üzerlerine 400 µl süpernatant ve 400 µl

Buffer AL eklenmiştir. 15 saniye vortekslenmiştir. 70 °C’de 10 dakika inkübe edilmiştir. Her bir ependorf tüpe 400 µl etanol (%96-100) koyulmuştur. 10 saniye vortekslenmiştir. Kitte bulunan spin kolonları etiketlenmiş ve 2 ml hacimli toplama tüplerine takılmıştır. Son hızda, 1 dakika santrifüj edilmiştir. Altaki atık olan toplama tüpleri atılmıştır. Spin kolonları yeni toplama tüplerine takılmıştır. 500 µl AW1 Buffer eklenmiştir. Son hızda, 1 dakika santrifüj edilmiştir. İçerisinde atık bulunan toplama tüpleri atılmıştır. Yeni toplama tüpleri takılmıştır. 500 µl AW2 Buffer eklenmiştir. Son hızda, 3 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpleri atılmıştır. 1,5 ml ependorf tüpler etiketlenmiştir. Spin kolonları bu ependorflara takılmıştır. Membrana değecek şekilde 100 µl AE Buffer eklenmiştir. Oda sıcaklığında, 1 dakika inkübe edilmiştir. DNA’nın ayrışması için son hızda, 1 dakika santrifüj edilmiştir.

5.4.3.3.Qubit Assay Protokolü

İzole edilen tüm DNA konsantrasyonları, izolasyonun ardından Qubit Assay ile ölçülmüştür.

DNA konsantrasyonu için “Invitrogen Qubit dsDNA BR Assay Kit (Katalog No: Q32850)” kullanılmıştır. Üreticisinin protokolü uygulanmıştır:

0,5 ml hacimli PCR tüplerine 199 µl kitte bulunan standarttan ve 1 µl DNA örneği koyularak 200 µl’ye tamamlanmıştır. PCR tüpleri 2 -3 saniye vortekslenmiştir. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir. Tüpler “Qubit 2.0 Fluorometer” cihazına yerleştirilerek okutulmuştur.

5.4.3.3.1.Qubit Assay Sonuçları

Tablo5.4.3.3.1.Qubit Assay Sonuçları

Örnek	Neotenik (ng / µl)	Metamorfik (ng / µl)
Mide R1	25	135
Mide R2	210	134
Mide R3	260	155
Bağırsak R1	750	835
Bağırsak R2	1500	283
Bağırsak R3	420	181
Deri R1	90	73,4
Deri R2	140	73,8
Deri R3	130	83,3
Fekal Madde R1	153	95
Fekal Madde R2	24,2	102
Fekal Madde R3	60,4	71

5.4.3.3.2.Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Konsantrasyonları ölçülen örneklerin DNA örneklerine, 16S rRNA primerleri kullanılarak PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yapılmıştır ve PZR ürünleri agaroz jelde yürütülerek bant profillerine bakılmıştır.

5.5.İzole Edilen DNA'lardan 16S Kütüphanesinin Hazırlanması ve Dizi Analizinin Yapılması

Bakterilerin ve diğer canlıların filogenetik ilişkisi, genetik bilgilerinin değişmeyen bir bölgesinin kıyaslanmasıyla mümkün olduğu ortaya koyulmuştur (114). Bakteriler ve arkeabakteriler için bu genetik bölge 16S (küçük alt birim), ökaryotlar için ise 18S rRNA bölgesidir. 16S rRNA geninin V3-V4 bölgesi çoğaltılmıştır. Bu bölgeleri PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile çoğaltmak amacıyla aşağıdaki 341F ve 805R primerleri tasarlanmıştır.

5.5.1.16S primer seti:

16s bögesini çoğaltmak için kullandığımız primerlerin sekans bilgisi şöyledir:

16S_341F:

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

16S_805R:

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

Forward ve reverse primerlerin 5' uçlarına Miseq dizileme adaptör sekansları eklenmiştir. Her örnekten 2X KAPA HiFi Hot Start Ready Mix PCR Kiti ile toplam hacmi 25 µl olan reaksiyon karışımında PCR amplifikasyonu için 12.5 ng saflaştırılmış DNA kullanılmıştır.

Bu çoğatma işlemi için aşağıdaki PZR reaksiyonu, PZR tüplerine buz içerisinde hazırlanmıştır:

Tablo5.5.1.1.PZR reaksiyonu için kullanılan enzimlerin miktarı

Materyal	Miktar
gDNA	1 µl
F_Primer	0.5 µl
R_Primer	0.5 µl
Taq DNA polimeraz	12.5 µl
ddH2O	10.5 µl
Toplam	25 µl

Hazırlanan PZR tüpleri için PCR cihazında aşağıdaki siklus ayarlanmıştır:

Tablo5.5.1.2.PZR reaksiyonu şeması

95 °C	3 dakika
95 °C	30 saniye
55 °C	30 saniye
72 °C	30 saniye
72 °C	5 dakika
12 °C	∞



25 X

Ardından örnekler 4 °C’de tutulmak adına buza alınmıştır.

5.5.2.16S analizinin yapılması

Elde edilen PZR ürünleri Agencourt AMPure XP Saflaştırma Sistemi (Beckman Coulter) ile saflaştırılmıştır. Ardından 2. PZR örneğe özgü barkodlar eklenerek gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan kütüphane, Illumina Miseq platformu tarafından MiSeq Reaktif Kiti v3 kullanılarak dizilenmiştir.

MiSeq Paired End ham dizileme verilerini analiz etmek için Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME, v1.9.1) (115) yazılımında kullanılan FASTQ Paired End Pipetline yazılımında kullanılan FASTQ kullanılmıştır. Ön işlem sürecinde girdi verileri çoğaltılmıştır ve kalite kontrolünde, minimum kalite skoru 20’yi geçenler okunmuştur. Elde edilen okumalardan sonra QIIME açık referans analizi Elde edilen okumalara katıldıktan sonra QIIME açık referans analizi, % 97 kümelenmiş SILVA referansı (SILVA 123 release) 16S rRNA veritabanına (116) dayalı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu aşama, kimerik haritasını kaldırmak için UCHIME metodu (v4.2) ile birlikte Operasyonel Taksonomik Birimlerin (OTU) seçilmesi ve sınıflandırılması için UCLUST algoritmasını (117) ve pyNST taksonomisinin tespiti gerçekleştirilmiştir. Shannon (118), Chao1, OTU ve PD Whole Tree (Filogenetik Çeşitlilik) metriklerini kullanan alfa çeşitlilik analiziyle elde edilen

OTU tablosu kullanarak, örnek başına 34.786 sekans okuması gerçekleştirilmiştir. Örnek grupları arasındaki fark istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır ve elde edilen p değerleri, FDR yöntemi kullanılarak yapılan çoklu test ile doğrulanmıştır. QIIME sonuçlarını tamamlamak adına, aşağı doğru analiz için R Statiscal Yazılımı (v3.3.1) ve TM4 MeV (v4.8.1)(119) kullanılmıştır. Mikrobik toplum arasında R'nin kullanımı gittikçe artmaktadır ve MeV, bu alanda yapılan bir çalışmada kullanılmıştır(120). Beta çeşitliliği analizinde, Bray Curtis farklılıkları(121), R vegan kütüphanesi (v2.4.1) (122) kullanılarak hesaplanmıştır ve QIIME kullanılarak Ağırlıklı UniFrac Aralıkları (123) hesaplanmıştır. Bu çok değişkenli analizin sonuçları sırasıyla Temel Bileşen Analizi (PCoA) ve Metrik Olmayan Çok Boyutlu Ölçekleme (NMDS) grafiklerini (123) üretmek için kullanılmıştır. OTU verilerinden, SILVA referans 16S rRNA veritabanından ve KEGG Orthology (KO) veritabanından (124) her örnekteki enzim çeşitliliğini tahmin etmek için kullanılmıştır. Tax4Fun R paketi (v 0.3.1) (112) araştırılan mikrobiyal toplulukların işlevsel çeşitliliği hakkında potansiyel ipuçları elde etmek için uygulanmıştır. MeV, örnekler arasındaki OTU çeşitliliğinin ve tahmin edilen enzim çeşitliliğinin istatistiksel farklılıklarını ayrı ayrı hesaplamak için kullanılmıştır. Karşılaştırılan çeşitliliklerdeki önemli farklar istatistiksel analizlele belirlenmiştir ve daha sonra Pearson korelasyonuna dayalı hiyerarşik kümeleme ısı haritaları kullanılarak görsel hale getirilmiştir.

5.6.Aksolot Organ Örnekleriyle Gram Boyama Yapılması

Bir metamorfik ve bir neotenik aksolotldan alınan mide, bağırsak ve deri dokuları gram boyama için %10 Nötral Buffer Formalin içerisine ve ekim yapmak için katı agar besiyerlerine alınmıştır. Ekimde fekal madde de mevcuttur.

5.6.1.Katı besiyerlerine ekim

Birer metamorfik ve neotenik canlıya ait bağırsak, mide ve deri doku örnekleri üçer kez serum fizyolojik dolu falkon tüplerinden geçirilerek küçük parçalara ayrılmıştır, ependorf tüplere alınmıştır ve 5 dakika vortekslenmiştir.

Fekal madde ve diğer örnekler, aerob ve anaerob olmak üzere 8 adet kanlı agar besiyerlerine eküvyon epondorfa daldırılmak süretiyle ekimleri yapılmıştır. İnkübatöre alınmıştır. Ertesi gün koloniler seçilmiştir ve gram boyaması yapılmıştır.

5.6.2.Gram Boyama

5.6.2.1.Prafine gömülü dokulardan gram boyama

Parafinli slaytlar deparafinizasyon için 1 saat 65 °C etüve alınmıştır. Preparatlara sabitlemek adına metanol damlatılarak 1 dakika bekletilmiştir. Kurumaya bırakılmıştır. Lamların üzerine kristal viyole damlatılmıştır ve 1,5 dakika bekletilmiştir. Kristal viyole akıtılmıştır ve çeşme suyu ile yıkanmıştır. Luksol damlatılarak 3 dakika bekletilmiştir. Luksol akıtılmıştır ve preparatlar çeşme suyuyla yıkanmıştır. Renksizleştirmek için alkol damlatılmıştır. 30 saniye bekletilmiştir. Alkol akıtılmıştır ve preparatlar yıkanmıştır. Preparatlara safranin damlatılmıştır. 1 dakika bekletilmiştir. Safranin akıtılmıştır ve preparatlar çeşme suyuyla yıkanmıştır. Preparatlar kuruyunca lamlar lamelle kapatılmıştır. Mikroskopla incelenmiştir.

5.6.2.2.Petrilere ekili dokulardan gram boyama

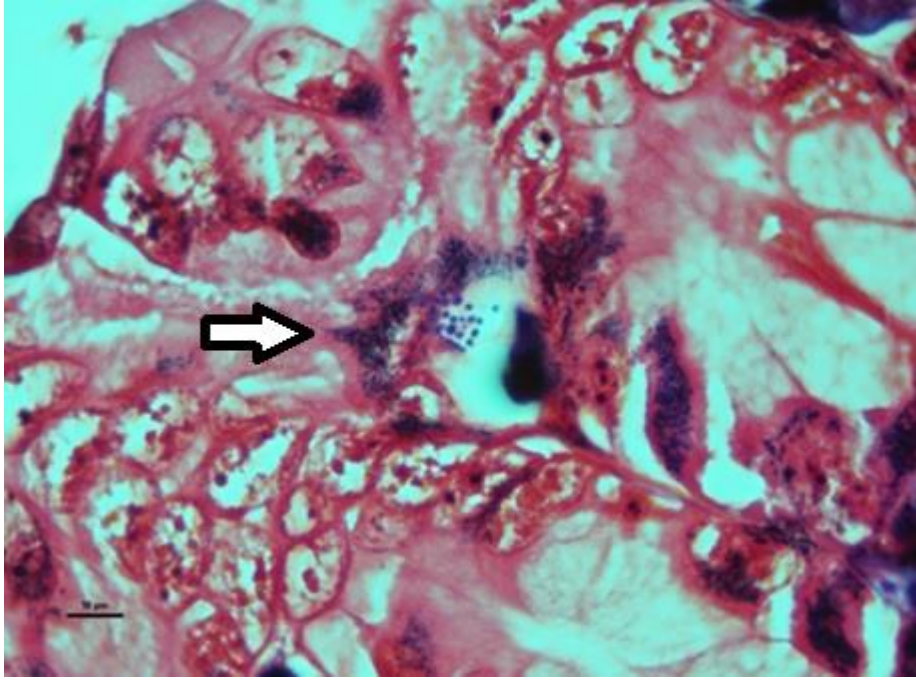
Lam üzerine bir damla steril su koyulmuştur. Steril öze ile koloniden küçük bir kısım alınarak yumuşak bir şekilde damlaya karıştırılmıştır. Kurumuş lam Bunzen beki alevi üzerinden iki-üç kez geçirilmiştir. Lam soğuyunca aşağıdaki protokol uygulanmıştır:

Lamların üzerine kristal viyole damlatılmış ve 1 dakika bekletilmiştir. Kristal viyole akıtılmış ve çeşme suyu ile yıkanmıştır. Luksol preparatlara damlatılmış ve 1 dakika bekletilmiştir. Ardından luxol akıtılmıştır preparatlar çeşme suyuyla yıkanmıştır. Alkol ile renk gidermek için 10 saniye muamele edilmiştir. Alkol akıtılmıştır ve preparatlar çeşme suyu ile yıkanmıştır. Safranin damlatılarak 1 dakika bekletilmiştir. Safranin akıtılmıştır ve preparatlar çeşme suyuyla yıkanmıştır. Preparatlar kuruyunca lamlar lamelle kapatılmıştır. Mikroskopta incelenmiştir.

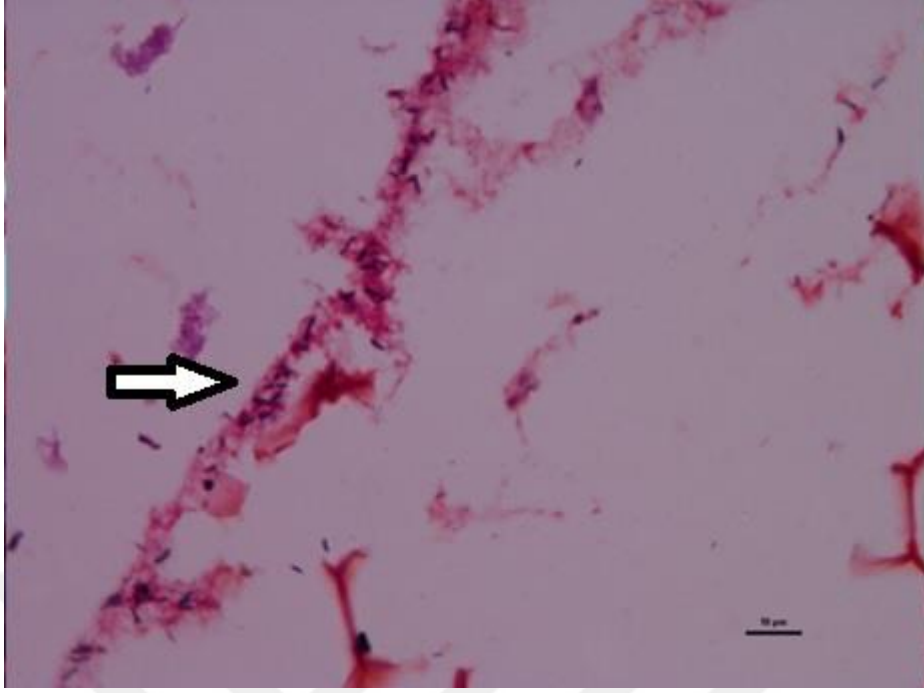
6. BULGULAR

6.1.Gram Boyama ile Mikrobiyal Kolonilerin Varlığının Tespiti

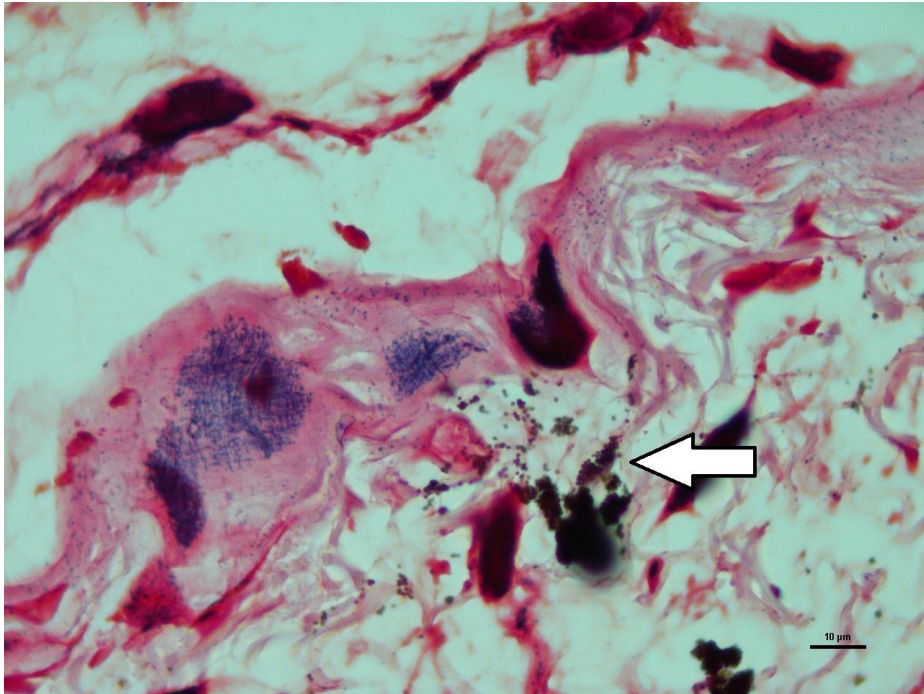
Aksolotl dokularındaki mikrobiyal kolonilerin varlığını göstermek için gram boyama yapılmıştır. Metamorfik ve neotenik Aksolotllar'ın mide, bağırsak ve deri dokularından parafin kesit alınmış slaytlara gram boyama yapılarak, fekal örneklerden de petride büyütülen kolonilerin slaytlara alınıp gram boyaması yapılarak bakteri varlığı tespit edilmiştir.



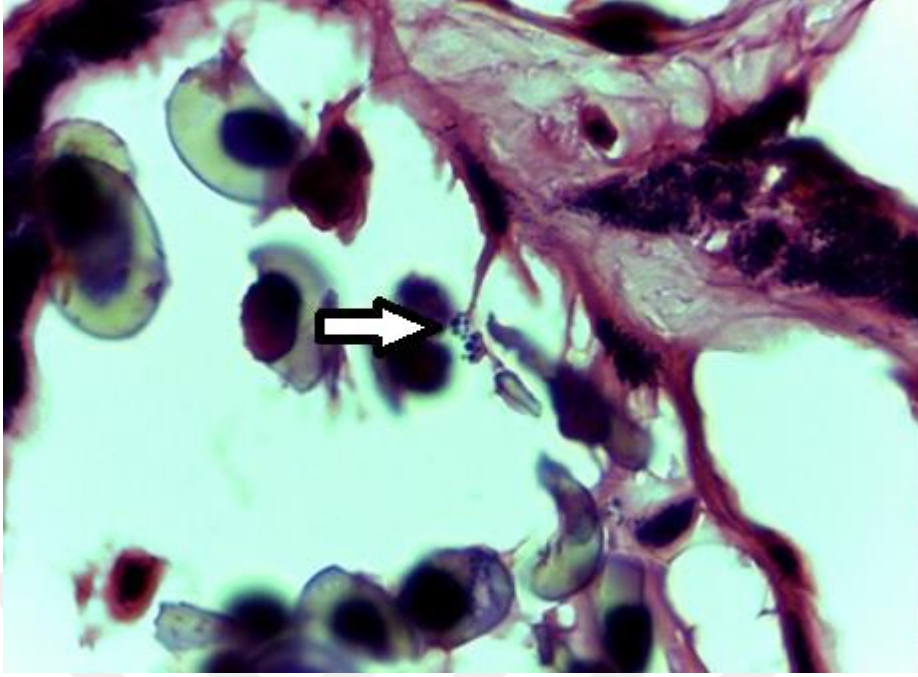
Resim6.1.1. Neotenik Aksolotl mide gram boyaması (Bar: 10 µm).



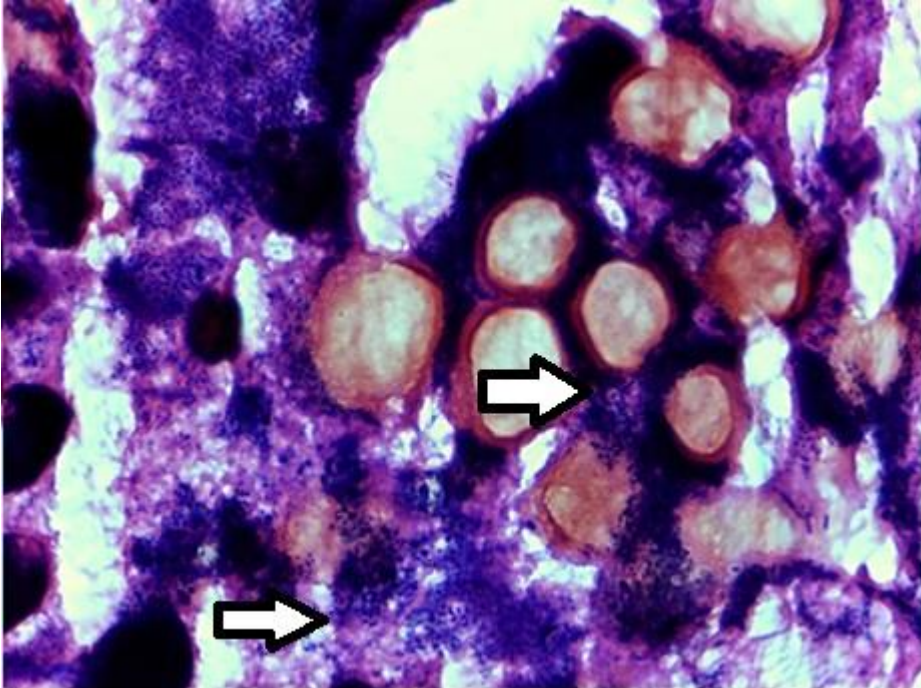
Resim6.1.2. Neotenik Aksolotl bağırsak gram boyaması (Bar: 10 µm).



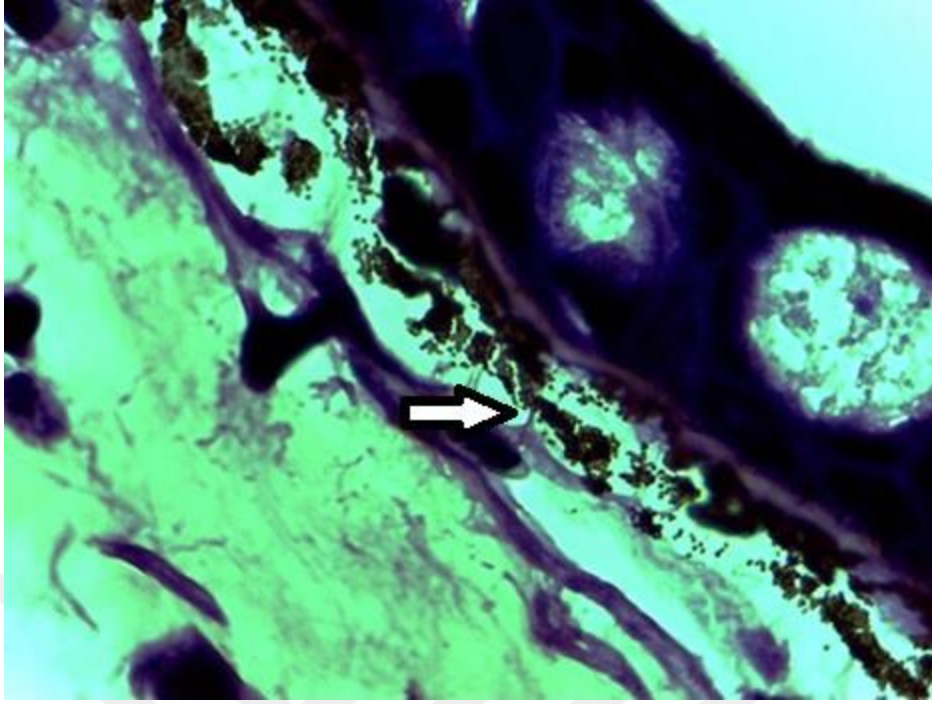
Resim6.1.3. Neotenik Aksolotl deri gram boyaması (Bar: 10 µm).



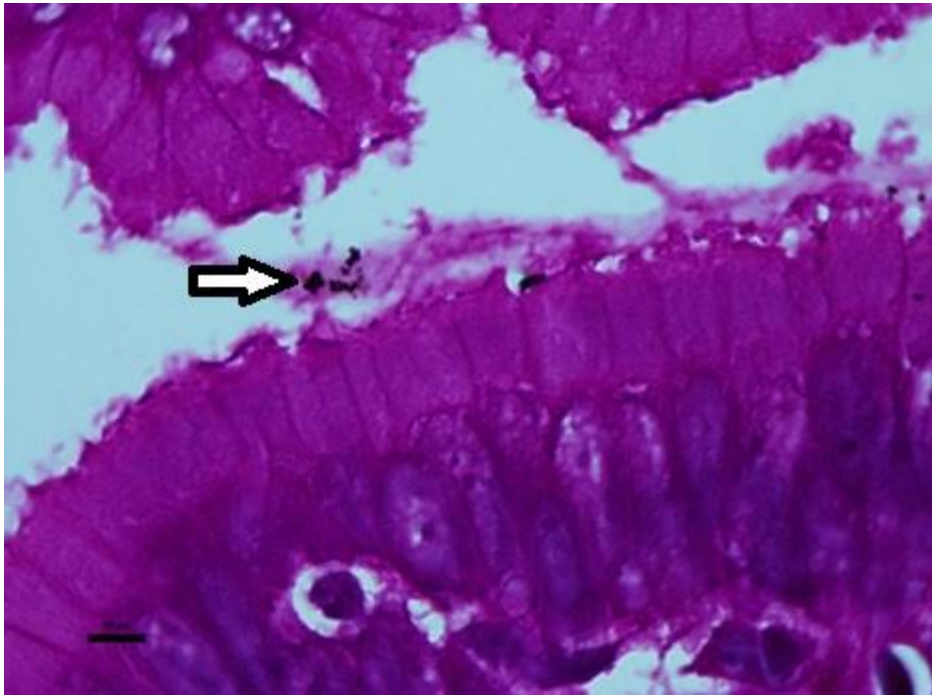
Resim6.1.4. Neotenik Axsolotl mide gram boyaması (Bar: 10 μ m).



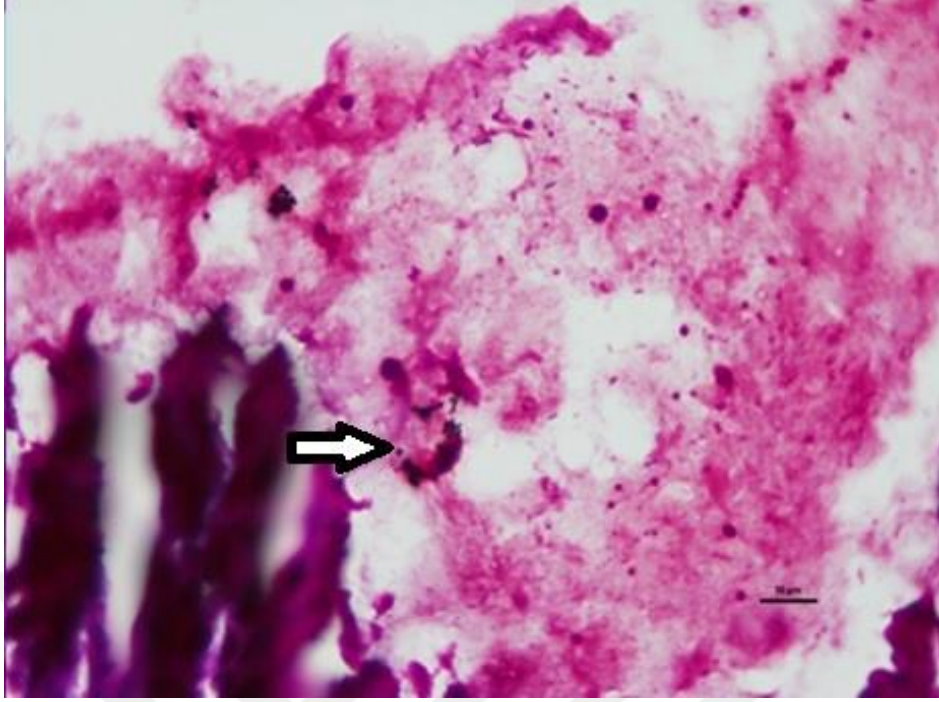
Resim6.1.5. Neotenik Axsolotl bağırsak gram boyaması (Bar: 10 μ m).



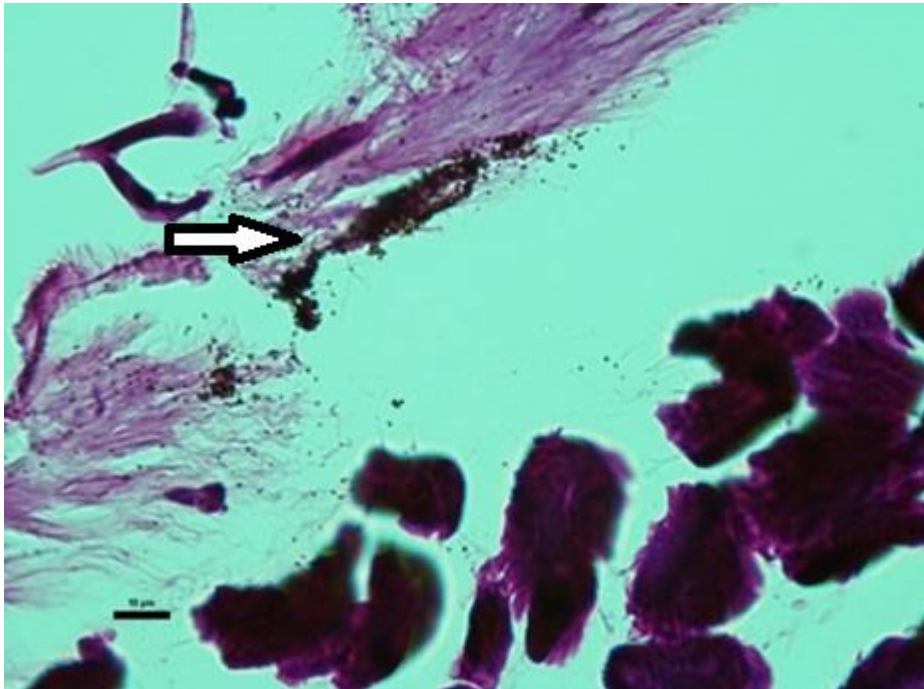
Resim6.1.6. Neotenic Axsolotl deri gram boyaması (Bar: 10 μm).



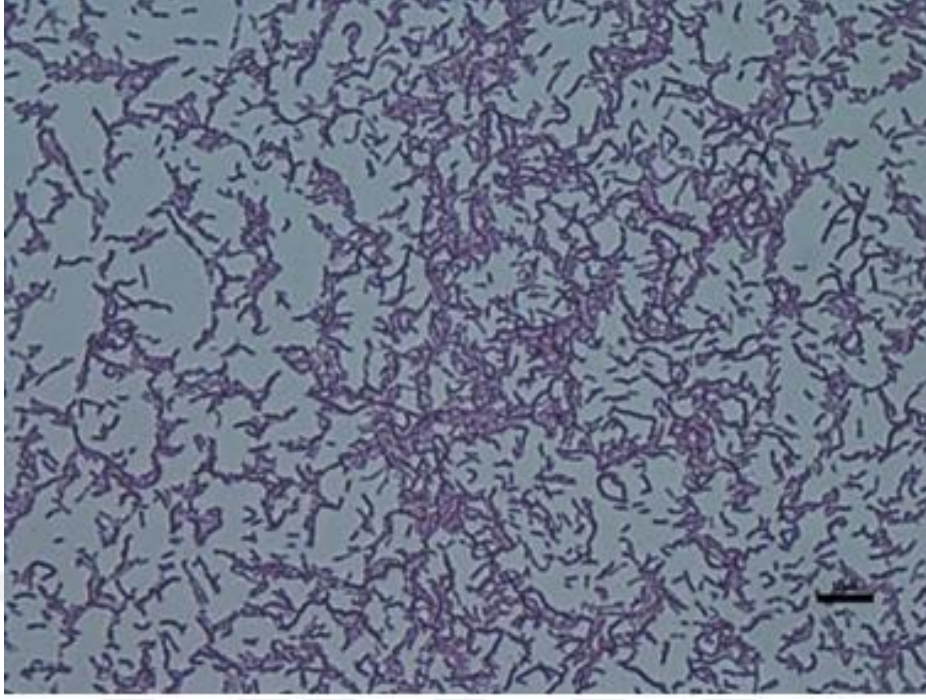
Resim6.1.7. Metamorfik Axsolotl mide gram boyaması (Bar: 10 μm).



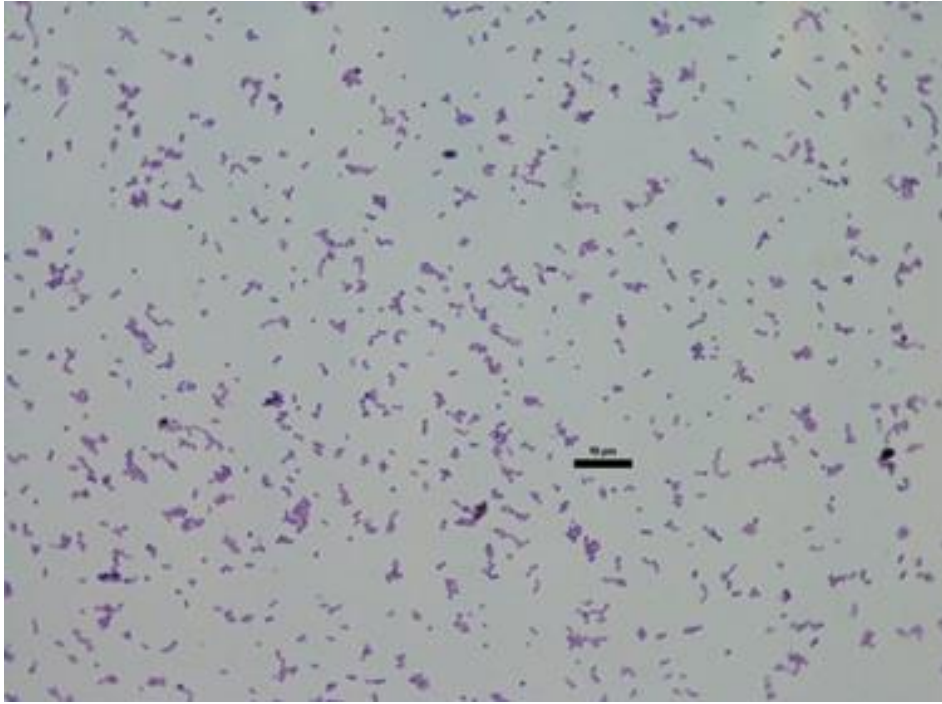
Resim6.1.8. Metamorfik Aksolotl bağırsak gram boyaması (Bar: 10 μ m).



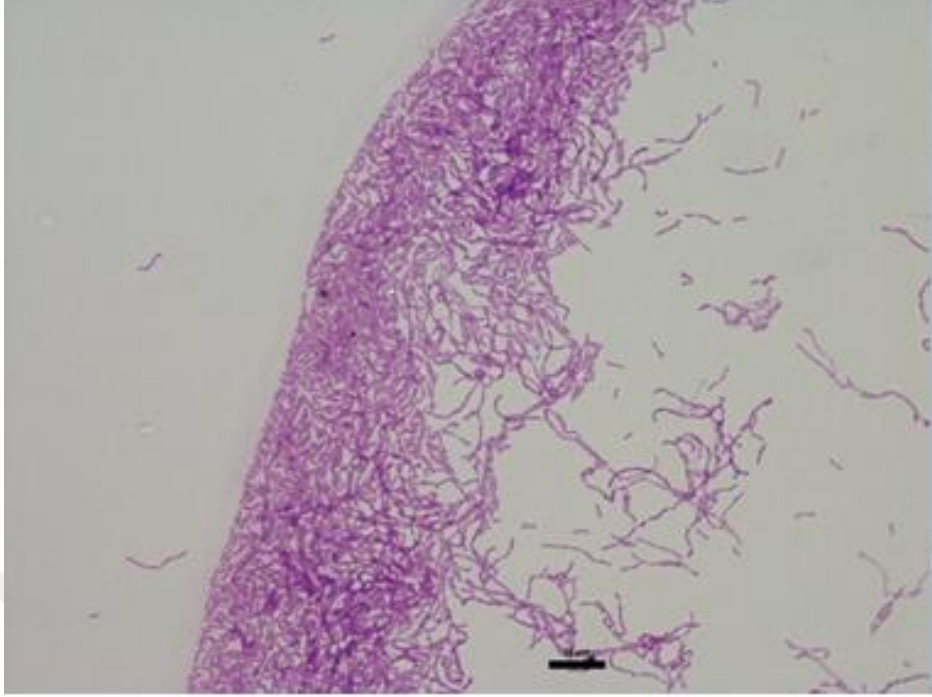
Resim6.1.9. Metamorfik Aksolotl deri gram boyaması (Bar: 10 μ m).



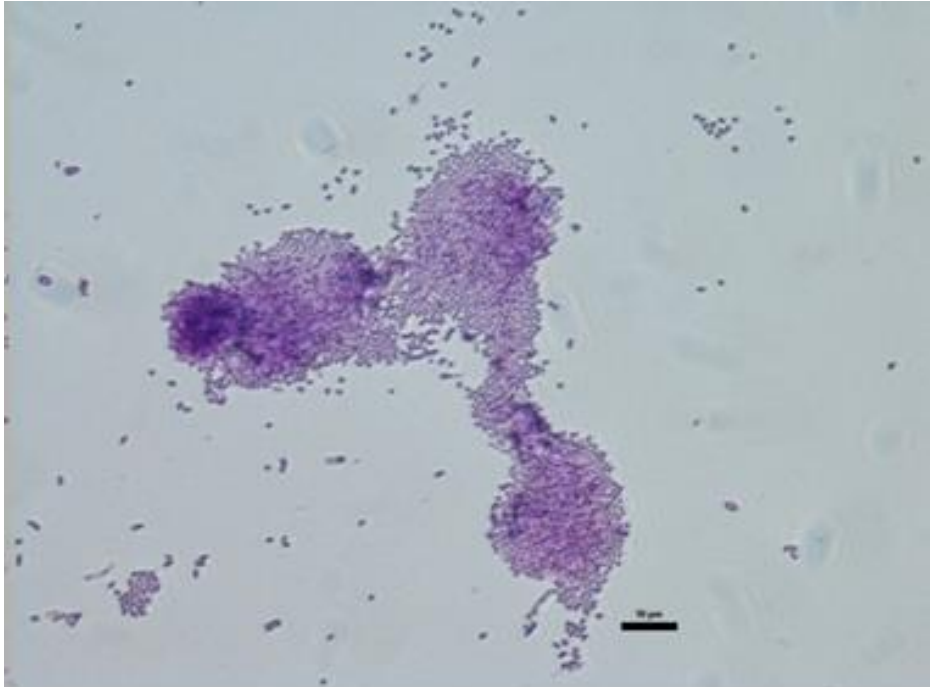
Resim6.1.10. Neotenic Axsolotl mide petri gram boyaması (Bar: 10 μ m).



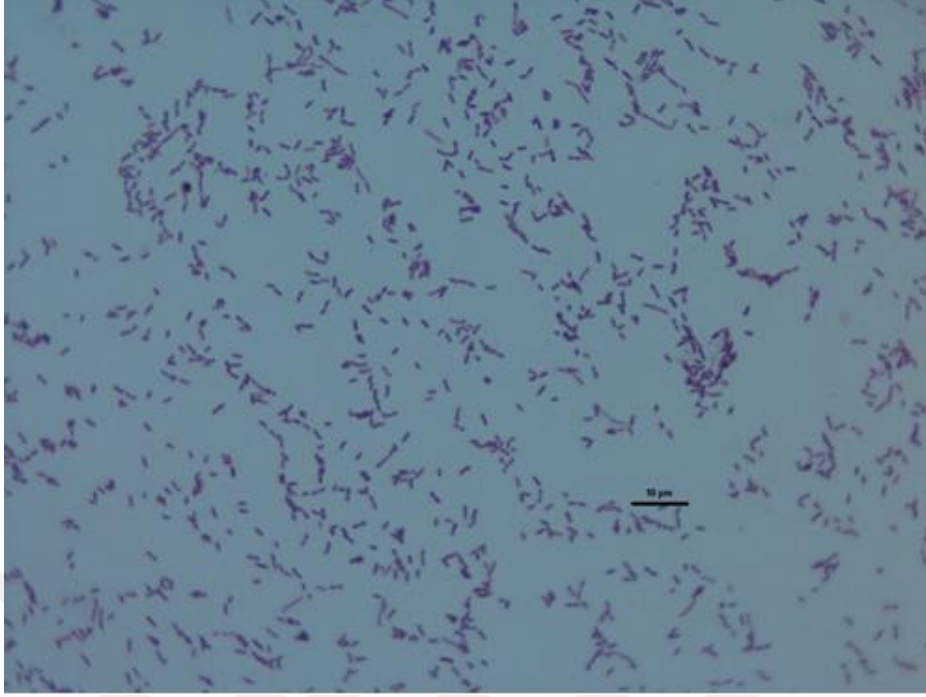
Resim6.1.11. Neotenic Axsolotl bağırsak petri gram boyaması (Bar: 10 μ m).



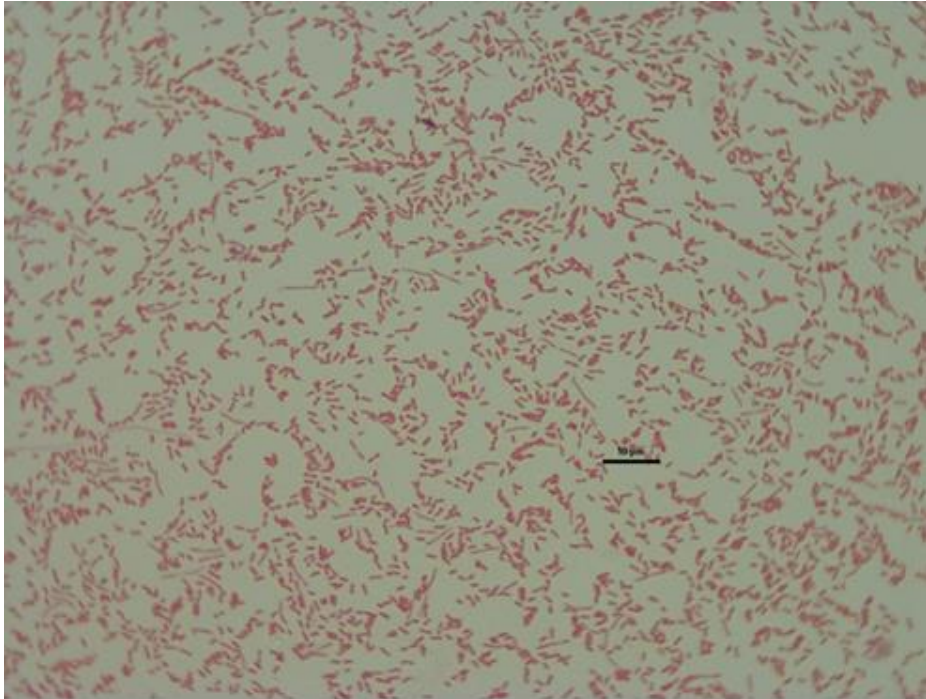
Resim6.1.12. Neotenic Aksolotl deri petri gram boyaması (Bar: 10 μ m).



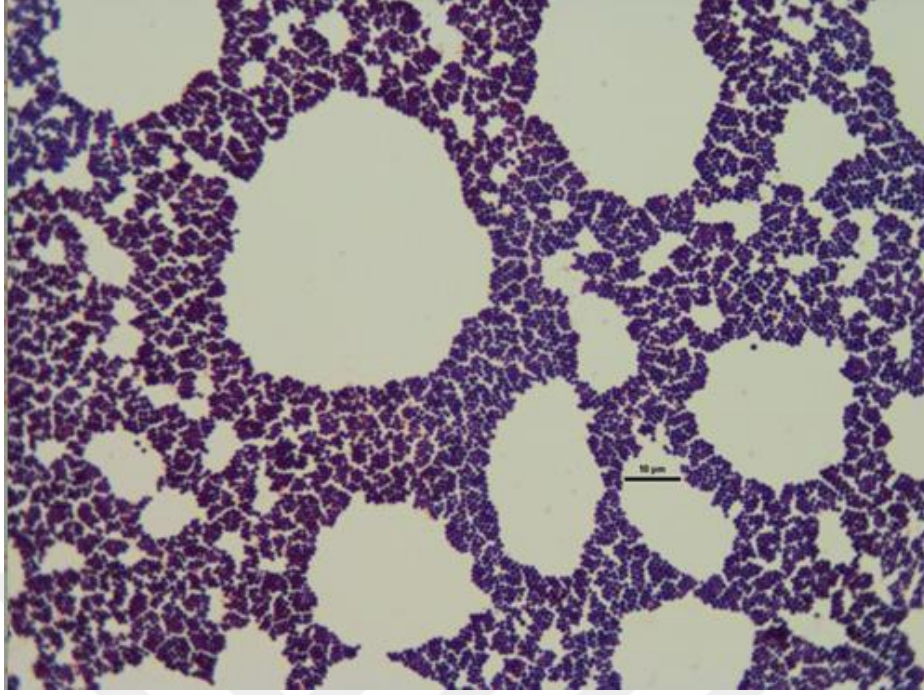
Resim6.1.13. Neotenic Aksolotl dışkı petri gram boyaması (Bar: 10 μ m).



Resim6.1.14. Neotenic Aksolotl deri petri gram boyaması (Bar: 10 μ m).



Resim6.1.15. Neotenic Aksolotl deri petri gram boyaması (Bar: 10 μ m).



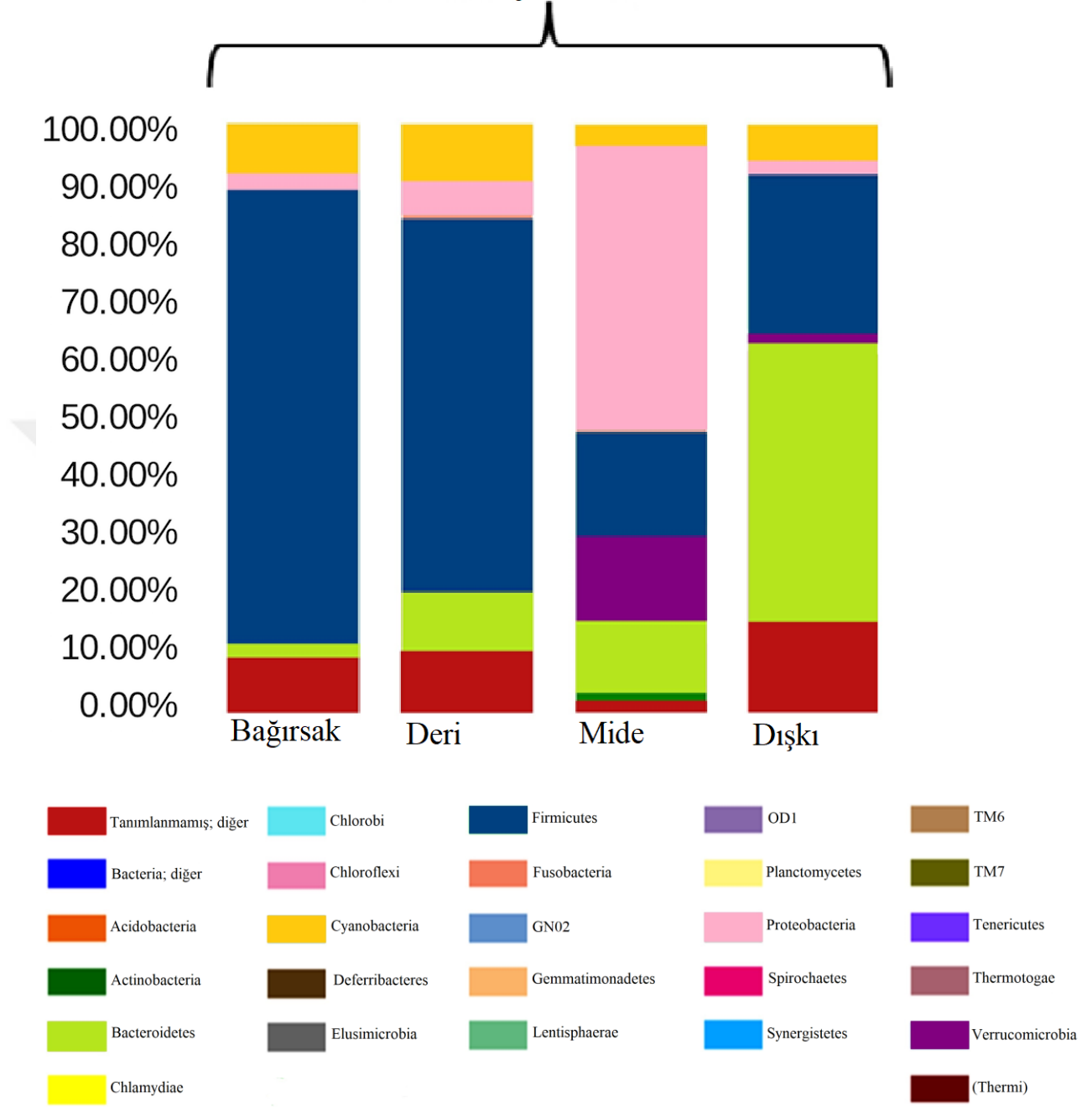
Resim6.1.16. Neotenic Aksolotl deri petri gram boyaması (Bar: 10 µm).

6.2.Mikrobiyal Çeşitlilik

Toplamda 6.264.742 adet bakteriyel dizi, 18 aksolotl örneğinden tespit edilmiştir. Bu dizilerin 25 filum, 59 sınıf, 88 takım, 157 familya ve 309 cinse ait olduğu gözlemlenmiştir. Bu mikrobiyal toplulukların hem neotenik – metamorfik hem de incelenen organ bazında birbirinden farklı olduğu gözlenmiştir. Neotenik ve metamorfik fekal maddede mikrobiyal açıdan önemli bir farklılık gözlenmezken, en önemli farklılık neotenik deri ve neotenik bağırsak örneklerinde gözlenmiştir.

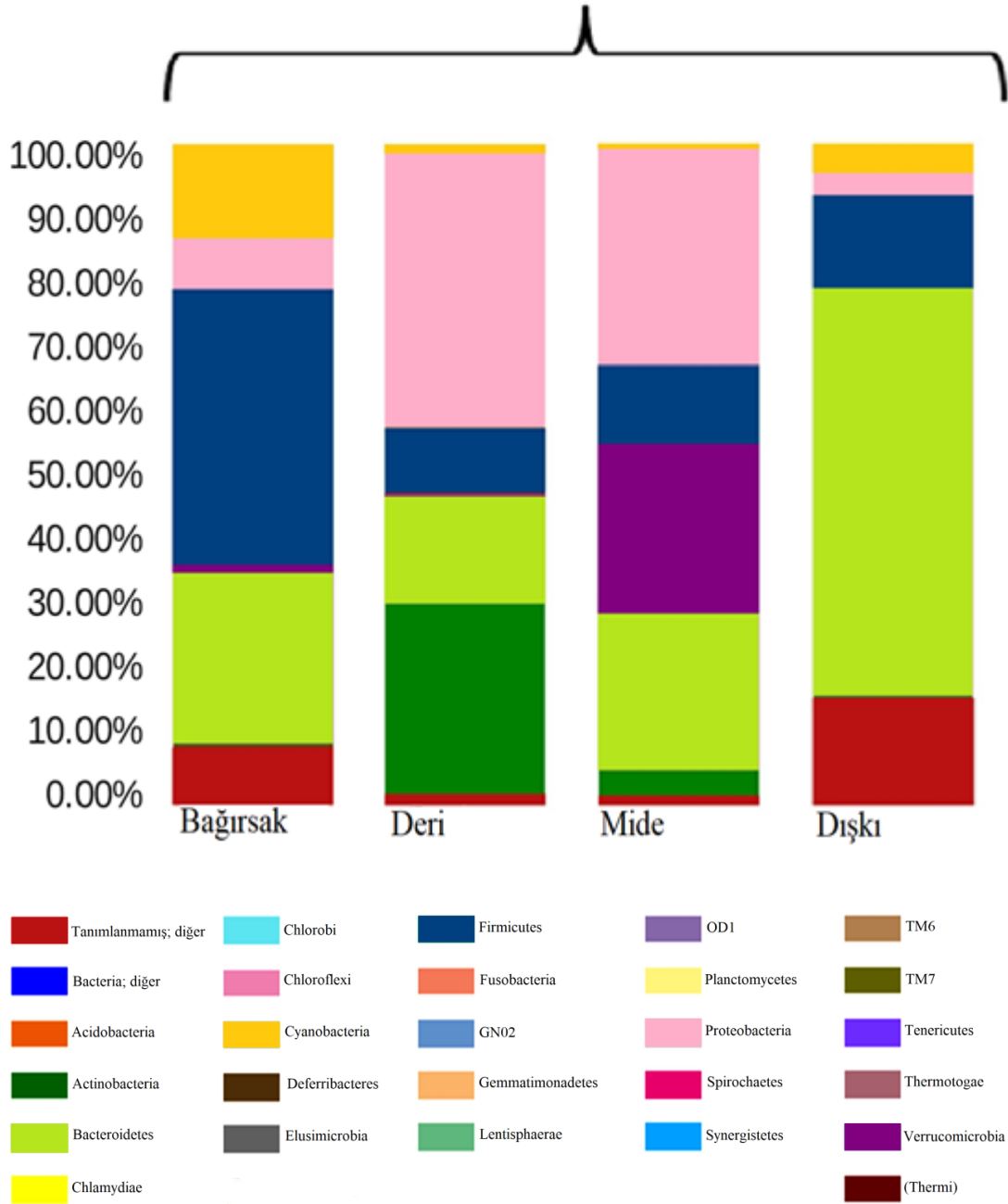
Neotenik ve metamorfik aksolotta en çok görülen filumlar; *Firmicutes* (%33.0), *Bacteroidetes* (%24.7), *Proteobacteria* (%18.0), *Verrucomicrobia* (%5.9), *Cyanobacteria* (%5.5) ve *Actinobacteria* (%4.5)'dir. Sıralanamamış sekanslar toplam sekansın %8'ini oluşturmaktadır ve 19 filumu temsil etmektedir. Bu da mikrobiyal toplulukların ~%1'ini oluşturmaktadır (Şekil.6.2.1., Şekil.6.2.2. ve Şekil 6.2.3.). Örneklerde en çok görülen iki filum; neotenik derisi için *Firmicutes* (% 63.2) ve *Bacteroidetes* (% 10.1), neotenik mide örneği için *Proteobacteria* (48.4%) ve *Firmicutes* (17.9%), neotenik bağırsak örneği için *Firmicutes* (77.2%) ve *Verrucomicrobia* (8.6%), neotenik fekal maddesi için ise *Bacteroidetes* (47.7%) ve *Firmicutes* (26.8%)'tir. Metamorfik derisi için *Proteobacteria* (41.4%) ve *Actinobacteria* (28.9%), metamorfik midesi için *Proteobacteria* (32.3%) ve *Cyanobacteria* (25.9%), metamorfik bağırsak örneği için *Firmicutes* (41.3%) ve *Bacteroidetes* (26.2%) ve metamorfik fekal maddesi için ise *Bacteroidetes* (61.7%) ve *Firmicutes* (14.1%)'tir. Bu analizler bize metamorfoz öncesinde ve sonrasında bakteriyel toplulukların değiştiğini, organlar arasında da mikrobiyal topluluk farkı olduğunu göstermektedir (Şekil.6.2.1., Şekil 6.2.2. ve Şekil 6.2.3.).

Neotenik Hayvan Örnekleri

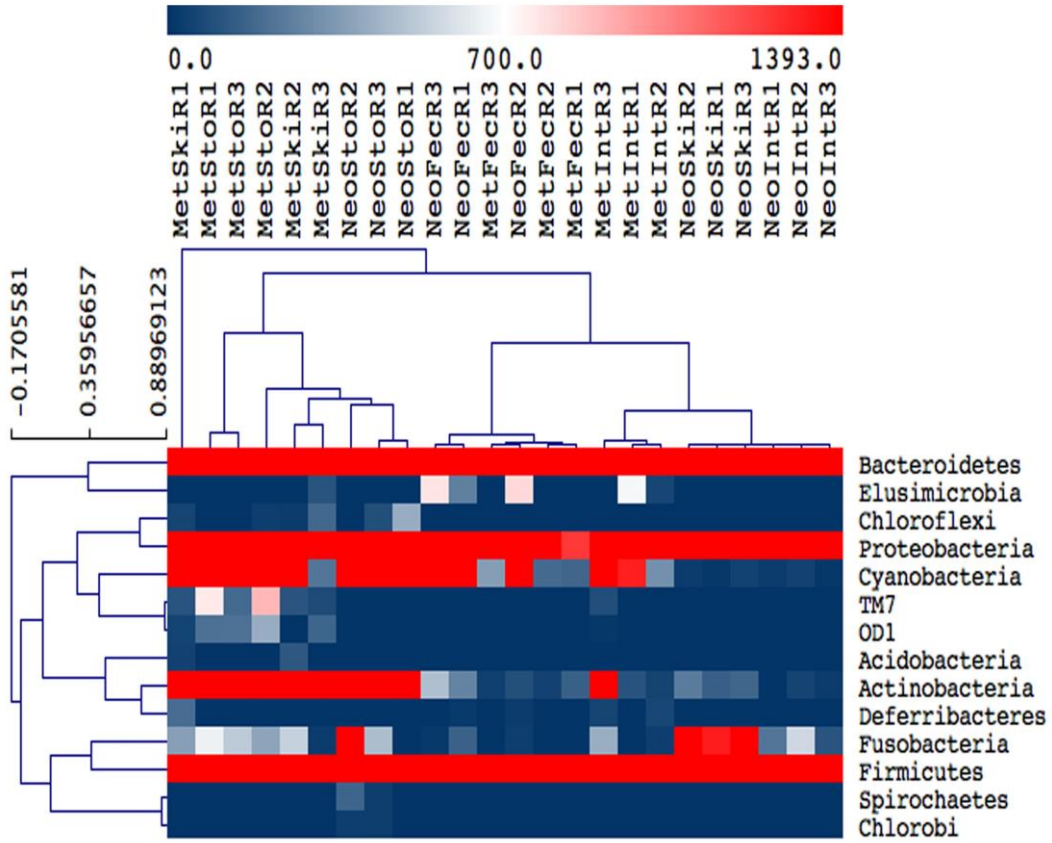


Şekil.6.2.1.Neotenik Aksotl bağırsak, deri, mide ve dışkı örneklerinde filum düzeyinde mikrobiyal çeşitlilik.

Metamorfik Hayvan Örnekleri

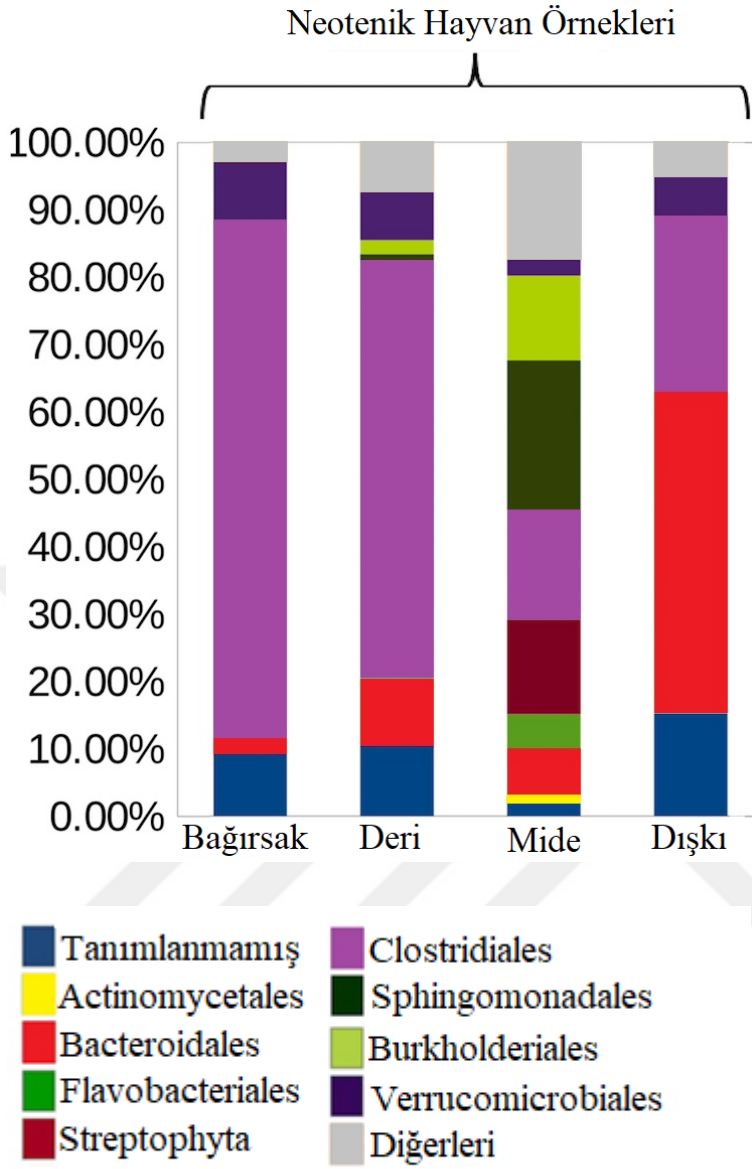


Şekil.6.2.2. Metamorfik Aksolotl bağırsak, deri, mide ve dışkı örneklerinde filum düzeyinde mikrobiyal çeşitlilik.

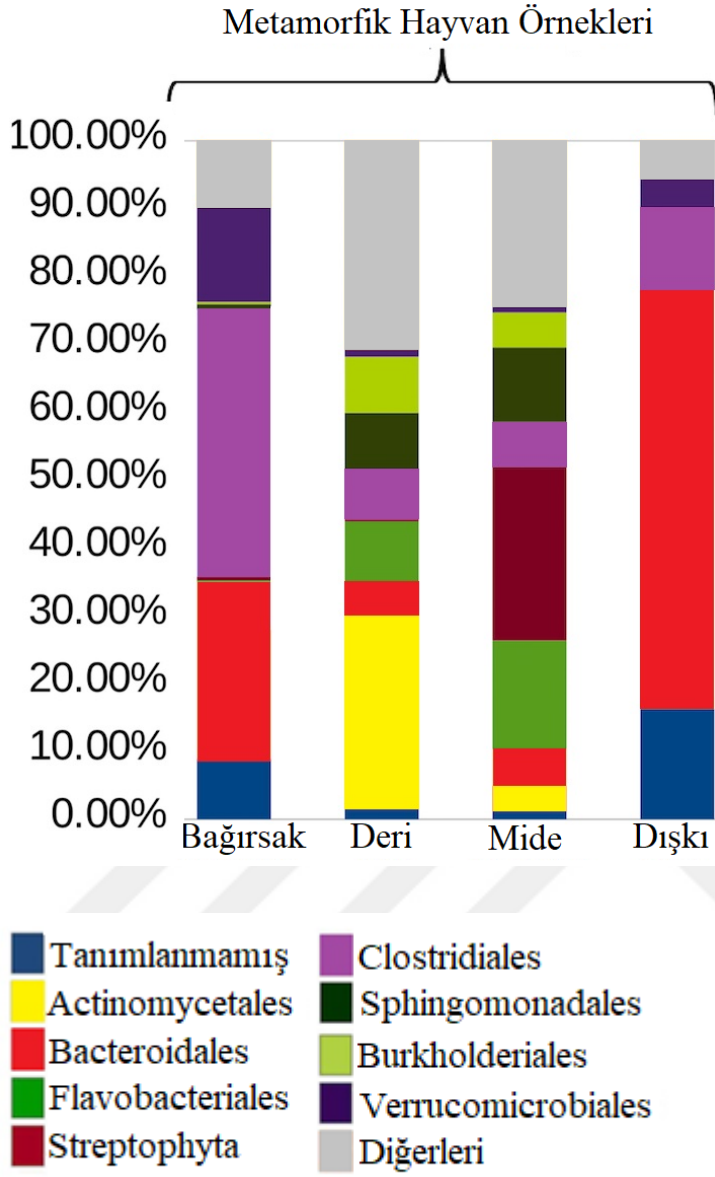


Şekil.6.2.3.Neotenic ve metamorfik Aksolotl'da biyolojik replikaların filum düzeyinde ısı haritası.

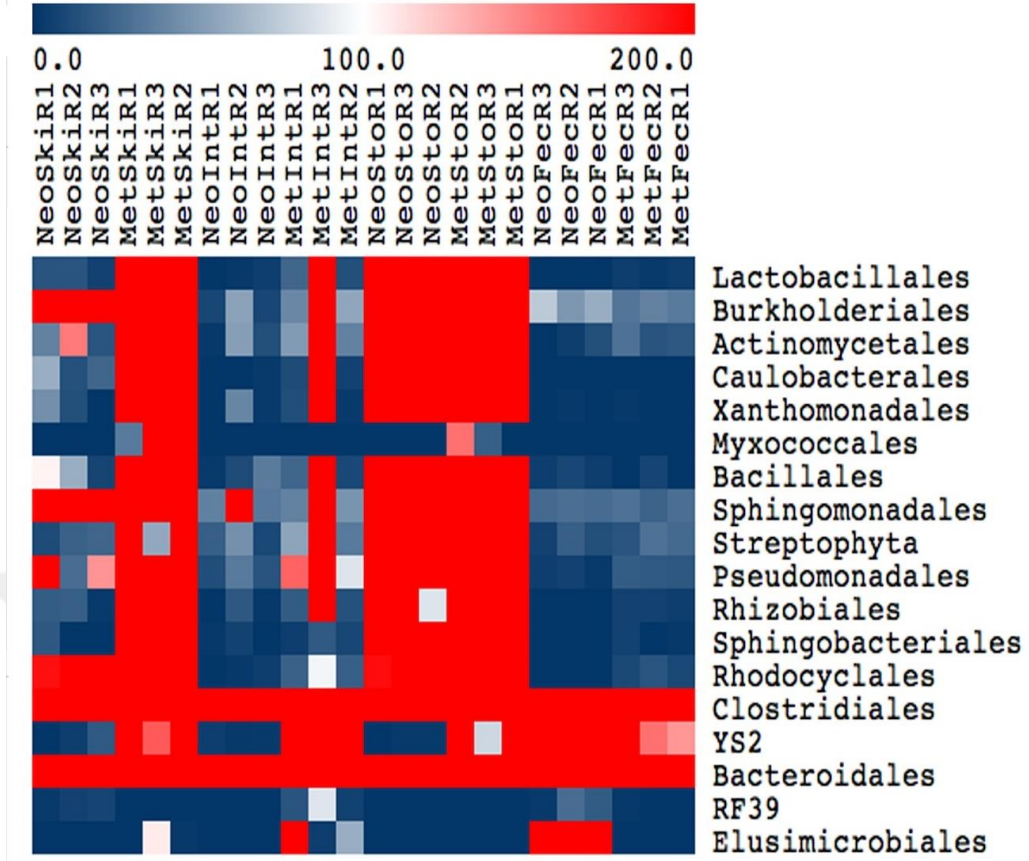
Sınıf düzeyinde ise en hakim mikrobiyal topluluklar *Clostridia* (31,6%), *Bacteroidia* (20,1%), *Alphaproteobacteria* (9,6%), *Betaproteobacteria* (5,5%) ve *Verrucomicrobiae* (5,5%)'dır (Şekil.6.2.4. ve Şekil.6.2.5.). Bu sınıflardan 59 tanesi için yapılan analizde $p < 0.01$ değeri elde edilmiştir (Şekil.6.2.6.). *Bacteroidia* sınıfı, diğer sınıflara göre metamorfik bağırsak ve dışkısında ve neotenic dışkısında daha fazla oranda bulunmuştur. *Clostridia* sınıfı, neotenic deri ve bağırsak örneklerinde ve metamorfik bağırsağında daha yüksek oranda bulunmuştur. *Flavobacteria* sınıfının varlığı önemli derecede değişmiştir; metamorfik deri ve midesinde daha yoğun gözlenmiştir. *Alphaproteobacteria* sınıfı ise neotenic midesinde, metamorfik mide ve derisinde daha fazla gözlenmiştir.



Şekil.6.2.4. Neotenik Aksolotl bağırsak, deri, mide ve dışkı örneklerinde sınıf düzeyinde mikrobiyal çeşitlilik.

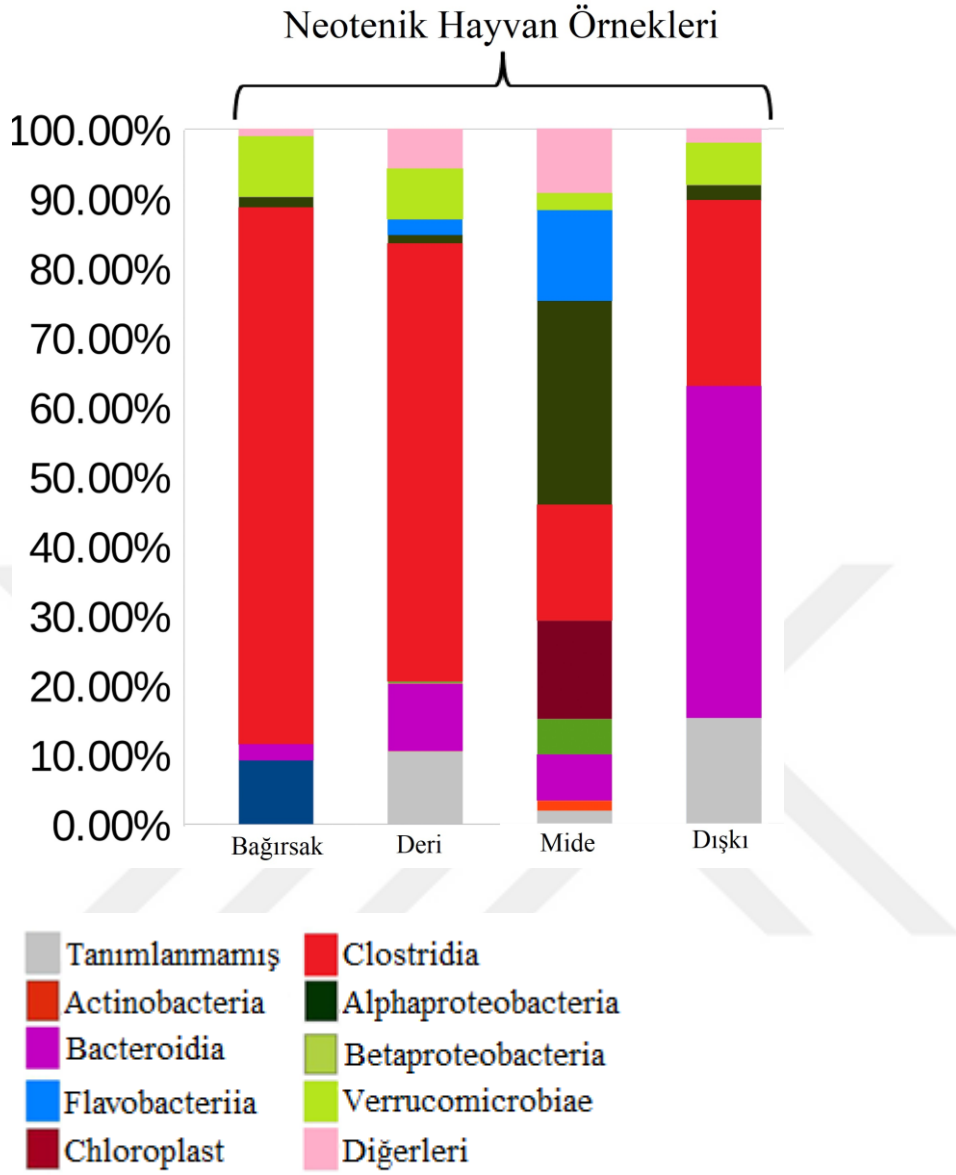


Şekil.6.2.5. Metamorfik Aksolotl bağırsak, deri, mide ve dışkı örneklerinde sınıf düzeyinde mikrobiyal çeşitlilik.

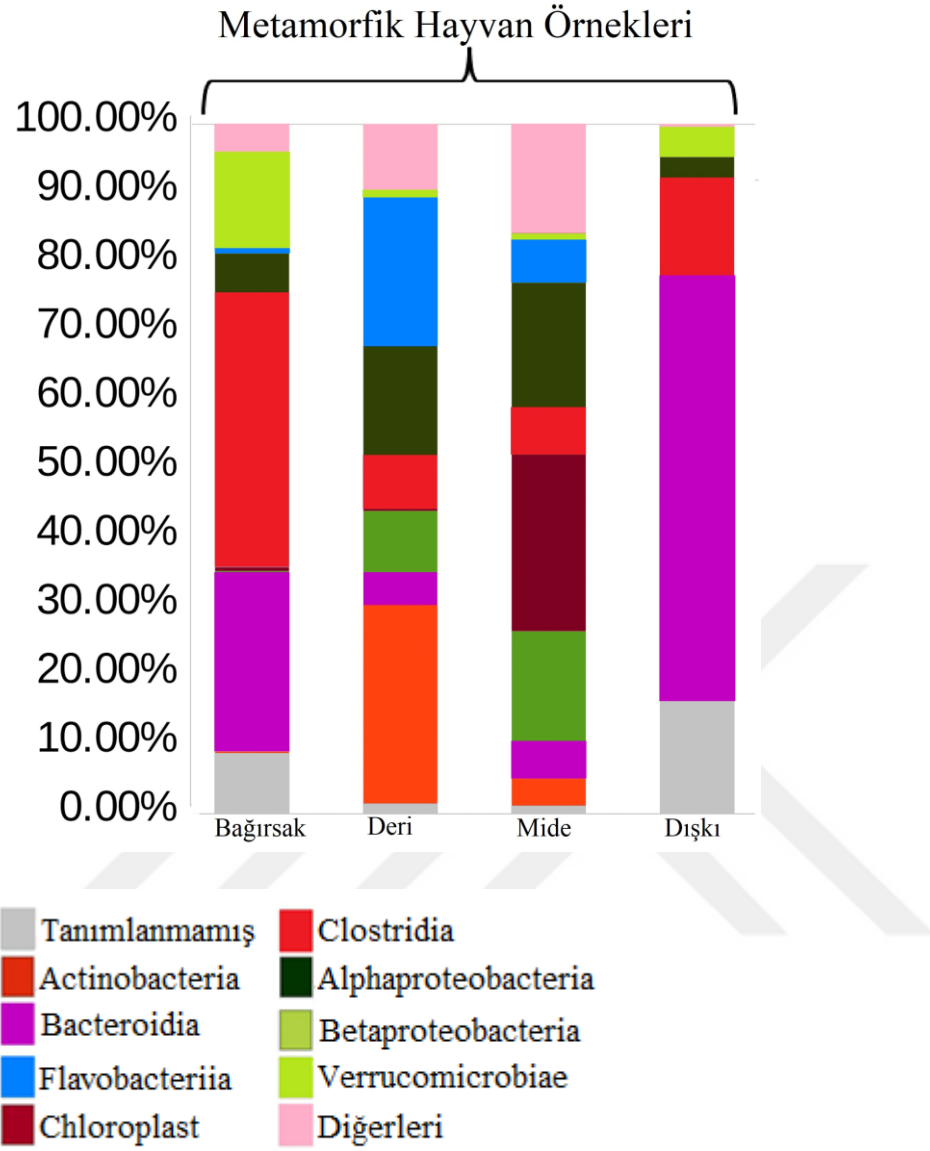


Şekil.6.2.6.Neotetik ve metamorfik Aksolotl'da biyolojik replikaların sınıf düzeyinde ısı haritası.

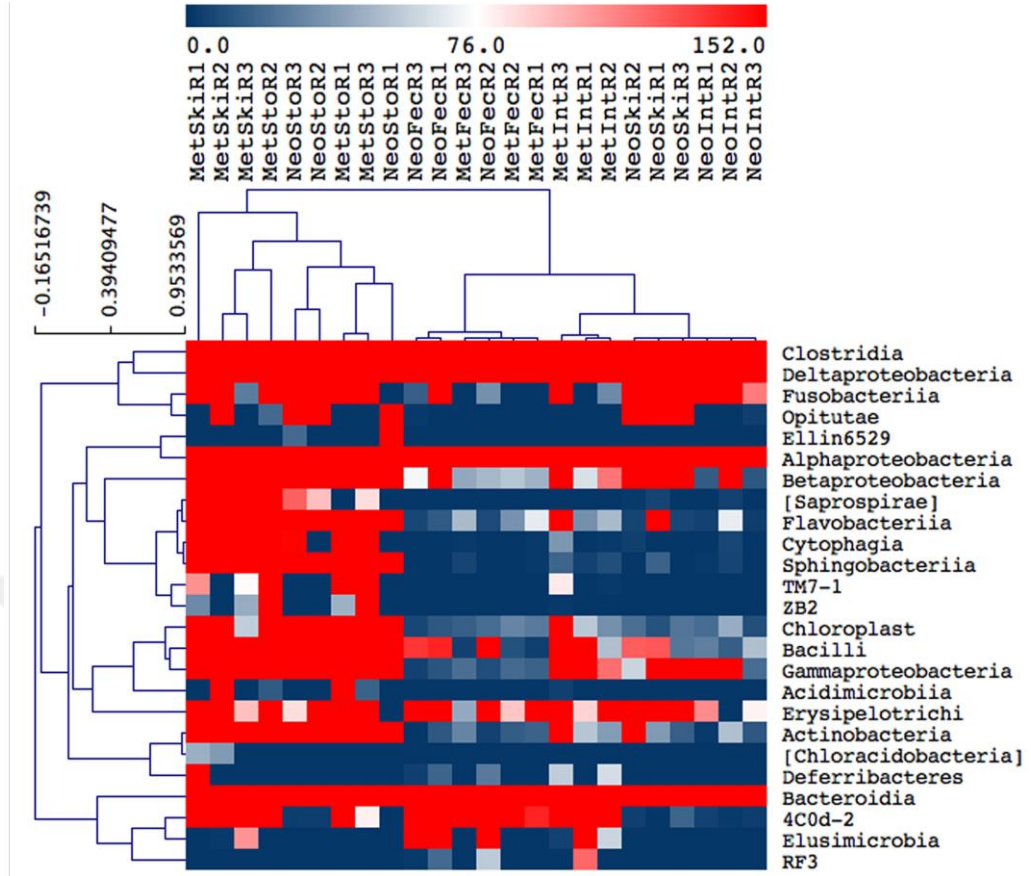
Neotenic ve metamorfik örneklerdeki mikrobiyal çeşitliliğin OTU analizi takım seviyesinde yapılmış ve 88 takım belirlenmiştir. *Clostridiales* (31,0%), *Bacteroidales* (20,1%), *Verrucomicrobiales* (5,5%) ve *Sphingomonadales* (5,4%) sadece takım seviyesinde mevcut olduğu gözlenmiştir (Şekil.6.2.7. ve Şekil.6.2.8.). Parametrik olmayan Kruskal Wallis istatistiksel testi uygulanarak örnekler arasında önemli değişiklikler gösteren 18 takım belirlenmiştir ($p < 0.01$) ve buna bağlı OTU çeşitliliği ısı haritasıyla gösterilmiştir (Şekil.6.2.9.). Önemli ölçüde değişen takımlar arasında, neotenic fekal ve metamorfik fekal örneklerinin sahip olduğu çeşitlilik benzemekte olduğu gözlenmiştir. Aynı benzerlik neotenic mide ile metamorfik mide örnekleri arasında da gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, neotenic deri ile metamorfik deri ve neotenic mide ile metamorfik mide örnekleri arasındaki takımların karşılaştırılmasında, metamorfik örneklerde takımların neoteniclere göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir.



Şekil.6.2.7. Neotenik Aksolotl bağırsak, deri, mide ve dışkı örneklerinde takım düzeyinde mikrobiyal çeşitlilik.



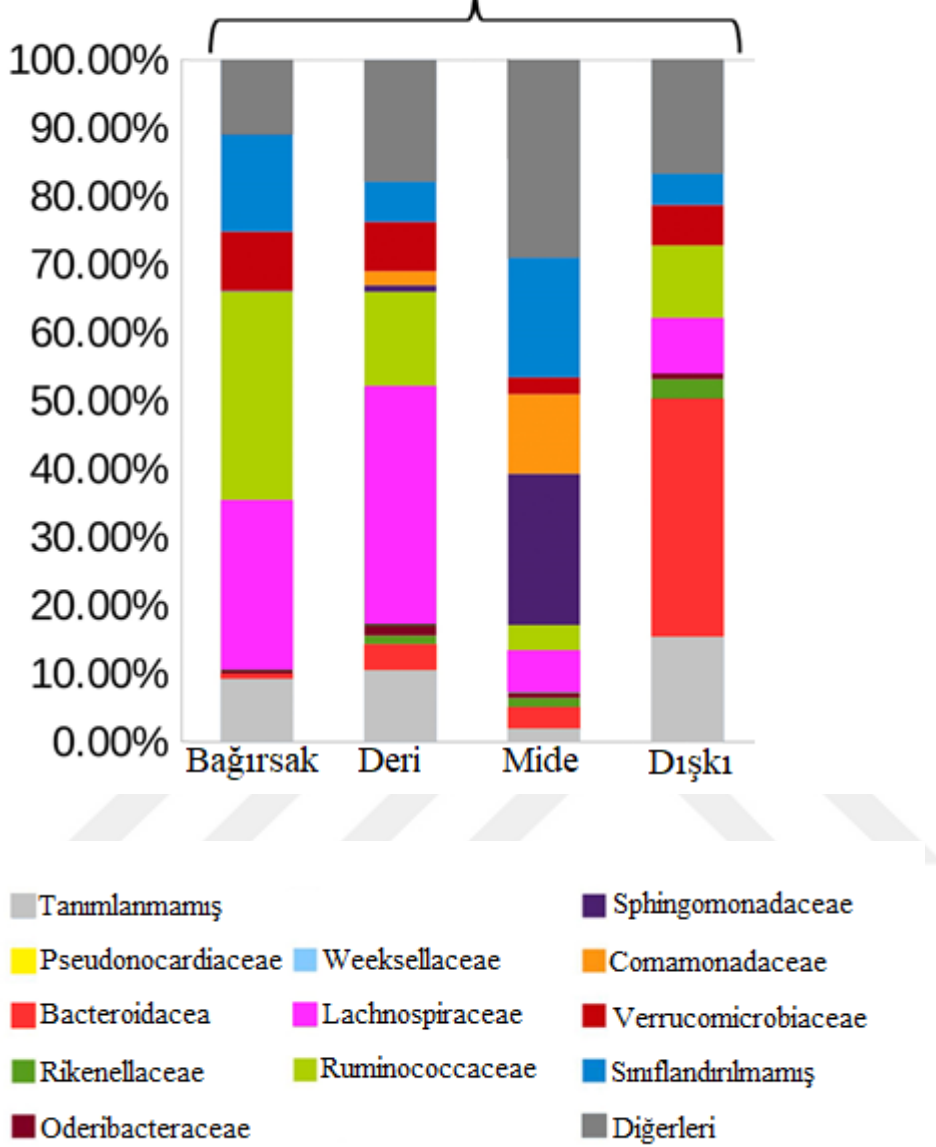
Şekil.6.2.8. Metamorfik Aksolotl bağırsak, deri, mide ve dışkı örneklerinde takım düzeyinde mikrobiyal çeşitlilik.



Şekil.6.2.9.Neotenic ve metamorfik Aksolotl'da biyolojik replikaların takım düzeyinde ısı haritası.

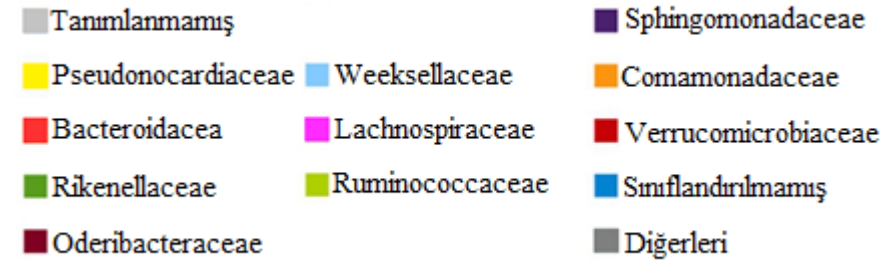
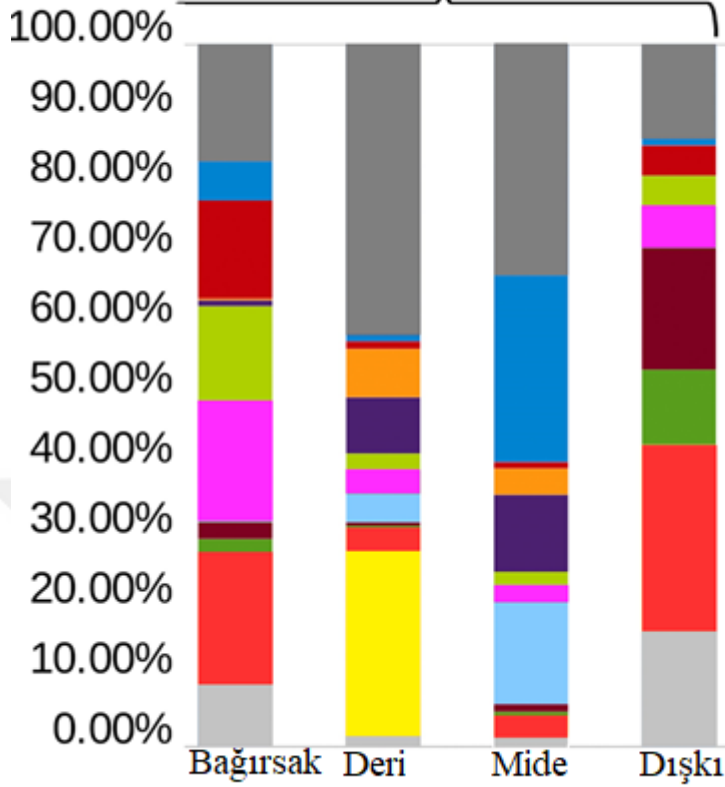
Aile seviyesinde yapılan incelemelerde ise *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Sphingomonadaceae* ve *Verrucomicrobiaceae*, metamorfik ve neotenic örneklerde yüksek oranda görülen ailelerdir. (Şekil.6.9.10. ve Şekil.6.9.11.). Örnekler arasında önemli farklılık gösteren ($p < 0.01$) 32 familya bulunmuştur ve bir ısı haritasında gösterilmiştir (Şekil.6.9.12.). Örnekler arasında en önemli çeşitliliği *Pseudomonadaceae*, *Rhodocyclaceae*, *Caulobacteraceae* ve *Weeksellaceae* sergilemiştir.

Neotenik Hayvan Örnekleri

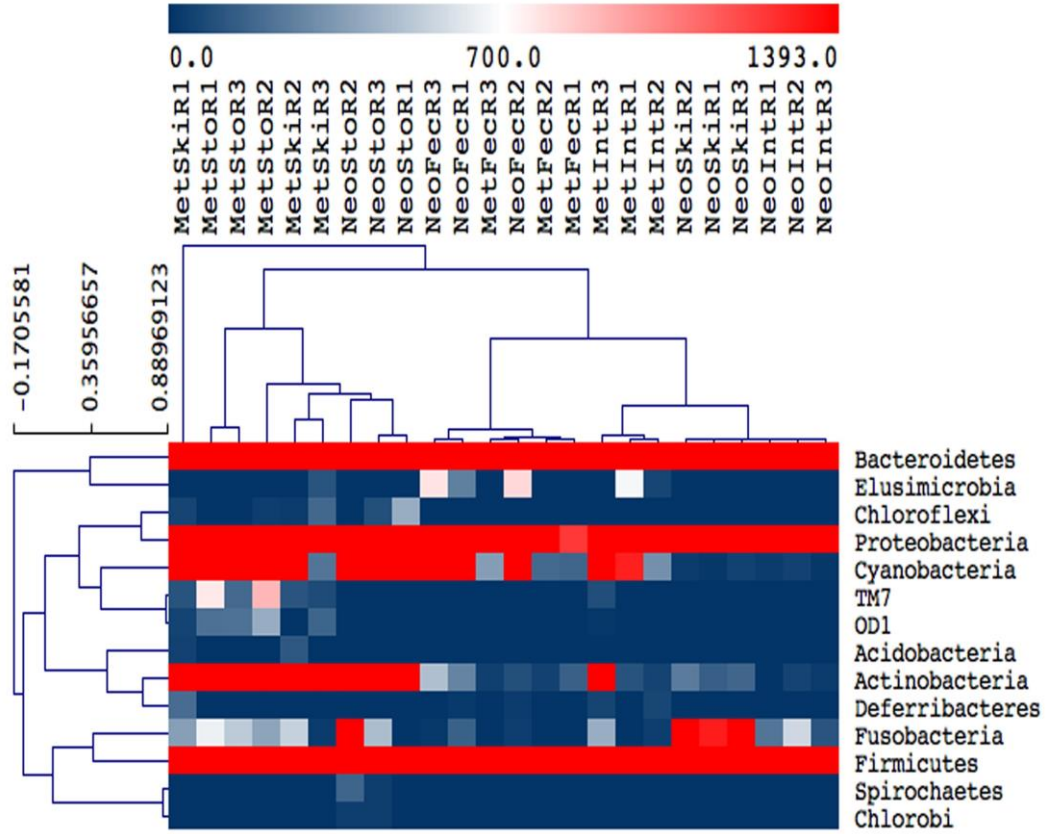


Şekil.6.2.10. Neotenik Aksolotl bağırsak, deri, mide ve dışkı örneklerinde ailesel düzeyde mikrobiyal çeşitlilik.

Metamorfik Hayvan Örnekleri



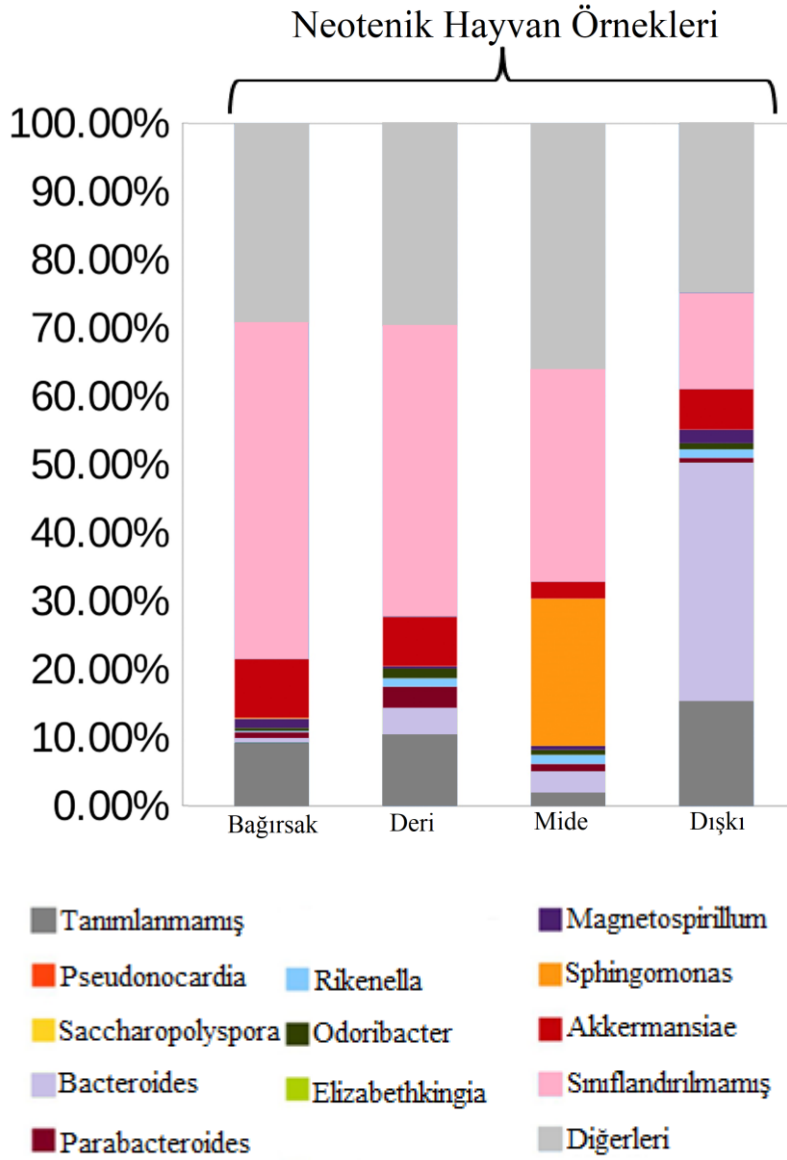
Şekil.6.2.11. Metamorfik Aksolotl bağırsak, deri, mide ve dışkı örneklerinde ailesel düzeyde mikrobiyal çeşitlilik.



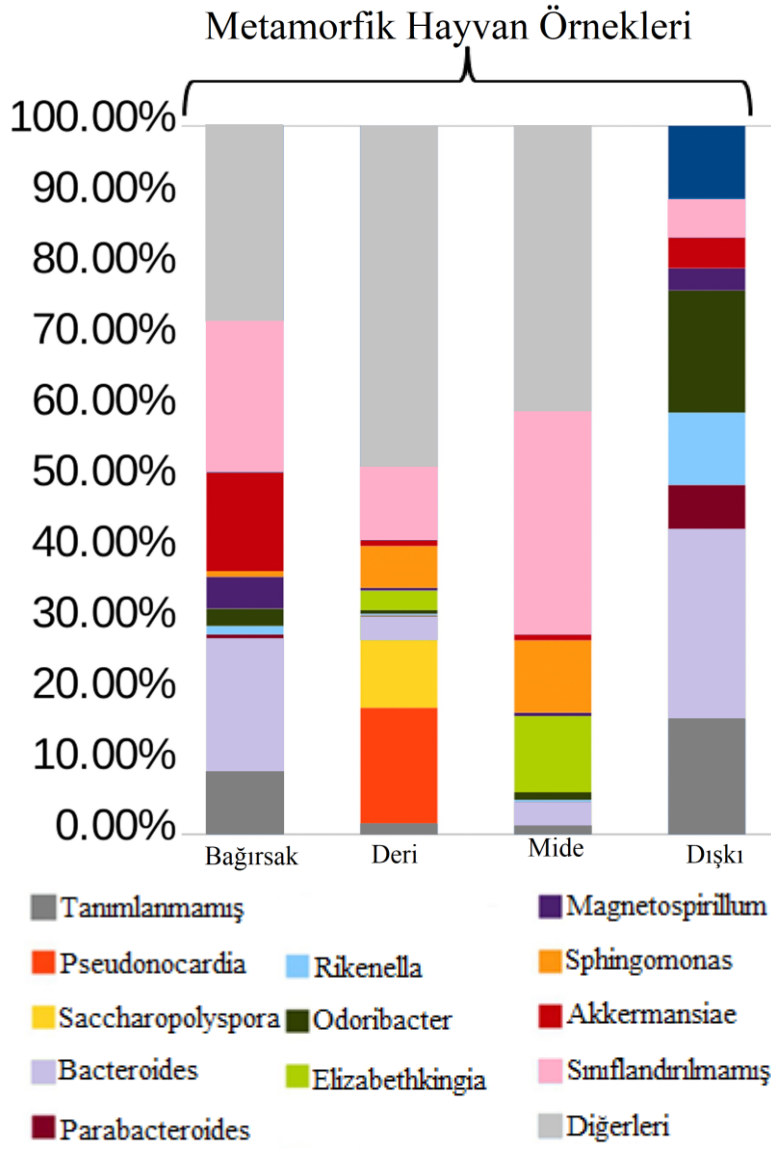
Şekil.6.2.12. Neotenic ve metamorfik Aksoholi’da biyolojik replikaların familya düzeyinde ısı haritası.

Mikrobiyal topluluk cins seviyesinde incelendiğinde ise, en yüksek oranda görülen bakteri cinsleri; *Bacteroides* (% 11,7), *Akkermansia* (% 5,4), *Sphingomonas* (% 4,8), *Lachnospiraceae* familyasının tanımlanmamış cins üyeleri (% 9,9), *Ruminococcaceae* familyasının üyeleri (% 8,6) ve Streptophyta takımının üyeleri (% 5,2) olarak gözlenmiştir (Şekil.6.2.13 ve Şekil.6.2.14). Bulunan 309 cins arasından 46’sı parametrik olmayan bir Kruskal Wallis testine göre anlamlı farklılık göstermiştir ($p < 0.01$). Gruplar içinde önemli farklılara sahip cinsler ısı haritasında gösterilmiştir (Şekil.6.2.15). Tüm gruplar için önemli derecede farklı cinsler karşılaştırıldığında, neotenic ile metamorfik dışkı örnekleri ve neotenic ile metamorfik bağırsak örneklerinin birbirlerine benzer olduğu gözlenmiştir.

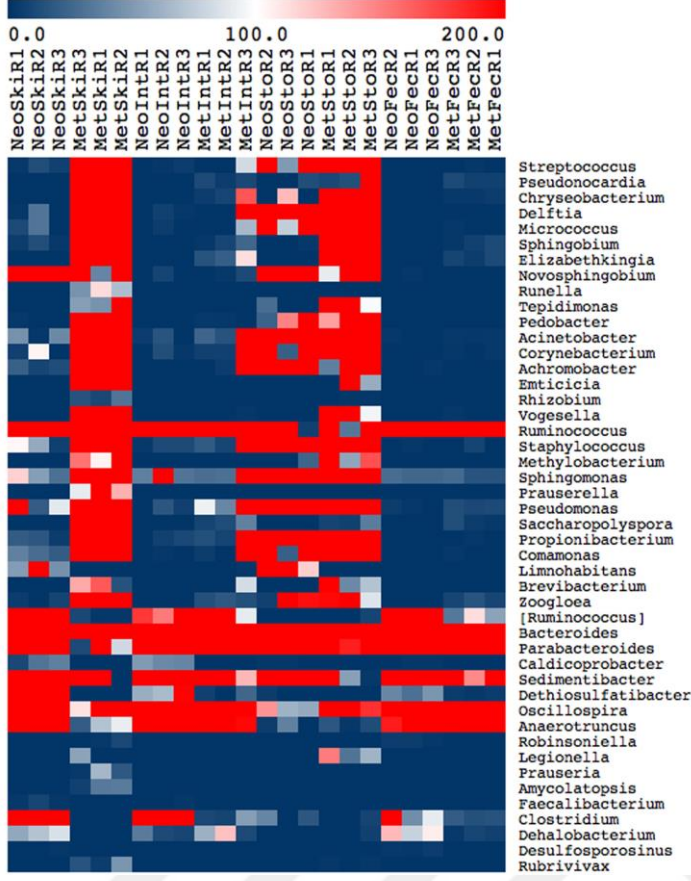
Metamorfik deri örneklerinin neotenik deri örneklerine nazaran daha çeşitli bakteri geninin eğilimi, yapılan analizin sonucu olarak gösterilmiştir. Metamorfik mide örnekleri, neotenik mide örneklerine göre daha fazla oranda cins seviyesinde bakteri topluluklarına sahip olduğu gözlenmiştir.



Şekil.6.2.13. Neotenik Aksotlolu bağırsak, deri, mide ve dışkı örneklerinde cins düzeyinde mikrobiyal çeşitlilik.



Şekil.6.2.14. Metamorfik Aksolotl bağırsak, deri, mide ve dışkı örneklerinde cins düzeyinde mikrobiyal çeşitlilik.



Şekil.6.2.15. Neotenic ve metamorfik Aksolotl'da biyolojik replikaların cins düzeyinde ısı haritası.

6.3.Bakteri Kolonilerinin Alfa Çeşitliliği

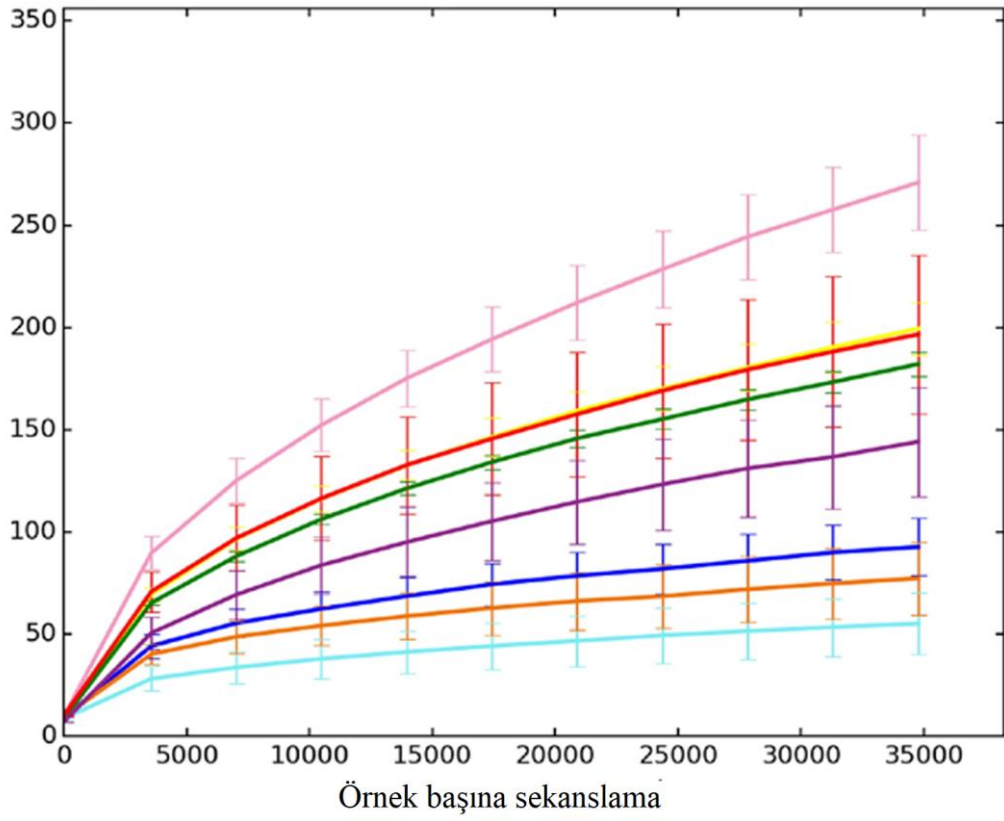
6.3.1.Alfa çeşitlilik

Örnekleme ünitelerinde mikrobik çeşitliliği değerlendirmek için kullanılmıştır. Mikrobiyal zenginlik ve çeşitliliği belirlemek ve karşılaştırmak için elverişli bir yoldur. Mikrobiyal topluluğun çeşitliliğini ölçebilmek için OTU'nun seyreltilmesi gerekmektedir. Filogenetik Çeşitliliğe (PD), OTU'ya, Chao1 ve Shannon ölçütlerine bakarak, türlerin çeşitliliği ve dağılımı hesaplanmış ve bütün bunlara göre seyreltme işlemi yapılmıştır (Şekil.6.3.1, Şekil.6.3.2, Şekil.6.3.3 ve Şekil.6.3.4). Şekillerde gösterildiği gibi, neotenik fekal örnekleri en yüksek bakteriyel çeşitliliği gösterirken, neotenik ve metamorfik mide örnekleri en az bakteriyel çeşitliliğe sahiptir.

Alfa çeşitliliği sonuçlarına göre; metamorfoz öncesi ve sonrası örnekler için mikrobiyal toplumların zenginliği ve çeşitliliğinde açık bir değişim deseni bulunmamıştır. Neotenik dışkı ve deri örnekleri metamorfik dışkı ve deri örneklerinden daha farklıdır. Öte yandan, Metamorfik bağırsak ve mide örnekleri Neotenik bağırsak ve mide örneklerine göre bakteri kompozisyonunda daha yüksek bir varyasyon göstermektedir (Şekil.6.3.1, Şekil.6.3.2, Şekil.6.3.3 ve Şekil.6.3.4).

Sonuç olarak, taksonomik çeşitlilik ve zenginlik, metamorfoz öncesi ve sonrası örnekler için ortak bir model yerine desen bağımlı özellikler sergilediğini göstermiştir.

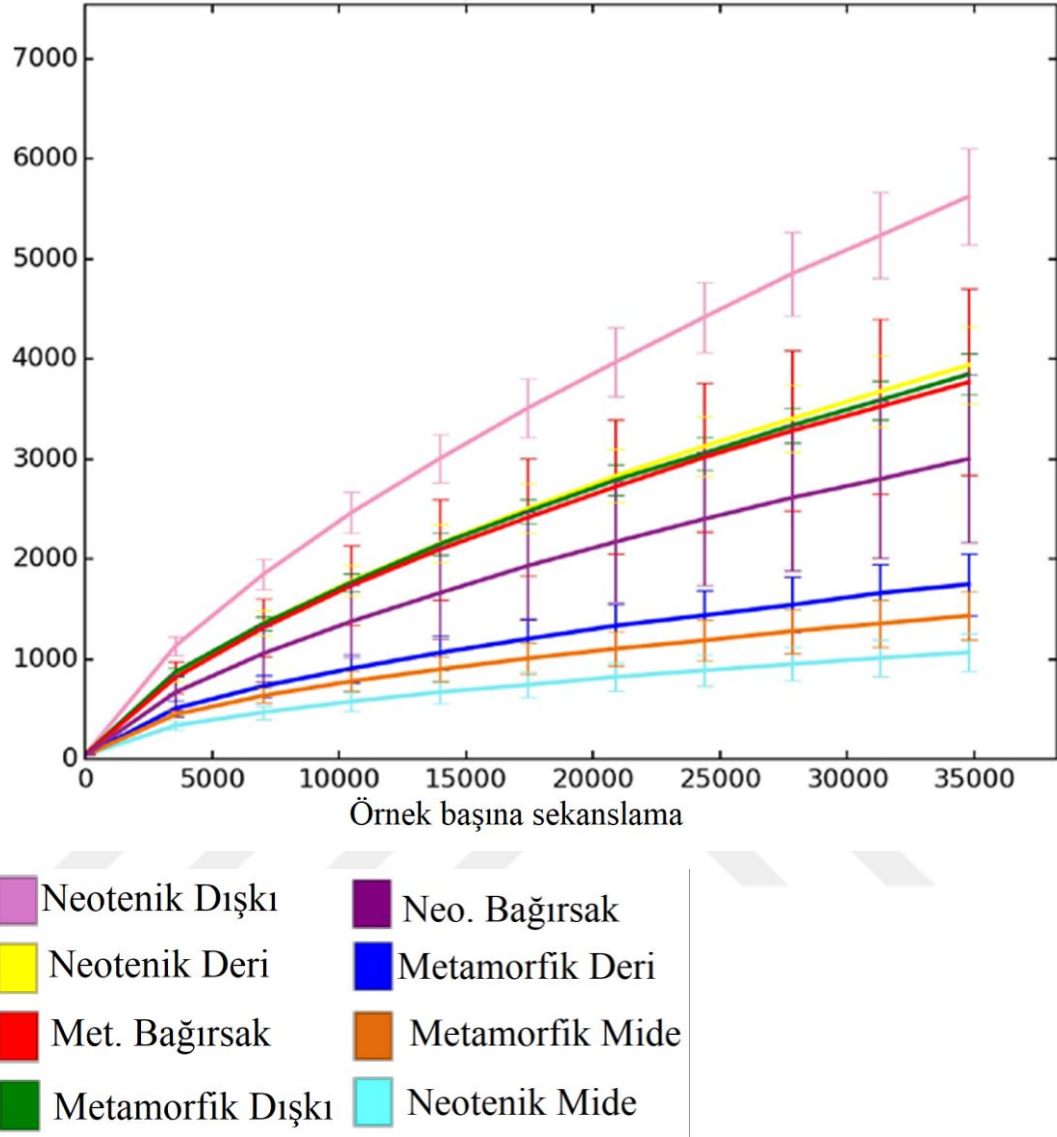
Tür Zenginliği:PD_whole_tree



- Neo. Bağırsak
- Metamorfik Deri
- Metamorfik Mide
- Neotenik Mide
- Neotenik Dışkı
- Neotenik Deri
- Met. Bağırsak
- Metamorfik Dışkı

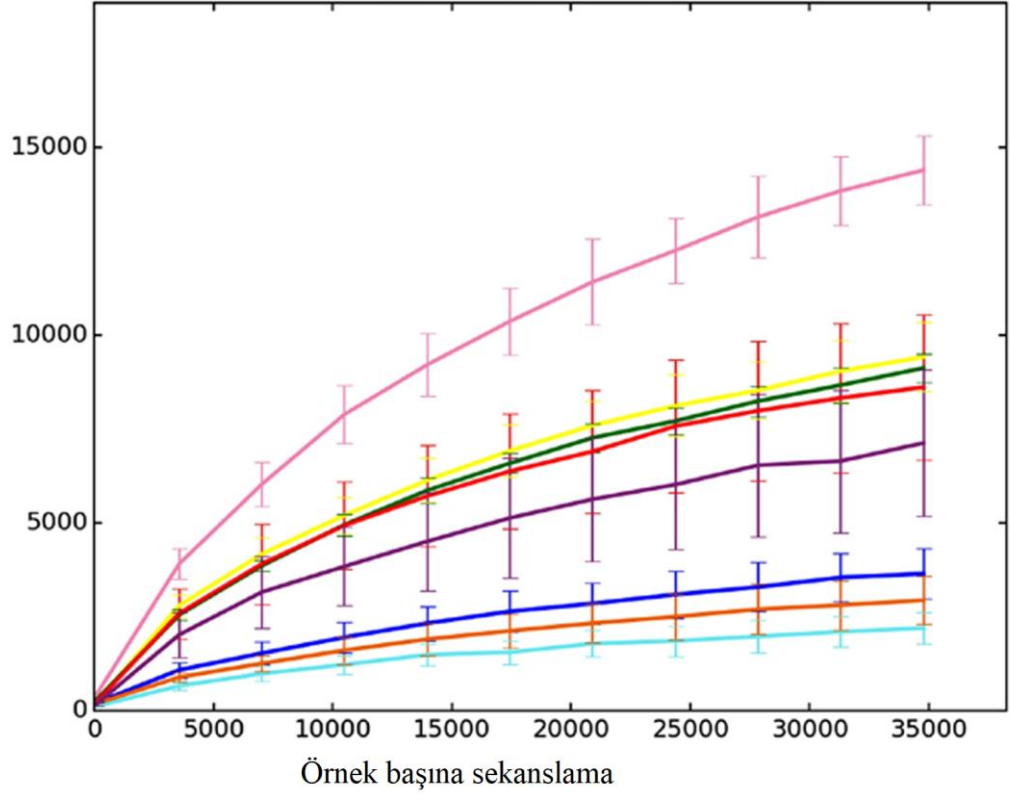
Şekil.6.3.1.1. Türlerin çeşitliliğinin ve benzerlik derecelerinin Filogenetik Çeşitlilik metriğine göre değerlendirilmesi.

Tür Zenginliği:Observed_OTUs



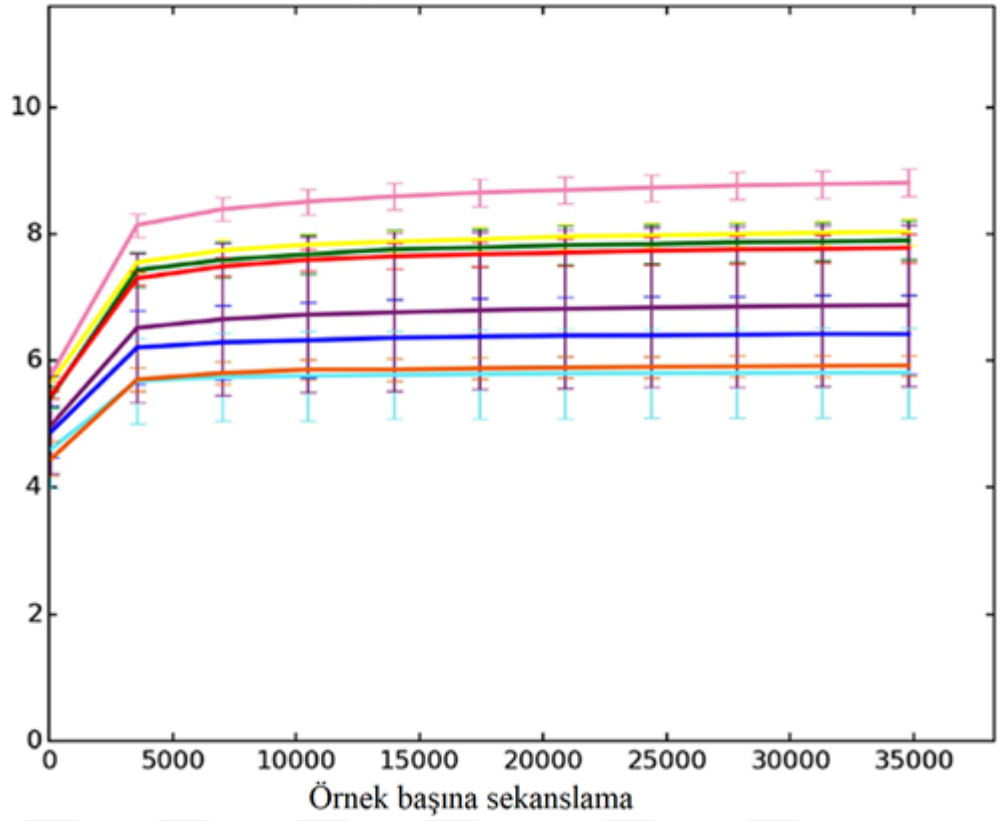
Şekil.6.3.1.2. Türlerin çeşitliliğinin ve benzerlik derecelerinin Operasyonel Taksonomik Birimler metriğine göre değerlendirilmesi.

Tür Zenginliği:Chao1



Şekil.6.3.1.3. Türlerin çeşitliliğinin ve benzerlik derecelerinin Chao1 metriğine göre değerlendirilmesi.

Tür Zenginliği:Shannon



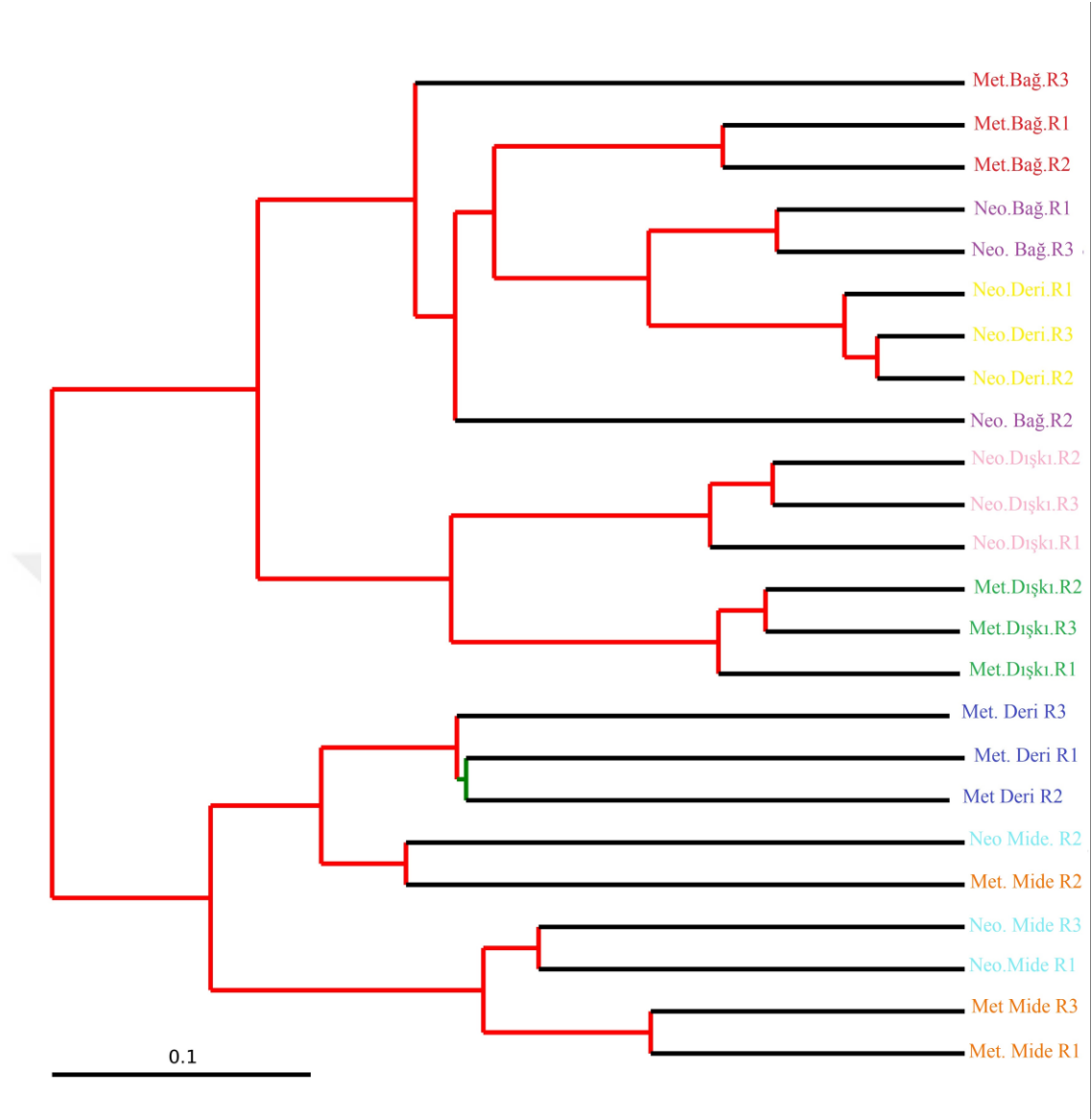
Şekil.6.3.1.4. Türlerin çeşitliliğinin ve benzerlik derecelerinin Shannon metriğine göre değerlendirilmesi.

6.3.2.Beta çeşitlilik

Aritmetik Ortalamalı Ağırlıksız Çift Grup Yöntemi (UPGMA) ile Jackknifed Hiyerarşik Kümeleme (Şekil.6.3.2.1), Ağırlıklı UniFrac Mesafeleri ile Temel Bileşen Analizi (PCA) (Şekil.6.3.2.2) ve Bray-Curtis Aralıklı Metrik Olmayan Çok Boyutlu Ölçeklendirme (NMDS) kullanılarak veri setleri Beta (β) çeşitliliği açısından karşılaştırılmıştır.

Beta çeşitliliği analizi sonuçlarına göre, deri örnekleri hariç metamorfoz öncesi ve sonrası örnekler bir araya toplanmıştır. Dendogramda görüldüğü gibi (Şekil 6.3.2.2), neotenik ve metamorfik bağırsak ve neotenik deri örnekleri aynı kümede gözlenmiştir, fekal örnekleri birlikte kümelenmiştir ve neotenik ve metamorfik mide ve metamorfik deri örnekleri aynı kladda gözlenmiştir.

Aynı veriler, neotenik ve metamorfik örnekleri ayırt etmek için ağırlıklı UniFrac uzaklığı metriğine dayanan bir PcoA plot ile gösterilmiştir (Şekil.6.3.2.2). Fekal madde örneklerinin kümelenmesi, neotenik deri ve neotenik ve metamorfik bağırsak örnekleri, metamorfik deri ve neotenik ve metamorfik mide örnekleri benzer şekilde kümelenmektedir. Tüm örnekler için, Bray-Curtis farklılıkları hesaplandı ve filogenik olmayan bir β -çeşitlilik yaklaşımı olarak NMDS ile gösterilmiştir. Neotenik deri ve bağırsak örnekleri, metamorfik deri ve bağırsak örnekleri, neotenik ve metamorfik dışkı örnekleri, neotenik ve metamorfik mide örnekleri birlikte kümelenmiştir.



Şekil.6.3.2.1. Metamorföz öncesi ve sonrası örneklerin beta çeşitlilik analizi.



Şekil.6.3.2.2. Neotenic ve metamorfik Aksozlul örneklerinde beta çeşitliliğin Weighted UniFrac Distance Metriğine dayanan bir PcoA plot ile gösterimi.

6.4. Metabolizma ve Yolaklar

16s rRNA dizileme verilerden bakteri topluluklarının olası işlevlerini tahmin etmek için Tax4Fun kullanılmıştır. İncelenen örneklerde, mikroorganizmalar tarafından potansiyel olarak üretilen proteinleri (çoğunlukla enzimler) açıklayabilmek için KEGG ortologları (KOs) kullanılmıştır. Örneklerdeki KO enzimlerinin dağılımı ve karşılaştırmalı çeşitliliği Tablo 6.4.1.'de listelenmiştir. Örnekler arasında hangi enzimlerin önemli ölçüde farklı olduğunu belirlemek için Kruskal Wallis testi yapılmıştır (p-değeri <0.05).

Neotetik deri ve neotetik bağırsak örneklerinde ağırlıklı olarak, belirleyici piruvat-flavodoksin oksidoredüktaz (K03737), uzama faktörü G (K02355) ve ATP'ye bağımlı Lon proteaz (K01338) enzimleri bulunmuştur. Neotetik ve metamorfik mide örnekleri için 3-oksoasil-redüktaz [açıl-taşıyıcı protein] (K00059), uzama faktörü G (K02355) ve dihidrolipoamid dehidrojenaz (K00382) esas olarak zenginleştirilmiş enzimlerdir. Metamorfik deri ve bağırsak örneklerinde 3-oksoasil-redüktaz [açıl-taşıyıcı protein] (K00059) ve uzama faktörü G (K02355) yüksek oranda temsil edilen enzimlerdir. Metamorfik deri için dihidrolipoamid dehidrojenaz (K00382) ve metamorfik bağırsak için ATP'ye bağımlı Lon proteaz (K01338) diğer belirgin enzimlerdir. Dışkı örneklerinde bakteri topluluklarında, ATP'ye bağlı DNA helikaz RecQ (K03654), uzama faktörü G (K02355) ve varsayılan pirüvat-flavodoksin oksidoredüktaz (K03737) enzimleri önem kazanmıştır.

Neotetik ve metamorfik örnekler arasındaki yolak farklılıklarını belirlemek adına, iki grubun enzim bolluklarını karşılaştırmak için Wilcoxon testi uygulanmıştır. Belirgin (p-değeri <0.05) olarak belirlenen enzimler KEGG yolaklarında kümelenmiştir (Tablo.6.4.1.). KEGG analizine göre, metabolik yollar, çeşitli ortamlarda mikrobiyal metabolizma, ikincil metabolitlerin biyosentezi, antibiyotiklerin biyosentezi ve karbon sabitleme yolları prokaryotlarda çevresel adaptasyon ve patojenite açısından önemli olabilecek en iyi yolaklardır.

Tablo.6.4.1.Tax4Fun'a dayanan KEGG analiziyle örneklerdeki mikroorganizmalar tarafından üretilen proteinler

KO Yolak ID	KO Yolak Adı
Ko01100	Metabolik yolak
Ko01120	Çeşitli ortamlarda mikrobiyal metabolizma
Ko01110	İkincil metabolitlerin biyosentezi
Ko01130	Antibiyotiklerin biyosentezi
Ko00720	Prokaryotlarda karbon fiksasyon yolağı
Ko01200	Karbon metabolizması
Ko00620	Pirüvat metabolizması
Ko00860	Porfirin ve klorofil metabolizması
Ko00020	Sitrat döngüsü
Ko00680	Metan metabolizması
Ko02010	ABC taşınımı
Ko00230	Pürin metabolizması
Ko00960	Trofan, piperidin ve piridin alkaloid biyosentezi
Ko00633	Nitrotoluen degradasyonu
Ko00350	Tirozin metabolizması
Ko00051	Lizin degradasyonu
Ko00626	Fruktoz ve mannoz metabolizması
Ko00400	Naftalin degradasyonu
Ko00071	Fenilalenin, tirozin ve triptofan biyosentezi
Ko00625	Yağ asidi degradasyonu
Ko00270	Kloroalkan ve kloroalken degradasyonu
Ko00740	Sistein ve metiyonin metabolizması
Ko00710	B2 vitamini metabolizması
Ko01220	Fotosentetik organizmalarda karbon fiksasyonu
Ko00920	Aromatik bileşiklerin degradasyonu
Ko01230	Sülfür metabolizması
Ko02040	Amino asit biyosentezi
Ko00010	Kamçı mekanizması
Ko00500	Glikozis / glukoneogenez
Ko00190	Oksidatif fosforilasyon

7.TARTIŞMA

Aksolotl, ömür boyu larval evrede yani neotenik formdadır ve şaşırı derecede rejenerasyon kapasitesine sahiptir. Ancak TH indüksiyonu ile tam anlamıyla metamorfoz geçirebilmektedir. Metamorfoz, dokuların yapısında ve organizasyonunda büyük farklılıklar meydana getirdiğinden, metamorfoz sırasında karasal yaşama adaptasyon için fonksiyonel modifikasyonlar gözlemlenmektedir (125). Bu nedenle, Aksolotl gelişimsel biyolojide metamorfoz öncesi ve sonrası farklılıkları karşılaştırma çalışmalarında ve rejenerasyon çalışmalarında kullanılacak güçlü bir model organizmadır. Bir organizmayı tam anlamıyla anlamak için, işlev ve davranışını da hesaba katarak konakçıya bağlı mikroorganizmaları keşfetmek ve mikroorganizmaların organizmaya katkılarını anlamak son zamanlarda önem kazanmıştır (126).

Bu çalışmada, metamorfoz öncesi ve sonrası Aksolotl'un bağırsak, mide, deri ve dışkı örneklerinde bakteri topluluklarının çeşitliliği kültür bağımsız bir yaklaşımla araştırılmıştır. Toplanan numunelerden gDNA'nın izole edilmesi, dizilim için 16s rDNA'daki değişken bölgenin amplifikasyonu ile izlenmiştir. Amplikon sıralaması, yüksek çözünürlükte bakteri çeşitliliğini elde etmek için verileri üretmemizi sağlamıştır.

Sonuçlara göre, tüm örneklerde *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria* ve *Actinobacteria* olmak üzere başlıca altı baskın filum olduğu ve bu sonucun daha önceki amfibi çalışmalarıyla uyumlu olduğu gözlenmiştir (127).

Firmicutes filumu, neotenik deri ve neotenik bağırsak örneklerinde en bol bakteri taksonudur. *Firmucutes* filumuna ek olarak, metamorfoz sonrası deri örneklerinde *Proteobakteria* ve *Aktinobakteria* önemli ölçüde zengin filumlardır. Metamorfik bağırsakta zengin olarak *Firmucutes* ve *Bacteroidetes* bulunmuştur. Neotenik Aksolotllar derin suda yaşayan sucül hayvanlardır ve sudaki sınırlı oksijen seviyesi, anaerobik bakterilerin büyümesi için uygun bir ortam sağlamaktadır. *Firmicutes* filumunun üyeleri tipik olarak anaerob olduğundan, neotenik deri ve bağırsak örneklerinde zengin olarak bulunması, abiyotik çevre koşullarıyla ilişkili

olabileceğini düşündürmüştür. Metamorfik deri örneklerindeki bakteriyel kompozisyon, üyeleri çoğunlukla aerob olan *Proteobakterilerden* oluşmuştur. Metamorfik deri örneklerinde bir diğer önemli filum olarak *Actinobacteria* gözlenmiştir.

Daha önce yayınlanan farklı çalışmalarda amfibilerin deri ve bağırsak mikroorganizmasının bakteriyel kompozisyonu üzerinde çeşitli sonuçlar bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda, amfibi derisinin ve bağırsağının mikrobiyal çeşitliliği ile ilgili olarak iribaş ve yetişkin aşamaların birbiri ile karşılaştırılmasında, *Firmicutes*'ten *Proteobacteria*'ya önemli bir kayma gözlenmiştir (128). Bu çalışmada kurbağa larvalarında, yetişkin kurbağa derisi ve bağırsağında en çok görülen takson olan *Proteobacteria* takson üyelerinin ve *Firmicutes* filumunun büyümesi ve birikimi için uygun bir ortam sağlamıştır. Bununla birlikte, yetişkin kurbağalar derisi üzerinde bol miktarda *Proteobacteria*'nın bulunduğu çok sayıda başka çalışma bulunmaktadır (129).

Verilerimiz ile ilgili olarak, deri örnekleri için metamorfoz sonrasında *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* ve *Actinobacteria* miktarında kayda değer bir artış gözlenmiştir. Bulgularımıza paralel olarak, *Firmicutes*'in su ortamında hakimiyet sergilediği ve karasal memeli derisi ve bağırsağının ise yüksek oranda *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* ve *Actinobacteria*'ya sahip olduğu bir çok çalışma bulunmaktadır (127, 130). Bu tartışmalı gözlemler için birkaç yorum yapılacak olursa; her şeyden önce, çeşitli ortamlarda örneklenmiş hayvanlar, coğrafi bölgenin etkisiyle yönlendirilen mikrobik varyasyon göstermiştir. Üstelik bakteriler örneklerin her bir yerine -özellikle deride- eşit dağılım göstermediğinden, örneğin alındığı yer mikrobiyal veri üretmek için kritik bir öneme sahiptir. Memeli derisi ile ilgili araştırmalarda, derinin nemli ve kuru bölümünün birbirinden farklı bakteri topluluklarınca zengin olduğu belirtilmiştir (131).

Verilerimizde görüldüğü üzere, kuru deride *Proteobacteria* yüksek oranda bulunmaktadır(132). Buna ek olarak, amfibi çalışmalarının çoğunda, farklı yaşam aşamaları veya çevresel koşullar arasındaki mikrobiyal kompozisyonu karşılaştırmak için sadece genel bağırsak örnekleri kullanılmaktadır. Ancak bu çalışmada mide ve bağırsaktaki mikrobiyal çeşitliliğe ayrı ayrı odaklanılmıştır. Bu yaklaşım, birer birer

inceleyerek bakteri taksonunun çeşitliliğini ve zenginliğini tanımlamak için daha iyi sonuçlar elde etmeye yardımcı olabilir, ancak diğer yandan önceki çalışmalarla kıyaslandığında elde edilen kısmen çelişkili sonuçlara da sebep olmuş olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, iribaş ve yetişkin kurbağa arasındaki bakteriyel kompozisyonun karşılaştırılması, iki adet ilgili ama yine de farklı süreçleri kapsamaktadır; gelişim ve metamorfoz. Larval ve yetişkin dönemler ile metamorfoz öncesi ve sonrası evreler için mikrobiyal farklılıklar, kurbağalardaki toplam mikrobiyal kompozisyon değişikliklerine katkıda bulunmaktadır. Ancak, bu çalışmada hem neotenik hem de metamorfik hayvanlar yetişkindi bu nedenle sadece metamorfozun mikrobiyal çeşitlilik üzerine etkisi tarafımızdan incelenmiştir.

Bu çalışmada Aksolotl örnekleri arasında, neotenik fekal en yüksek alfa çeşitliliğine, neotenik mide ise en düşük alfa çeşitliliğine sahiptir. Mide, mikrobiyal büyüme için en sert koşullara sahiptir ve bu sıkı çevrenin adaptasyona uğraması, çeşitli bakteriyel toplulukların büyümesi ve birikimi için kısıtlayıcı faktör olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, mide örneklerinin metamorfoz öncesi ve sonrasında en düşük mikrobiyal zenginlik ve çeşitliliğe sahip olduğu gözlenmiştir.

Fekal maddenin en yüksek alfa çeşitliliğine sahip olması ise, besinlerin alındıktan sonra, vücuttan dışarı atılana dek birçok farklı ortamdan geçtiği için mikrobiyal çeşitlilik açısından zengin olmasıyla açıklanabilmektedir. Bakteri çeşitliliği kavramının evre yerine örneğe göre değişken olduğu varsayılmıştır.

Beta çeşitliliği analizlerine dayanarak, metamorfik fekal örneklerinin bağırsak ve mide örnekleri gibi bir araya toplandığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, neotenik ve metamorfik deri örnekleri arasındaki bakteri kompozisyonundaki farklılıklar, onların bir arada kümelenmesini engellemektedir. “ağırlıklı Unifrac metodu” sonuçlarına göre; neotenik deri örnekleri, bağırsak örnekleri ile kümelenmiştir. Metamorfik deri örnekleri ise mide örnekleri ile kümelenmiştir. Bray-curtis Benzerlik Analizi’ne göre; neotenik deri ve bağırsak örnekleri ile metamorfik deri ve bağırsak örnekleri birbirlerine yakın mikrobiyal çeşitlilik göstermektedir. Her iki beta çeşitlilik yaklaşımı bu bulguların paylaşılan bağırsak ve deri bakteriyel topluluklarının OTU’larına delil sağlamaktadır. Önceki çalışmalarda; bağırsak mikrobiyotasının deri mikrobiyotası üzerinde bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir

(133). Dolayısıyla, bu verilere göre deri örneklerinin bağırsak örnekleriyle kümelenmesi, deri ve bağırsak örnekleri arasındaki mikrobiyal bağlantıdan dolayı olabileceği gözlenmiştir.

Tax4fun tanımlanan bakteriyel toplulukların, her bir örnek için olası işlevlerini tahmin edebilmek için kullanılmıştır. Tüm örneklerin OTU'larının tahmini işlevsel açıklamaları, tahmin analizinde örnekler arasında önemli ölçüde farklı zenginlikteki enzimleri ön görmek için kullanılmıştır. Aksolotl örneklerinde önemli ölçüde değişmiş enzimler olarak; Lon proteaz gibi ATP'ye bağlı hücre dışı ve metabolik süreçlerle ilişkili enzimler (134), anormal veya hasar gören polipeptitler 3-oksoasil-redüktazın (açıl taşıyıcı protein) bozunduğu hücreye ait homeostaz fonksiyonu olan enzim ve yağ asidi biyosentezi ve protein translasyonunda rol oynayan uzama faktörü g'ye katılan enzimler (135) tanımlanmaktadır. Mikrobiyota ve bulunduğu konak canlı arasındaki güçlü ilişki göz önüne alındığında, konağın metabolik aktivitesi, besin maddesi devir hızı ve enerji metabolizması mikrobiyal bileşimi etkilemektedir ve ondan etkilenmektedir. Farklı örnekler arasında değişen enzim zenginliğine, bakıldığında mikrobiyal yolların konakçı homeostazına katkıda bulunmak için düzenlendiği düşünülmektedir. Bu enzimler, neotenik ve metamorfik örneklerdeki enzim profilleri arasındaki farklılıkları yorumlamak için KEGG yolları içerisine kümelenmiştir. Başlıca zenginleştirilmiş yollar; metabolik yollar, çeşitli ortamlardaki mikrobiyal metabolizma, sekonder metabolitlerin biyosentezi, antibiyotiklerin biyosentezi, prokaryotlarda karbon fiksasyon yolları, karbon metabolizması, piruvat metabolizması, porfirin ve klorofil metabolizması ve Sitrat döngüsü (TCA döngüsü) olarak bulunmuştur. Bu yollar, hücrel homeostazı koruyarak, enerji metabolizmasını ve konakçı bağışıklığını modüle ederek yeni koşullara adaptasyonda önem arz etmektedir. OTU düzeyinde, metabolizma ile ilişkili OTU'lar ağırlıklı olarak *Lachnospiraceae* ve *Ruminococcaceae* aileleriyle açıklanmaktadır.

İnsanlarda, bütirik asit sentezine bağlı olarak (136), *Lachnospiraceae* familyasının üyelerinin zengin oluşu obezite ile ilişkilendirilmiştir (137). *Lachnospiraceae* ve *Ruminococcaceae* familyalarının üyeleri, neotenik bağırsak ve mide örneklerinde bol miktarda bulunmaktadır ve neotenik Aksolotl'da yağ ile

ilişkili daha yavaş bir metabolizma, bu bakteri kolonileri için uygun bir biyota sağlayabileceği düşünölmektedir. Bu ailelerden gelen mikrobiyal kolonilerin, yavaş bir konak metabolizmasına neden olduğu tahmin edilmektedir.



8.SONUÇ

Son zamanlarda, konakçı ilişkili mikroorganizmalar, konakçı metabolizması, gelişimi ve homeostazı üzerindeki mikrobiyal toplulukların gösterilen ve tahmin edilen etkisinden dolayı konakçının metabolik, hücresel ve sistemik süreçlerini kapsamlı bir şekilde aydınlatmak amacıyla giderek daha fazla ilgi görmektedir. Bu çalışma ile Neotenik ve Metamorfik Aksolotl'un deri, bağırsak, mide ve dışkı örnekleri için mikrobiyal toplulukların çeşitliliği ve zenginliği belirlenmiştir. Metamorfoz boyunca organların yeniden yapılanmasının mikrobiyal kompozisyonun şekillenmesinde belirgin bir etkiye sahip olduğu hipotezi kurulmuştur. Beslenme biçimi, bağırsak mikrobiyotasının kompozisyonunu düzenlediğinden (125, 138-140), mikrobiyomun yeniden yapılandırılmasında çevresel faktörlerin katkısını önlemek için, tüm hayvanlar aynı suda çözünen solüsyonda tutulmuştur ve aynı beslenme şekli ile beslenmiştir. Sonuç olarak; aynı hayvanın farklı örneklerinde ve metamorfoz sonrasında mikrobiyal çeşitlilikte hızlı bir değişim gözlenmektedir. Çeşitlilik analizi sonucunda, metamorfozlu organların yeniden yapılanma oranı ile ilişkili olabilecek farklı seviyelerde metamorfoz öncesi ve sonrası evreler için aynı örneklerdeki değişiklikler gözlemlenmiştir. Aksolotl'da bakterilerin varsayımsal rolünü belirlemek için, OTU'lar tarafından kodlanan enzimlerin tahmin edilmesinin faydalı olabileceği düşünülmektedir. Aksolotl larvalarındaki mikrobiyal toplulukların incelenmesinin ve ardından çıkan sonuçların yetişkin neotenik ve metamorfik hayvanlarla karşılaştırılmasının, laboratuvar koşullarındaki Aksolotl mikrobiyotası hakkında daha kapsamlı bir bilgi üretebileceği düşünülmektedir. Bu konuda daha sonra yapılacak çalışmaların, Aksolotl biyolojisinin fonksiyonel karakterizasyonunu daha detaylandırması ve Aksolotl'un değerli bir model organizma olmasının önünü açacağı düşünülmektedir.

9.KAYNAKLAR

1. Sullivan Å, Edlund, C., & Nord, C. E. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *The Lancet infectious diseases*. 2001;101-14.
2. Looso M. Opening the genetic toolbox of niche model organisms with high throughput techniques: novel proteins in regeneration as a case study. *BioEssays*. 2014;36(4):407-18.
3. Contreras V, Martínez-Meyer E, Valiente E, Zambrano L. Recent decline and potential distribution in the last remnant area of the microendemic Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Biological conservation*. 2009;142(12):2881-5.
4. Smith HM. The Mexican axolotl: some misconceptions and problems. *BioScience*. 1969;19(7):593-615.
5. Voss SR, Epperlein HH, Tanaka EM. *Ambystoma mexicanum*, the axolotl: a versatile amphibian model for regeneration, development, and evolution studies. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2009;2009(8):pdb. emo128.
6. Monaghan JR, Stier AC, Michonneau F, Smith MD, Pasch B, Maden M, et al. Experimentally induced metamorphosis in axolotls reduces regenerative rate and fidelity. *Regeneration*. 2014;1(1):2-14.
7. Zhang P, Wake DB. Higher-level salamander relationships and divergence dates inferred from complete mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2009;53(2):492-508.
8. Sandoval-Guzmán T, Wang H, Khattak S, Schuez M, Roensch K, Nacu E, et al. Fundamental differences in dedifferentiation and stem cell recruitment during skeletal muscle regeneration in two salamander species. *Cell stem cell*. 2014;14(2):174-87.
9. Kumar A, Nevill G, Brockes JP, Forge A. A comparative study of gland cells implicated in the nerve dependence of salamander limb regeneration. *Journal of anatomy*. 2010;217(1):16-25.
10. Page RB, Voss SR. Induction of metamorphosis in axolotls (*Ambystoma mexicanum*). *Cold Spring Harbor Protocols*. 2009;2009(8):pdb. prot5268.

11. Whitford WG, Sherman RE. Aerial and aquatic respiration in axolotl and transformed *Ambystoma tigrinum*. *Herpetologica*. 1968;24(3):233-7.
12. Dodd M, Dodd J. The biology of metamorphosis. *Physiology of the Amphibia*. 1976;3:467-599.
13. Rosenkilde P, Ussing A. What mechanisms control neoteny and regulate induced metamorphosis in urodeles? *International Journal of Developmental Biology*. 2004;40(4):665-73.
14. Norris DO, Platt JE. T3-and T4-induced rates of metamorphosis in immature and sexually mature larvae of *Ambystoma tigrinum* (amphibia: Caudata). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*. 1974;189(3):303-10.
15. Prahlad K, DeLanney LE. A study of induced metamorphosis in the axolotl. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*. 1965;160(1):137-45.
16. Taurog A. Effect of TSH and long-acting thyroid stimulator on thyroid ¹³¹I-metabolism and metamorphosis of the Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *General and comparative endocrinology*. 1974;24(3):257-66.
17. Page RB, Monaghan JR, Samuels AK, Smith JJ, Beachy CK, Voss SR. Microarray analysis identifies keratin loci as sensitive biomarkers for thyroid hormone disruption in the salamander *Ambystoma mexicanum*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2007;145(1):15-27.
18. Page RB, Monaghan JR, Walker JA, Voss SR. A model of transcriptional and morphological changes during thyroid hormone-induced metamorphosis of the axolotl. *General and comparative endocrinology*. 2009;162(2):219-32.
19. Okada M, Wen L, Miller TC, Su D, Shi Y-B. Molecular and cytological analyses reveal distinct transformations of intestinal epithelial cells during *Xenopus* metamorphosis. *Cell & bioscience*. 2015;5(1):74.
20. Shi Y-B, Hasebe T, Fu L, Fujimoto K, Ishizuya-Oka A. The development of the adult intestinal stem cells: Insights from studies on thyroid hormone-dependent amphibian metamorphosis. *Cell & bioscience*. 2011;1(1):30.

21. Wang F, Shi Z, Cui Y, Guo X, Shi Y-B, Chen Y. Targeted gene disruption in *Xenopus laevis* using CRISPR/Cas9. *Cell & bioscience*. 2015;5(1):15.
22. Brown DD, Cai L. Amphibian metamorphosis. *Developmental biology*. 2007;306(1):20-33.
23. Ishizuya-Oka A, Shi YB. Molecular mechanisms for thyroid hormone-induced remodeling in the amphibian digestive tract: A model for studying organ regeneration. *Development, growth & differentiation*. 2005;47(9):601-7.
24. Fox H. Tissue degeneration: an electron microscopic study of the pronephros of *Rana temporaria*. *Development*. 1970;24(1):139-57.
25. Yoshizato K. Death and transformation of larval cells during metamorphosis of anura. *Development, growth & differentiation*. 1992;34(6):607-12.
26. Holbrook KA. Structure and function of the developing human skin. *Biochemistry and Physiology of the Skin*. 1983;1:64-101.
27. Schreiber AM, Brown DD. Tadpole skin dies autonomously in response to thyroid hormone at metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(4):1769-74.
28. Furlow JD, Berry DL, Wang Z, Brown DD. A Set of Novel Tadpole Specific Genes Expressed Only in the Epidermis Are Down-Regulated by Thyroid Hormone during *Xenopus laevis* Metamorphosis. *Developmental biology*. 1997;182(2):284-98.
29. Bevins CL, Zasloff M. Peptides from frog skin. *Annual review of biochemistry*. 1990;59(1):395-414.
30. McAvoy J, Dixon K. Cell specialization in the small intestinal epithelium of adult *Xenopus laevis*: structural aspects. *Journal of anatomy*. 1978;125(Pt 1):155.
31. Schreiber AM, Cai L, Brown DD. Remodeling of the intestine during metamorphosis of *Xenopus laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(10):3720-5.
32. Shi Y, Brown D. The earliest changes in gene expression in tadpole intestine induced by thyroid hormone. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(27):20312-7.
33. Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Reviews in Microbiology*. 1977;31(1):107-33.

34. Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, et al. The NIH human microbiome project. *Genome research*. 2009;19(12):2317-23.
35. Lederberg J, McCray AT. Ome SweetOmics--A Genealogical Treasury of Words. *The Scientist*. 2001;15(7):8-.
36. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *science*. 2005;308(5728):1635-8.
37. Levy M, Blacher E, Elinav E. Microbiome, metabolites and host immunity. *Current opinion in microbiology*. 2017;35:8-15.
38. Donia MS, Fischbach MA. Small molecules from the human microbiota. *Science*. 2015;349(6246):1254766.
39. Gerber GK. The dynamic microbiome. *FEBS letters*. 2014;588(22):4131-9.
40. White RA, Bjørnholt JV, Baird DD, Midtvedt T, Harris JR, Pagano M, et al. Novel developmental analyses identify longitudinal patterns of early gut microbiota that affect infant growth. *PLoS computational biology*. 2013;9(5):e1003042.
41. Gajer P, Brotman RM, Bai G, Sakamoto J, Schütte UM, Zhong X, et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Science translational medicine*. 2012;4(132):132ra52-ra52.
42. Hoffmann C, Hill DA, Minkah N, Kirn T, Troy A, Artis D, et al. Community-wide response of the gut microbiota to enteropathogenic *Citrobacter rodentium* infection revealed by deep sequencing. *Infection and immunity*. 2009;77(10):4668-78.
43. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome biology*. 2012;13(9):R79.
44. Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(Supplement 1):4554-61.
45. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS biology*. 2007;5(7):e177.

46. Kohl KD, Cary TL, Karasov WH, Dearing MD. Restructuring of the amphibian gut microbiota through metamorphosis. *Environmental microbiology reports*. 2013;5(6):899-903.
47. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(Supplement 1):4578-85.
48. de Muinck EJ, Lagesen K, Afset JE, Didelot X, Rønningen KS, Rudi K, et al. Comparisons of infant *Escherichia coli* isolates link genomic profiles with adaptation to the ecological niche. *BMC genomics*. 2013;14(1):81.
49. Costello EK, Carlisle EM, Bik EM, Morowitz MJ, Relman DA. Microbiome assembly across multiple body sites in low-birthweight infants. *MBio*. 2013;4(6):e00782-13.
50. Yatsunenkov T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012;486(7402):222-7.
51. Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(Supplement 1):4586-91.
52. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y-Y, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*. 2011;334(6052):105-8.
53. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014;505(7484):559-63.
54. van Tongeren SP, Slaets JP, Harmsen H, Welling GW. Fecal microbiota composition and frailty. *Applied and environmental microbiology*. 2005;71(10):6438-42.
55. Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT, McMurdo ME. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized

- elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Applied and environmental microbiology*. 2004;70(6):3575-81.
56. Holdeman L, Good I, Moore W. Human fecal flora: variation in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress. *Applied and environmental microbiology*. 1976;31(3):359-75.
57. Kiecolt-Glaser JK, McGuire L, Robles TF, Glaser R. Psychoneuroimmunology: psychological influences on immune function and health. *Journal of consulting and clinical psychology*. 2002;70(3):537.
58. Stecher B, Hardt W-D. The role of microbiota in infectious disease. *Trends in microbiology*. 2008;16(3):107-14.
59. Smith K, McCoy KD, Macpherson AJ, editors. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Seminars in immunology*; 2007: Elsevier.
60. Bry L, Falk PG, Midtvedt T, Gordon JI. A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem. *Science*. 1996;273(5280):1380.
61. Klaasen H, Van der Heijden P, Stok W, Poelma F, Koopman J, Van den Brink M, et al. Apathogenic, intestinal, segmented, filamentous bacteria stimulate the mucosal immune system of mice. *Infection and immunity*. 1993;61(1):303-6.
62. Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(24):15451-5.
63. Moore W, Holdeman LV. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Applied microbiology*. 1974;27(5):961-79.
64. Vollaard E, Clasener H, Janssen A. Influence of cephradine on microbial colonisation resistance in healthy volunteers. *Microbial ecology in health and disease*. 1992;5(3):147-53.
65. Wright C, Kominos SD, Yee RB. Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* recovered from vegetable salads. *Applied and environmental microbiology*. 1976;31(3):453.
66. Vollaard E, Clasener H. Colonization resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1994;38(3):409.

67. Johnston PR, Rolff J. Host and symbiont jointly control gut microbiota during complete metamorphosis. *PLoS pathogens*. 2015;11(11):e1005246.
68. Truman JW, Riddiford LM. The origins of insect metamorphosis. *Nature*. 1999;401(6752):447-52.
69. Moran NA. Adaptation and constraint in the complex life cycles of animals. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1994;25(1):573-600.
70. Stansbury MS, Moczek AP. The evolvability of arthropods. *Arthropod Biology and Evolution: Springer*; 2013. p. 479-93.
71. Leach J. The Method of Survival of Bacteria in the Puparia of the Seed-Corn Maggot (*Hylemyia Cilicrura* Rond.). *Journal of Applied Entomology*. 1934;20(1):150-61.
72. Bakula M. The persistence of a microbial flora during postembryogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Journal of invertebrate pathology*. 1969;14(3):365-74.
73. Wong CNA, Ng P, Douglas AE. Low-diversity bacterial community in the gut of the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *Environmental microbiology*. 2011;13(7):1889-900.
74. Brucker RM, Bordenstein SR. The roles of host evolutionary relationships (genus: *Nasonia*) and development in structuring microbial communities. *Evolution*. 2012;66(2):349-62.
75. Russell V, Dunn PE. Antibacterial proteins in the midgut of *Manduca sexta* during metamorphosis. *Journal of Insect Physiology*. 1996;42(1):65-71.
76. Hammer TJ, McMillan WO, Fierer N. Metamorphosis of a butterfly-associated bacterial community. *PLoS One*. 2014;9(1):e86995.
77. Gury-BenAri M, Thaïss CA, Serafini N, Winter DR, Giladi A, Lara-Astiaso D, et al. The spectrum and regulatory landscape of intestinal innate lymphoid cells are shaped by the microbiome. *Cell*. 2016;166(5):1231-46. e13.
78. Lagier J-C, Million M, Hugon P, Armougom F, Raoult D. Human gut microbiota: repertoire and variations. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2012;2.
79. Ash C, Farrow JA, Dorsch M, Stackebrandt E, Collins MD. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of

reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1991;41(3):343-6.

80. Chen J, Miao X, Xu M, He J, Xie Y, Wu X, et al. Intra-genomic heterogeneity in 16S rRNA genes in strictly anaerobic clinical isolates from periodontal abscesses. *PloS one*. 2015;10(6):e0130265.

81. Hugon P, Lagier J-C, Robert C, Lepolard C, Papazian L, Musso D, et al. Molecular studies neglect apparently gram-negative populations in the human gut microbiota. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(10):3286-93.

82. Hugon P, Dufour J-C, Colson P, Fournier P-E, Sallah K, Raoult D. A comprehensive repertoire of prokaryotic species identified in human beings. *The Lancet Infectious Diseases*. 2015;15(10):1211-9.

83. Schloss PD, Handelsman J. Biotechnological prospects from metagenomics. *Current opinion in biotechnology*. 2003;14(3):303-10.

84. Rondon MR, August PR, Bettermann AD, Brady SF, Grossman TH, Liles MR, et al. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and environmental microbiology*. 2000;66(6):2541-7.

85. Amann RI, Ludwig W, Schleifer K-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*. 1995;59(1):143-69.

86. Pace NR, Stahl DA, Lane DJ, Olsen GJ. Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences. *ASM American Society for Microbiology News*. 1985;51(1):4-12.

87. Quaiser A, Ochsenreiter T, Klenk HP, Kletzin A, Treusch AH, Meurer G, et al. First insight into the genome of an uncultivated crenarchaeote from soil. *Environmental Microbiology*. 2002;4(10):603-11.

88. Béja O, Aravind L, Koonin EV, Suzuki MT, Hadd A, Nguyen LP, et al. Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science*. 2000;289(5486):1902-6.

89. Van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in genetics*. 2014;30(9):418-26.

90. Dinsdale EA, Edwards RA, Hall D, Angly F, Breitbart M, Brulc JM, et al. Functional metagenomic profiling of nine biomes. *Nature*. 2008;452(7187):629-32.
91. Garza DR, Dutilh BE. From cultured to uncultured genome sequences: metagenomics and modeling microbial ecosystems. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2015;72(22):4287-308.
92. Escobar-Zepeda A, Vera-Ponce de Leon A, Sanchez-Flores A. The Road to Metagenomics: From Microbiology to DNA Sequencing Technologies and Bioinformatics. *Frontiers in genetics*. 2015;6:348.
93. Krebs CJ. *Ecological methodology*. Harper & Row New York, 1989.
94. Sanders HL. Marine benthic diversity: a comparative study. *The American Naturalist*. 1968;102(925):243-82.
95. Heck KL, van Belle G, Simberloff D. Explicit calculation of the rarefaction diversity measurement and the determination of sufficient sample size. *Ecology*. 1975;56(6):1459-61.
96. Colwell RK, Coddington JA. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 1994;345(1311):101-18.
97. Logares R, Haverkamp TH, Kumar S, Lanzén A, Nederbragt AJ, Quince C, et al. Environmental microbiology through the lens of high-throughput DNA sequencing: synopsis of current platforms and bioinformatics approaches. *Journal of microbiological methods*. 2012;91(1):106-13.
98. Fichot EB, Norman RS. Microbial phylogenetic profiling with the Pacific Biosciences sequencing platform. *Microbiome*. 2013;1(1):10.
99. Sanchez-Flores A, Abreu-Goodger C. A practical guide to sequencing genomes and transcriptomes. *Current topics in medicinal chemistry*. 2014;14(3):398-406.
100. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bembgen LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005;437(7057):376-80.
101. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 2011;475(7356):348-52.

102. Bennett S. Solexa ltd. *Pharmacogenomics*. 2004;5(4):433-8.
103. Glenn T. NGS Field Guide: Overview. Available at website <http://molecularecologist.com/next-gen-fieldguide-2014/> [accessed 15 February 2016]. 2014.
104. Sharpton TJ. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Frontiers in plant science*. 2014;5.
105. Tonge DP, Pashley CH, Gant TW. Amplicon–Based Metagenomic Analysis of Mixed Fungal Samples Using Proton Release Amplicon Sequencing. *PloS one*. 2014;9(4):e93849.
106. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME journal*. 2012;6(8):1621-4.
107. Luo C, Tsementzi D, Kyrpides N, Read T, Konstantinidis KT. Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample. *PloS one*. 2012;7(2):e30087.
108. Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clinical chemistry*. 2009;55(5):856-66.
109. Schouls LM, Schot CS, Jacobs JA. Horizontal transfer of segments of the 16S rRNA genes between species of the *Streptococcus anginosus* group. *Journal of bacteriology*. 2003;185(24):7241-6.
110. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*. 2009;75(23):7537-41.
111. Poretsky R, Rodriguez-R LM, Luo C, Tsementzi D, Konstantinidis KT. Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing temporal microbial community dynamics. *PLoS One*. 2014;9(4):e93827.
112. Aßhauer KP, Wemheuer B, Daniel R, Meinicke P. Tax4Fun: predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. *Bioinformatics*. 2015;31(17):2882-4.

113. Demircan T, İlhan AE, Aytürk N, Yıldırım B, Öztürk G, Keskin İ. A histological atlas of the tissues and organs of neotenic and metamorphosed axolotl. *Acta histochemica*. 2016;118(7):746-59.
114. Olsen GJ, Woese CR. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *The FASEB journal*. 1993;7(1):113-23.
115. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*. 2010;7(5):335-6.
116. Yilmaz P, Parfrey LW, Yarza P, Gerken J, Pruesse E, Quast C, et al. The SILVA and “all-species living tree project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic acids research*. 2013;42(D1):D643-D8.
117. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology*. 2007;73(16):5261-7.
118. Shannon CE. A mathematical theory of communication, Part I, Part II. *Bell Syst Tech J*. 1948;27:623-56.
119. Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, Liang W, Sharov V, Howe EA, et al. [9] TM4 microarray software suite. *Methods in enzymology*. 2006;411:134-93.
120. Sevigny J, Chiao P, Bussi re T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, et al. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer’s disease. *Nature*. 2016;537(7618):50-6.
121. Bray JR, Curtis JT. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological monographs*. 1957;27(4):325-49.
122. Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O’hara R, et al. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-10. 2013. There is no corresponding record for this reference. 2015.
123. Lozupone CA, Knight R. Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(27):11436-40.
124. Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic acids research*. 2017;45(D1):D353-D61.

125. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 2016;12(1):1-222.
126. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*. 2012;336(6086):1262-7.
127. Spitzen-van der Sluijs A, Martel A, Asselberghs J, Bales EK, Beukema W, Bletz MC, et al. Expanding distribution of lethal amphibian fungus *Batrachochytrium salamandrivorans* in Europe. *Emerging infectious diseases*. 2016;22(7):1286.
128. Brenchley R, Spannagl M, Pfeifer M, Barker GL, D'Amore R, Allen AM, et al. Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature*. 2012;491(7426):705-10.
129. Walke JB, Becker MH, Loftus SC, House LL, Cormier G, Jensen RV, et al. Amphibian skin may select for rare environmental microbes. *The ISME journal*. 2014;8(11):2207-17.
130. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *nature*. 2009;457(7228):480-4.
131. Van Rensburg EJ. *The statistical mechanics of interacting walks, polygons, animals and vesicles: Oxford Lecture Series in Mathe*; 2015.
132. Grice EA, Kong HH, Conlan S, Deming CB, Davis J, Young AC, et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *science*. 2009;324(5931):1190-2.
133. Escobedo-Hinojosa WI, Vences-Guzmán MÁ, Schubotz F, Sandoval-Calderón M, Summons RE, López-Lara IM, et al. OlsG (Sinac_1600) is an ornithine lipid N-methyltransferase from the planctomycete *Singulisphaera acidiphila*. *Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(24):15102-11.
134. Aad G, Abat E, Abbott B, Abdallah J, Abdelalim A, Abdesselam A, et al. Expected performance of the ATLAS experiment-detector, trigger and physics. 2008.
135. Springel V, White SD, Jenkins A, Frenk CS, Yoshida N, Gao L, et al. Simulations of the formation, evolution and clustering of galaxies and quasars. *nature*. 2005;435(7042):629-36.

136. Ahmad Q, Allen R, Andersen T, Anglin J, Barton J, Beier E, et al. Direct evidence for neutrino flavor transformation from neutral-current interactions in the Sudbury Neutrino Observatory. *Physical review letters*. 2002;89(1):011301.
137. Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2012;62(4):220-41.
138. Lewis S. Qualitative inquiry and research design: Choosing among five approaches. *Health promotion practice*. 2015;16(4):473-5.
139. Akerib D, Araujo H, Bai X, Bailey A, Balajthy J, Bedikian S, et al. First results from the LUX dark matter experiment at the Sanford Underground Research Facility. *Physical Review Letters*. 2014;112(9):091303.
140. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual review of immunology*. 2009;27:451-83.

10. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI
E-İmzalıdır



Sayı : 38828770-604.01.01-E.2314
Konu : Etik Kurulu Kararı

12/02/2016

Sayın Öğr. Dr. Sevda Er

Üniversitemizin Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Neoteniik ve Metamorfiik Axolotl’ın İç Organları ve Rejenere Olan Uzuvunda Metagenomiks Yöntemi İle Mikrobiyata Analizi” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

EK:
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Doc. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 12.02.2016 tarihinde e-
imzalanmıştır.
~~Evrakımızı <http://cbys.medipol.edu.tr/e-imza/confirmationCodeDocumentViewer.aspx> linkinden
4995DCB4X4 kodu ile doğrulayabilirsiniz.~~

ETİK KURUL ONAYI (DEVAM)



T.C.

**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ,
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)
ETİK KURULU KARARI**

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
10/02/2016	20		Sevda Er

“Neoteniik ve Metamorfik Axolotl'ın İç Organları ve Rejenere Olan Uzuvunda Metagenomiks Yöntemi İle Mikrobiyata Analizi” başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “**oybirliği**” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 12 ay

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Ülkan KILIÇ	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. H. Emir YÜZBAŞIOĞLU	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sine Özmen TOĞAY	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet Yalçın GÜNAL	
Üye	Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	

11.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Berna	Soyadı	YILDIRIM
Doğum Yeri	ANKARA	Doğum Tarihi	25.06.1990
Uyruğu	TÜRK	TC Kimlik No	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	Bülent Ecevit Üniversitesi / Fen Edebiyat Fakültesi / Biyoloji	2014
Lise	Özel Rafet Kahraman Lisesi	2007

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl)
Milli Eğitim Bakanlığı, Ücretli Öğretmenlik		1

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	İyi	İyi

	Sayısal	Eşit ağırlık	Sözel
ALES Puanı	69,5	66,8	58,9

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Office	İyi

Sertifikalar

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	Sertifika No: İMÜDHK VI 2016 / 132A	