

**AKSOLOTL KOL REJENERASYONU ALANINDA MİKROBİYOTA
VE TRANSKRİPTOM VERİSİNİN MADENCİLİĞİ VASITASIYLA
YENİ ADAY BİYOBELİRTEÇLERİN KEŞFİ**

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SAĞLIK SİSTEMLERİ MÜHENDİSLİĞİ
YÜKSEK LİSANS DERESESİNE İLİŞKİN BELİRLENEN ŞARTLARIN
YERİNE GETİRİLMESİ AMACIYLA SUNULAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Muhammed Mustafa Ögdür

Temmuz, 2022

AKSOLOTL KOL REJENERASYONU ALANINDA MİKROBİYOTA VE
TRANSKRİPTOM VERİSİNİN MADENCİLİĞİ VASITASIYLA YENİ ADAY
BİYOBELİRTEÇLERİN KEŞFİ

Muhammed Mustafa ÖGDÜR

28 Temmuz 2022

Jüri üyeleri olarak bu tezi okuduğumuzu ve ilgili programın yüksek lisans derecesi için yeterli kapsam ve kalitede olduğunu onaylıyoruz.

Dr. Öğr. Üye. Kıvanç KÖK (Danışman)

Dr. Öğr. Üye. Melis Almula KARADAYI

Dr. Öğr. Üye. Hilal EREN GÖZEL

Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından onaylanmıştır:

Prof. Dr. Yasemin Yüksel Durmaz

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İşbu belge ile bu tezdeki bütün bilgilerin akademik kurallara ve etik davranış ilkelerine uygun olarak toplanıp sunulduğunu beyan ederim. Bu kural ve ilkelerin gereği olarak, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, malzeme ve sonuçları alıntıladığımı ve kaynağını gösterdiğimi ayrıca beyan ederim.

İmza :

Adı Soyadı : M. MUSTAFA ÖGDÜR

TEŞEKKÜR

Tezimin içeriğini belirlemede, tezin meydana geliş sürecindeki zorluklarda ve tezin son halini almasına kadar ki her aşamada tecrübelerini bana aktaran değerli Hocam Dr. Öğr. Üye. Kıvanç KÖK'e teşekkürü bir borç bilirim.

Yaşadığımız zorlu süreçlerde akademik olarak tecrübelerini paylaşan Prof. Dr. Hakan TOZAN, değerli Dr. Öğr. Üye. Melis Almula KARADAYI Hocalarıma teşekkürlerim sonsuzdur.

Bu çalışmanın oluşumunda ve eğitim hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen, annem Filiz ÖGDÜR'e ve babam Yavuz ÖGDÜR'e, sevgili eşim Zeynep GÜNEŞÇELİK ÖGDÜR'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Sonsuz minnet ve teşekkürler...

Muhammed Mustafa Ögdür
Temmuz, 2022

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ÇİZELGE LİSTESİ.....	viii
KISALTMALAR	ix
ÖZET	x
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Yara İyileşmesi Araştırmaları.....	2
1.1.1. İnsanda yara iyileşmesi çalışmaları	2
1.1.2. Model organizmalarda rejenerasyon çalışmaları	3
1.2. Rejenerasyon Araştırmaları	4
1.2.1. İnsanda rejenerasyon çalışmaları	6
1.2.2. Rejenerasyon ve mikrobiyota ilişkisi.....	7
1.3. Rejeneratif Model Organizma Olarak Axolotl	10
1.3.1. Axolotlda rejenerasyon	11
1.3.2. Axolotlda rejenerasyon ve metamorfoz ilişkisi	12
1.3.3. Axolotlda rejenerasyon ve mikrobiyota ilişkisi	13
1.4. Biyobelirteçler ve Multi-omik Çalışmalar	15
1.4.1. Biyobelirteçler	15
1.4.1.1. Biyoloji ve sağlık bilimlerinde biyobelirteçler	15
1.4.1.2. Mikrobiyal biyobelirteçler	16
1.4.1.3. mRNA biyobelirteçler.....	17
1.4.2. Multi-omik çalışmalar	18
1.4.2.1. Multi-omik veri madenciliği.....	19
1.5. Amaç.....	21
2. TEORİK KISIM	23
2.1. Mikrobiyota Veri Analizinde Kullanılan Metotları	23
2.1.1. Mikrobiyota alanındaki biyoistatistiksel metotlara genel bakış	23
2.1.2. Mikrobiyota veri analizinde ASV metodunun kullanılması	26
2.1.3. ASV tablosunun incelenmesi.....	27
2.1.4. Normalizasyon	28
2.1.5. Rarefaksiyon	29
2.1.6. ASV Bolluk profilinin görüntülenmesi	29
2.1.7. Alfa çeşitlilik analizi	29
2.1.7.1. Observed metodu	30
2.1.7.2. Chao1 metodu	31
2.1.7.3. Shannon metodu	31
2.1.7.4. Faith's phylogenetic diversity metodu.....	32
2.1.8. Beta çeşitlilik analizi.....	32
2.1.8.1. Beta çeşitlilik analizinde kullanılan boyut indirgeme metotları	32
2.1.8.2. Beta çeşitlilik analizinde çok değişkenli istatistiksel analiz metotları	37
2.1.9. Hiyerarşik kümeleme	38
2.1.10. Çekirdek mikrobiyota analizi.....	39
2.1.11. Differansiyel bolluk analizi	40
2.1.12. Rastgele orman sınıflandırması	40
2.2. Transkriptom Veri Analizinde Kullanılan Metotları	42
2.3. Literatür Taraması.....	43

3. DENEYSSEL KISIM.....	46
3.1. Kullanılan Girdi Verilerinin ve Analiz Metotlarının Seçimi	46
3.2. Uygulanan Mikrobiyota Veri Madenciliğinin Metodolojisi	47
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	50
4.1. Mikrobiyota Analiz Sonuçları	50
4.1.1. Mikrobiyota bolluk tablosunun incelenmesi.....	50
4.1.2. Mikrobiyota örneklerinin ASV bolluğu bakımından ikili kıyaslanması	51
4.1.3. Mikrobiyal bolluğun profillenmesi.....	52
4.1.4. Hiyerarşik kümeleme analizi	54
4.1.5. Alfa çeşitliliğin profillenmesi ve anlamlılık testleri	56
4.1.6. Beta çeşitliliğin profillenmesi ve anlamlılık testleri	58
4.1.7. Gruplar arası farkın tek değişkenli analizi.....	61
4.1.8. Rastgele Orman metodu kullanılarak grupların sınıflandırması.....	62
4.2. Transkriptom Analiz Sonuçları.....	68
4.2.1. Kalite kontrolü	68
4.2.2. Global gen ekspresyonu seviyesinde aksolotl kol rejenerasyonunun dinamiği	69
4.2.3. Differansiyel ekspresyon analizi.....	71
4.2.3.1. Differansiyel ekspresyon gösteren genlerin tespit edilmesi	71
5. SONUÇ VE GELECEKTEKİ ÇALIŞMALAR.....	77
5.1. Sonuç	77
5.1.1. Sonuçların genel değerlendirilmesi	78
5.2. Gelecekteki Çalışmalar	79
KAYNAKÇA.....	82
ÖZ GEÇMİŞ	89

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1: Mikrobiyom Veri Madenciliğinin İş Akışı	47
Şekil 3.2: Transkriptom Veri Madenciliğinin İş Akışı.....	49
Şekil 4.1: Genus seviyesinde mikrobiyal bolluğun profillenmesi.....	54
Şekil 4.2: ASV bolluğuna dayalı hiyerarşik kümeleme ısı haritası.....	55
Şekil 4.3: ASV bolluğuna dayalı hiyerarşik kümeleme dendogramı	56
Şekil 4.4: Genus seviyesindeki mikrobiyal bolluğa dayalı, Chao1 metoduyla elde edilmiş, alfa çeşitliliği nokta grafiği.	57
Şekil 4.5: Genus seviyesindeki mikrobiyal bolluğa dayalı, Chao1 metoduyla elde edilmiş, alfa çeşitliliği kutu grafiği.....	58
Şekil 4.6: Genus seviyesindeki mikrobiyal bolluğa dayalı, beta çeşitliliği PCoA grafiği.....	59
Şekil 4.7: Genus seviyesindeki mikrobiyal bolluğa dayalı, alfa çeşitliliği ve beta çeşitliliği aynı anda gösteren PCoA grafiği.	61
Şekil 4.8: Aile seviyesindeki mikrobiyal bolluğa dayalı rastgele orman sınıflandırmasının performansı.	63
Şekil 4.9: Aile seviyesindeki mikrobiyal bolluğa dayalı rastgele orman sınıflandırmasıyla belirlenen en önemli 15 öznelik.....	65
Şekil 4.10: Rejenerasyon fazı bazında Genus seviyesindeki mikrobiyal bolluğa.....	66
Şekil 4.11: Rejenerasyon fazı bazında genus seviyesindeki mikrobiyal bolluğa dayalı, alfa çeşitliliği ve beta çeşitliliği aynı anda gösteren PCoA grafiği.	66
Şekil 4.12: Aile seviyesindeki mikrobiyal bolluğa dayalı fazların rastgele orman sınıflandırmasının performansı.....	67
Şekil 4.13: Aile seviyesindeki mikrobiyal bolluğa dayalı olarak fazların rastgele orman sınıflandırmasıyla ilgili belirlenen en önemli 15 öznelik.....	68
Şekil 4.14: Girdi olarak kullanılan verinin örnekler bazında dağılımını gösteren kutu grafiği.....	69
Şekil 4.15: UMAP analiziyle örneklerin transkriptom seviyesinde karşılaştırılması. ...	70
Şekil 4.16: En anlamlı olarak bulunan genlerin differansiyel ekspresyon profili.....	73

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1: Akslotl Mikrobiyomu üzerine yapılan önceki çalışmaların özeti.....	43
Çizelge 2.2: Akslotl Transkriptom üzerine yapılan önceki çalışmaların özeti.....	44
Çizelge 2.3: Transkriptom üzerine yapılan çalışmalarda kullanılan prgramlar ve metotlar.....	45
Çizelge 3.1: Mikrobiyota veri madenciliğinin basamakları ve teknik detayları.....	47
Çizelge 3.2: Transkriptom veri madenciliğinin basamakları ve teknik detayları.....	49
Çizelge 4.1: ASV tablosunun tanımlayıcı istatistiği.....	50
Çizelge 4.2: Mikrobiyal bolluğa dayalı numunelerin ikili korelasyon tablosu.....	52
Çizelge 4.3: Bolluğu anlamlı olarak değişen aileler.....	62
Çizelge 4.4: OOB hatası: OOB error (Out-of-bag error).....	64
Çizelge 4.5: Rejenerasyon fazını tahmin etmedeki hatanın ölçülmesi.....	67
Çizelge 4.6: Seviyesi en anlamlı olarak değişen 10 genin bilgileri ve istatistikleri.....	72
Çizelge 4.7: Seviyesi en anlamlı olarak değişen 10 genin tam ismi.....	72
Çizelge 4.8: Anlamlı bulunan genlerle ilgili genel bilgiler.....	74
Çizelge 4.9: Anlamlı bulunan genlerin insandaki yara iyileşmesi ve rejenerasyonla ilişkisi.....	75

KISALTMALAR

ANOVA	:Varyans Analizi (Analysis of Variance)
ANOSIM	:Analysis of Similarities (Benzerliklerin Analizi)
ASV	:Amplicon Sequence Variant (Amplikon Sekans Varyantı)
DADA2	:Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2 (Bölücü Amplikon Gürültüsünü Giderme Algoritması 2)
DESeq2	:Differential gene expression analysis based on the negative binomial distribution (Negatif binom dağılımına dayalı differansiyel gen ifadesi analizi).
dpa	:Ampütasyondan sonraki günü ifade etmektedir (days post-amputation)
ECM	:Extracellular Matrix (Ekstrasellüler matriks)
FDR	:False Discovery Rate (Yanlış Keşif Oranı)
GEO	:Gene Expression Omnibus veritabanı
HMP	:Human Microbiome Project (İnsan Mikrobiyomu Projesi)
LIMMA	:Linear Models for Microarray Data (Mikrodizin Verisi için Lineer Modeller)
NMDS	:Non-metric Multidimensional Scaling (Metrik Olmayan Çok Boyutlu Ölçekleme)
NGS	:Next Generation Sequencing (Yeni Nesil Sekanslama)
PCA	:Principal Component Analysis (Temel Bileşen Analizi)
PCoA	:Principal Coordinate Analysis (Temel Koordinat Analizi)
PERMANOVA	:Permutational Multivariate Analysis of Variance (Permütasyonlu Çok Değişkenli Varyans Analizi)
PERMDISP	:Permutational Analysis of Multivariate Dispersion (Çok Değişkenli Değişkenliğin Permütasyon Analizi)
TH	:Tiroid Hormonları
TNXB	:Tenascin X
OBB	:Out-Of-Bag (Torbadan çıkma tahmini)
OTU	:Operational Taxonomic Unit (Operasyonel Taksonomik Birim)
UMAP	:Uniform Manifold Approximation and Projection (Üniform Manifold Yaklaşımı ve Projeksiyonu)

AKSOLOTL KOL REJENERASYONU ALANINDA MİKROBİYOTA VE TRANSKRİPTOM VERİSİNİN MADENCİLİĞİ VASITASIYLA YENİ ADAY BİYOBELİRTEÇLERİN KEŞFİ

ÖZET

Muhammed Mustafa ÖGDÜR

Sağlık Sistemleri Mühendisliği, Yüksek Lisans

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üye. Kıvanç KÖK

Temmuz, 2022

Son zamanlarda transkriptom ve mikrobiyota profillerini daha etkili ortaya çıkarabilen Yeni Nesil Dizilimi teknolojisinin yaygınlaşması rejenerasyonda mikrobiyotanın ve transkriptomun rolüne dikkat çekmektedirler. İntegratif yaklaşım ilgili rejenerasyon veri setlerinin madenciliği için yeni bir fırsat taşımaktadır. Konuyla ilgili artan literatüre rağmen bakterilerin yara iyileşmesine etkisi ve bunun altında yatan moleküler mekanizmalar hala tam anlamıyla bilinmemektedir. Özellikle hangi bakteri türlerinin ve mRNA'ların bu biyolojik süreçte biyobelirteç ve modülatör olarak kullanılabileceği konusu heyecan uyandırmakla beraber hala aydınlatılmayı beklemektedir. İnsan üzerindeki çalışmalara ek olarak, rejenerasyon alanında giderek daha kullanışlı bir model organizma olan Aksotl (*Ambystoma mexicanum*) rejenerasyon konusunda tamamlayıcı bilgiler ve kritik ipuçları sunmaktadır. Bir su semenderi olan aksotl, rejenerasyon alanında popüler olan omurgalı model organizmalar arasındadır. Aksotl neotenik özelliğe ve son derece yüksek bir rejenerasyon potansiyele sahiptir. Sahip olduğu yüksek rejenerasyon kapasitesi sayesinde bir hasar olması halinde uzuvlarını (kollarını ve ayaklarını), kuyruklarını, iç organlarını ve merkezi sinir sistemini (beyin ve omurliği) eski fonksiyonel özelliklerini gösterecek şekilde yenileyebilmektedirler. Bu biyoinformatik çalışma aksotl uzuv rejenerasyon sürecine yeni bakış açısı kazanmaya ve bu alandaki biyobelirteç eksikliğini gidermeye yönelik bir adım olarak tasarlanmıştır. Bu doğrultuda daha önce aksotl araştırmalarından yayınlanmış bir mikrobiyota ve bir transkriptom veri seti seçilmiş ve erişilmiştir. Bu çalışmada bu iki veri setinin ayrı ayrı analizi tekrar gerçekleştirilmiştir. Böylece ileri makine öğrenmesi yöntemlerle söz konusu verinin madenciliği yapılmıştır ve yeni bulgulara ulaşılmıştır. Çalışmada, aksotl kol rejenerasyonunun üç ana aşamasında (yani sırasıyla yara iyileşmesi, blastema gelişmesi ve yeniden geliştirme) rejenerasyon bölgesindeki mikrobiyom ve transkriptom dinamiği araştırılmıştır. Bu çerçevede mikrobiyom ile transkriptomdaki değişimler detaylı bir şekilde incelenmiş ve yeni aday biyobelirteçler keşfedilmiştir. Boyut indirme tekniğiyle denetimsiz makine öğrenimi uygulanarak örneklerin gruplandırılması araştırılmıştır. Bu analiz ile her iki veri çeşidinde örneklerin rejenerasyon fazına göre gruplandığı gözlemlenmiştir. Gruplar arasındaki karşılaştırma sonucu istatistiksel olarak anlamlı olarak seviyeleri değişen bakteriler ve mRNA'lar tespit edilmiştir. Bu anlamlı listeler yeni aday biyobelirteç listeleri olarak değerlendirilebilir. Ayrıca mikrobiyom verisine Rastgele Orman yöntemine dayalı denetimli makine öğrenmesi uygulanarak önemli tahmin edici

özelliğe sahip öznitelikler saptanmıştır. Belirlenen yeni aday mikrobiyal ve mRNA biyobelirteçleri ileride insan yara iyileşmesi çalışmalarında araştırılabileceği belirlenmiştir. Gelecek çalışmalarda bu yeni belirteçlerin validasyonu ve fonksiyonel karakterizasyonunun yapılması gerekmektedir. Neticede bu çalışma yenilikçi ve özgün bir yaklaşım kullanarak rejenerasyon alanındaki ilerlemeye katkı sağlamaktadır. Uzun vadede temel bilim alanında elde edilen bu tür bulguların yenilikçi translasyonel çalışmalar sayesinde tedaviye dönüşmesi beklenmektedir.



Anahtar sözcükler: Yara iyileşmesi, rejenerasyon, mikrobiyota, transkriptom, aksolotl, integratif veri analizi, mikrobiyal belirteçler

**DISCOVERY OF NOVEL CANDIDATE BIOMARKERS IN THE FIELD OF
AXOLOTL LIMB REGENERATION THROUGH MINING OF AXOLOTL
MICROBIOTA AND TRANSCRIPTOME DATA**

ABSTRACT

Muhammed Mustafa ÖGDÜR

MSc in Healthcare Systems Engineering

Advisor: Ass. Prof. Dr. Kıvanç KÖK

July, 2022

Recently, the widespread use of Next Generation Sequencing technology, which can reveal transcriptome and microbiota profiles more effectively, draws attention to the role of microbiota and transcriptome in regeneration. The integrative approach carries a new opportunity for mining related regeneration datasets. Despite the increasing literature on the subject, the effect of bacteria on wound healing and the molecular mechanisms underlying it are still not fully known. In particular, the subject of which bacterial species and mRNAs can be used as biomarkers and modulators in this biological process is exciting, but still awaits to be clarified. In addition to human studies, the axolotl (*Ambystoma mexicanum*), an increasingly instrumental model organism in the area of regeneration, provides complementary information and critical tips on regeneration. As an aquatic salamander, the axolotl is among popular vertebrate models in the field of wound healing and regeneration. Axolotl possesses extremely high regeneration potential and a neotenic feature. Owing to their high regeneration capacity, they can renew their extremities (forelimbs and hindlimbs), tail, internal organs and central nervous system (brain and spinal cord) in a way that displays their old functional properties in case of damage. This bioinformatic study was designed as a step towards providing novel insight into the axolotl regeneration process and addressing the lack of biomarkers in this field. In this direction, one microbiome dataset and one transcriptome dataset, which were published before, were selected and accessed. In this study, reanalysis of these two datasets was carried out separately. Within this scope, mining of the said data was carried out with advanced methods and new findings were reached. In the study, the microbiome and transcriptome dynamics at the regeneration site was investigated in the three main stages of the axolotl limb regeneration (namely, wound healing, blastema growth, and redevelopment, respectively). In this framework, changes in microbiome and the transcriptome were examined in detail and new candidate biomarkers were discovered. The grouping of samples was investigated by applying unsupervised machine learning with dimension reduction technique. With this analysis, it was observed that the samples grouped according to the regeneration phase based on both data types. As the result of the comparison between the groups, bacteria and mRNAs, which levels statistically significantly differed, were detected. These significant lists can be considered as new candidate biomarker lists. Furthermore, by applying Random Forest-based supervised machine learning to microbiome data, features with important predictive properties were detected. The identified novel candidate microbial and mRNA biomarkers can be

investigated in human wound healing studies in the future. The validation and functional characterization of these markers still needs to be performed in future studies. Overall, this study contributes to progress in the field of wound healing by using an innovative and original approach. In the long term, it is anticipated that such findings obtained in the field of basic science will turn into treatment thanks to innovative translational studies.



Key words: Wound healing, regeneration, microbiota, transcriptome, axolotl, integrative data analysis, microbial markers

BÖLÜM 1

1. GİRİŞ

Amfibi grubuna ait olan omurgalıların hepsinde genel olarak rejeneratif bir mekanizma bulunmaktadır. Aksolotl (*Ambystoma mexicanum*) bir semender türü olup urodele amfibiler arasında yer almaktadır. Ancak aksolotl amfibi sınıfındaki diğer omurgalılar arasında sıra dışı yüksek rejenerasyon kapasitesine sahiptir. Rejenerasyon, yaralanmaya maruz kalarak hasar gören veya kaybedilen doku, organ ve ekstremitelerin eski fonksiyonel özelliklerini tekrardan gösterecek şekilde inşa edilme sürecidir. Rejenerasyon açısından doku ve organların rejenerasyon kapasiteleri farklılık göstermektedir. Rejenerasyon kapasitesi de organizmaların türlerine göre farklılık gösterebilir. Gelişim ve artan yaşla da beraber aynı canlıdaki rejenerasyon potansiyeli değişebilmektedir. Omurgalı canlılar omurgasız canlılara göre nisbeten daha az rejenerasyona sahip olduğu bilinmektedir. Omurgalılar arasında memelilerde sınırlı düzeyde bir rejenerasyon gerçekleşir. Omurgalı canlılar olan amfibiler ise memelilere göre daha yüksek düzeyde bir rejenerasyon sahiptirler. Bu bağlamda aksolotl, amfibi sınıfındaki diğer omurgalılar arasında sıra dışı büyük rejenerasyon potansiyeline sahip canlıdır. Aksolotllar omurgalılarıdaki rejenerasyon ve yara iyileşmesi çalışmaları için önemli bir model organizmadır [1].

Günümüzde yapılan mevcut çalışmalarla, aksolotlardaki yüksek oranda rejeneratif mekanizma kapsamlı ve derinlemesine araştırılması, ayrıca gelecekte aksolotlda beklenen keşiflerle insanlardaki uzuv hasarını azaltmak hedeflenmektedir. Translasyonel tıp açısından aksolotlda gözlemlenen rejenerasyon mekanizmasında özellikle memelilerdeki rejenerasyon mekanizmasıyla örtüşen (benzeyen) ve farklı olan özellikleri bulmak öncelikli bir araştırma konusudur. Rejenerasyonun mekanizmasını anlamak için pek çok araştırma yapılmış olmasına rağmen, rejenerasyonla ve mikrobiyom ilişkisi ile ilgili veriler yeterli değildir. Yapılan çalışmalar sonucunda, aksolotl uzuv rejenerasyon sırasında filum seviyesinde baskın olarak Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria,

Actinobacteria ve Verrucomicrobia bakteri profili saptanmıştır. Aksolotl uzuv ampütasyondan sonraki uzuv rejenerasyonu sırasındaki fungal (mantar) mikrobiyota topluluğun profili ise daha çıkartılmadı. Bugüne kadar, sadece birkaç çalışma, hayvanlarda doku rejenerasyonunda mikrobiyomun rolünü ve önemini incelemiştir. Özetle aksolotl rejenerasyon çalışmalarından elde edilen veri setleri, rejenerasyon bağlamında mikrobiyomun daha iyi araştırılması için değerli bir kaynak sunmaktadır ve rejenerasyon biyolojisi için kullanışlı bir model organizma olarak aksolotl değerinin altını çizmektedir. Daha geniş biyolojik perspektiften bakılacak olursa, bu verilerin, amfibilerin gelişim, rejeneratif ve konservasyon biyolojisinde çoklu omik tekniklerin de uygulanması ve yaygınlaşmasıyla karşılaştırmalı veya korelatif çalışmalara geniş ölçüde katkıda bulunacağı öngörülmektedir [2].

1.1. Yara İyileşmesi Araştırmaları

Bir yara, derinin veya diğer vücut dokularının bütünlüğünde ve işlevinde bir bozulmadır. Bir kesik, sıyrık veya delinme yaraya sebep olur. Yaranın boyutu ve derinliği doku hasarına bağlı olarak değişebilir. Bu bağlamda yara tedavisinin boyutu, derinliği ve süresi de değişebilir. Yara iyileşmesi, yaralanmadan sonra dokuların bütünlüğünü ve fonksiyonel kapasitesini geri kazandıran, iyi ve sıkı bir şekilde düzenlenmiş hücresel ve biyokimyasal zincir reaksiyonudur [3]. Yara iyileşmesi, biyokimyasal ve fizyolojik olayları içeren ve etkin doku onarımı için uyumlu adımların yer aldığı dinamik bir süreçtir. Yara iyileşmesini hızlandırmak ve uzun vadeli yaşam kalitesini iyileştirmek için çeşitli mühendislik yaklaşımları ve deri ikamelerini içeren son klinik uygulamalar büyük ölçüde geliştirilmiştir. Yara iyileşmesini ve deri yenilenmesini hızlandırmak için birçok yeni ve yenilikçi yaklaşım geliştirilmekte ve kullanılmaktadır [4].

1.1.1. İnsanda yara iyileşmesi çalışmaları

Cilt yaraları, artan sayıda travma ve patofizyolojik durum nedeniyle önemli bir sağlık sorununu temsil etmektedir. İnsanda normal yara iyileşme süreci, hemostaz, inflamasyon (iltihaplanma), proliferasyon (Doku oluşumu) ve extracellular matrix (ECM) Remodeling (Dokunun yeniden şekillenmesi) gibi bir dizi olaydan oluşan çok iyi organize edilmiş ve düzenlenmiş bir süreci içermektedir [5]. Bu iyileşme aşamaları, çeşitli hücre tipleri, biyoaktif faktörler ve genellikle hücreler tarafından salgılanan doğal ECM olan destekleyici bir platform arasındaki etkileşimleri içermektedir [5]. Bu normal iyileşme

süreci, patofizyolojik durumlar durumunda ciddi şekilde düzensizleşir. Yanıklar veya kazalardan kaynaklanan büyük travma yaraları cilt dokusunun çoğunluğunun kaybına neden olur ve bu nedenle iyileşemez [6]. İyileşmeyen yaraların çoğu, kazalar veya diyabet gibi hastalık durumlarıyla ilişkilidir. Bu koşullar cilt dokusunun normal iyileşme düzenini engellemektedir. Yara iyileşmesi, hemostaz ve iltihaplanma ile başlar. Bu aşamada, kan kaybını kontrol etmek ve patojenlerin ortadan kaldırılmasını sağlamak için kan trombositlerinin ve bağışıklık hücrelerinin alınmasını içerir [7]. Başlangıçta seçilen bağışıklık hücreleri, hücreleri çeken kemokinlerin ve büyüme faktörlerinin salgılanmasında önemli bir rol oynar, böylece iyileşme sürecini bir sonraki proliferatif faza kaydırmaktadır. Proliferatif faz, granülasyon dokusu gelişimi (geçici ECM oluşumu), anjiyogenez (kan damarı oluşumu) ve reepitelizasyon (epidermal deri oluşumu), böylece büzülmeyi indüklemeye gibi çoklu olayları içerir. Bu özel faz, başta makrofajlar, fibroblastlar, endotel hücreleri ve keratinositler olmak üzere farklı hücrelerin bir karışımı tarafından düzenlenir. Son aşama, daha önce oluşan matrisin yavaş yavaş fonksiyonel bir cilt veya yarı / fonksiyonel olmayan bir skar dokusu oluşturmaya doğru dönüştüğü yeniden şekillenme olayını oluşturmaktadır [7]. İyileşmeyen yaralar, özellikle diyabetik yaralar durumunda, iyileşme sürecinin erken evrelerinde engellenir ve iyileşmedeki başarısızlık nedeniyle yavaş yavaş kronikleşir [8]. Kronik yara tipine bağlı olarak (venöz ülserler veya diyabetik yaralar gibi), süreç dört aşamadan herhangi birinde engellenebilir. Büyük yanık yaraları durumunda, önemli cilt dokusu kaybı veya doku nekrozu sonucu geçici bir ECM matrisi gelişmemesi doğal iyileşmeyi etkilemektedir [6], [9]. Bu nedenle, bu tür yaraların iyileşmesi için klinik müdahaleler şarttır. En başarılı strateji, geçici bir matris görevi gören yara pansumanı veya deri grefti şeklinde yapay bir matris sağlamak ve böylece iyileşme sürecine yardımcı olmaktır [10]. Araştırmacılar, yıllar boyunca çok sayıda yara pansuman malzemesi veya cilt ikamesi geliştirmekte ve iyileştirici yara veya cilt mikro çevresini en son teknolojilerle taklit etmeye çalışmaktadır [10]. Doğal yara ortamı, hücre yapışkan bölgelerine, bilgilendirici biyokimyasal sinyaller, büyüme faktörlerine ve çeşitli hücre tiplerine sahip ECM platformundan oluşmaktadır [11].

1.1.2. Model organizmalarda rejenerasyon çalışmaları

Amfibilerin yenilenme kapasitesi de türden türe değişmektedir. Amfibiler arasında kurbağalar, semender ailesi üyeleri ve Axolotl, yüksek rejeneratif kapasiteleri nedeniyle rejenerasyon ve araştırma çalışmalarında kullanım için uygun modellerdir [12].

Amfibilerin uzuvlarını doğal olarak yenileme yeteneği, rejenerasyon çalışmalarında dikkate değer bir olgudur. Amfibilerde rejenerasyon, kuyruk yerleştirmeden sonra meydana gelen rejenerasyonu ilk gözlemleyen 18. yüzyıl İtalyan doğa bilimci Lazzaro Spallanzani'nin anlatımıyla başlar. O zamandan beri devam eden araştırmalar, bu eşsiz olayın ortaya çıkmasında rol oynayan faktörleri ve molekülleri bulmaya çalıştı [13]. Rejenerasyon, biyolojideki en eski alanlardan biridir. İlk bilimsel gözlemler, kerevitlerde uzuvların yenilenmesini ayrıntılı olarak açıklayan René-Antoine Ferchault de Réaumur tarafından 1712'de yapıldı. Sonraki yarım yüzyıl boyunca, çeşitli farklı organizmaların rejenerasyonu üzerine çeşitli çalışmalar yapıldı: 1740'ta polipler için Abraham Trembley, annelidler için 1745'te Charles Bonnet, amfibiler için 1769'da Spallanzani ve 1769'da P. S. Pallas. 1770'lerde Planaryalar. Yapılan çalışmalar şu şekilde özetlenmiştir: Gelişim biyolojisi ve rejeneratif biyoloji, matematikçi Abraham Trembley'nin çalışmasıyla başladı. Trembley, organizmanın bir bitki mi yoksa bir hayvan mı olduğunu belirlemek için tatlı su hidrozoalı Hydra ile çalışmalara başladı. 1740'taki ilk çalışması, organizmayı ikiye bölmenin iki tam gelişmiş hidra oluşumuyla sonuçlandığını buldu ve daha sonra hidranın "yenilenme yeteneklerinin" boyutunu değerlendirmek için kapsamlı deneyler yapmaya başladı. Hydra'nın biyolojisi ve rejeneratif doğası üzerine sayısız deney yaptı ve 1744'te kitabının yayınlanmasıyla sonuçlandı. Çalışmaları, yıllar içinde inşa edilen rejeneratif biyolojinin ilk temellerini attı ve Son Hücresel ve Moleküler Mekanizmalar çalışmalarına yol açtı. Trembley'nin ilk çalışmalarından bu yana, rejeneratif biyoloji, rejeneratif süreçler konusundaki anlayışımızı insana aktaran rejeneratif tıp alanına dönüşmüştür.

Rejenerasyon ve transplantasyon deneylerinin sonuçları 1768'de ortaya çıktı. Planaryalar, salyangozlar ve amfibiler de dahil olmak üzere çok çeşitli hayvanlarda rejenerasyonu inceledi ve bir dizi genel sonuca ulaştı: Düşük hayvanlar, yüksek hayvanlardan daha büyük rejenerasyon gücüne sahiptir; genç bireylerin yenilenme kapasitesi aynı türün yetişkinlerinden daha fazladır ve en basit hayvanlar dışında, yenilenebilen iç organlar değil yüzeysel kısımlardır. Nakil deneyleri büyük bir deneysel beceri gösterdi ve bir salyangozun kafasının diğerinin vücuduna başarılı bir şekilde naklini içeriyordu.

1.2. Rejenerasyon Araştırmaları

Rejenerasyon, organizmanın hasarlı veya kayıp hücre, doku ve organları işlev kaybı olmadan yenileme ya da onarma yeteneği olarak tanımlanmaktadır [14]. Diğer bir ifadeyle rejenerasyon, yaralanmaya maruz kalarak hasar gören veya kaybedilen doku,

organ ve ekstremitelerin eski fonksiyonel özelliklerini tekrardan gösterecek şekilde inşa edilme sürecidir. Rejenerasyon sürecinde farklı doku ve organların yenilenme kapasiteleri birbirinden farklılık göstermekte ve canlıların türlerine göre yenilenme kapasiteleri değişebilmektedir. Rejenerasyon, yani kayıp vücut parçalarının yenilenmesi, hayvanlarda yaygındır, ancak büyük ölçüde değişiklik göstermektedir. Organizmalar, yaralanmalardan sonra hasarlı dokularını yenileyebilirler, ancak bu onarım yeteneği türden türe değişiklik göstermektedir ve hasarın meydana geldiği dokuya da bağlıdır. Omurgalı canlılar en az rejenerasyona sahip sınıftır. Omurgalılar arasında memelilerde sınırlı düzeyde bir rejenerasyon gerçekleşirken bazı amfibiler sınıfında bulunan omurgalılar yüksek düzeyde bir rejenerasyon sahiptirler. Aksolotl, amfibi sınıfının diğer omurgalılar arasında en yüksek rejenerasyon potansiyeline sahip organizmadır. Aksolotllar rejenerasyon ve yara iyileşmesi çalışmaları için önemli bir model organizmadır.

“Rejenerasyon olmasaydı hayat olmazdı, eğer her şey rejenere olabilseydi ölüm olmazdı” [14] diyerek sözlerine başlayan “Yenilenmenin Temel Prensipleri” kitabının yazarı Richert Gross’a göre tüm canlılar bu iki uç arasında yer almaktadır ve bu durumun üremeye ters etki yaptığını belirtmiştir. Tarihsel olarak, rejenerasyon çalışmaları, yenilenebilen (örneğin, aksolotl) veya yenilenemeyen (örneğin, fare) hayvanlara odaklanılmıştır. İkinci durumda, strateji genellikle rejenerasyonu düzenleyen mekanizmaları anlamayı, rejenerasyonu indüklemek için gereken faktörleri ve tedavileri incelemeyi ayrıca hücresel olayları ve rejenerasyon sürecinde yer alan molekülleri tanımlamayı amaçlamıştır. Semenderler ve balıklar gibi hayvanlarda gerçekleştirilen deneysel çalışmalar, rejenerasyonun önce engellendiği ve ardından rejenerasyonu indükleyen faktörlerin test edilerek rejenerasyonun kurtarılıp kurtarılmayacağına belirlenmesini sağlayan fonksiyon kaybı deneyleri olarak tasarlanmıştır. Bu yol ile rejenerasyon için (örneğin hücresel çoğalma bakımından) gerekli biyolojik ve süreç faktörleri belirlenmiştir. [15]. Mikrobiyomun metodolojik karakterizasyonu hızla gelişmiştir; bu nedenle, kültüre bağlı yöntemler, 16S rRNA gen amplikon tekniği ve shotgun metagenomik dizilimi gibi sıralama analizleri ile değiştirilmektedir. Mikrobiyomun konak mikrobiyomu üzerindeki etkisini analiz etmek için fonksiyonel çalışmalar yürütülmektedir. Canlılar arasında rejenerasyon; 4 ana kategoride incelenebilir: fizyolojik rejenerasyon, hipertrofik rejenerasyon, rejeneratif rejenerasyon ve aseksüel (eşseksiz) üreme.

Fizyolojik rejenerasyon; Kopan veya hasarlı vücut parçalarının ve ölmekte olan hücre gruplarının doğal ve kendiliğinden yenilenmesidir. Doğal olarak meydana gelen fizyolojik yenilenme örnekleri, geyik boynuzlarının yenilenmesi, memelilerin kan hücrelerinin yenilenmesi, bağırsak mukozasının yenilenmesi ve epitel hücrelerinin yenilenmesidir [16], [17].

Hipertrofik rejenerasyon; İç organlardaki dokuların alınması veya kaybolması sonucu meydana gelen onarım veya yenilenmedir. Bu işlemin kısa sürede gerçekleştirilmesi, sistemik hemostazın düzenlenmesi ve sistemlerin organize bir şekilde işlemeye devam etmesi için son derece önemlidir. Karaciğer ve pankreas hücrelerinde gözlenen rejenerasyon, hipertrofik rejenerasyonun bir örneğidir [16].

Reperatif rejenerasyon; Vücudun hasar görmüş veya kaybedilmiş bir bölümünün hücresel düzeyde başlayan ve organ düzeyinde hasarlı parçanın yeniden yapılandırılmasına yol açan süreçtir. Epimorfik rejenerasyon, doku rejenerasyonu ve hücre rejenerasyonu olarak üç grupta incelenebilir. Bu farklılaşma, farklılaşmamış kök hücrelerin ve progenitör hücrelerin bol olduğu yara iyileşmesi sonrası blastema formunun oluşup oluşmadığına göre değerlendirilir [18].

Aseksüel üreme (Eşeysiz üreme), her biri yeni bir organizmayı yeniden oluşturan bir veya daha fazla parçalanmış organizma olarak tanımlanır. Daha çok planaryalar da gerçekleşen bu üreme için Planarya grubu örnek gösterilebilir. Süreç sırasında moleküler ve hücresel seviyede meydana gelen büyük benzerlikler nedeniyle rejenerasyon ile aynı konuya dahil edilmiştir [19].

1.2.1. İnsanda rejenerasyon çalışmaları

Yara bakteriyolojisi üzerinde geleneksel yöntemler kullanılarak yapılan araştırmalar, halihazırda kendini kanıtlamış ve bu karmaşık biyolojik sürece ilişkin önemli bilgiler sağlamıştır. Mikrobiyom temelli yaklaşımlar, kronik yaralar ve yara enfeksiyonu gibi alandaki karmaşık sorunları ele almak için mevcut biyomedikal araç setini başarıyla tamamlar [20]. Yakın gelecekte, mikrobiyom profillemenin nihai hedefi, sağlık tesislerinde yaralanma yönetimini iyileştirmektir. Yara iyileşmesi, farklı adımların sonucu olarak gerçekleştirilir. Birden fazla faktörün bu biyolojik süreci etkilediği gösterilmiştir [21]. İnsan üzerindeki yara mikrobiyom çalışmaları, bu karmaşık süreç hakkında faydalı bilgiler sağlamıştır [22]. Mevcut yara iyileşmesi anlayışımız, insanlar üzerinde yapılan klinik çalışmalardan elde edilen sonuçların yanı sıra fare, zebra balığı

ve aksolotl (ilgili makaleler) gibi yara iyileşmesi ve rejenerasyonunun model organizmasından elde edilen bulgulara dayanmaktadır. Yara iyileşmesi sürecinde mikrobiyomun dinamiklerini anlamak, altta yatan biyolojik mekanizmaları anlamak ve daha iyi yönetim ve tedaviye yönelik etkili çözümler tasarlamak için çok önemlidir. İnsan vücudunda normal bir biyolojik süreç olan yara iyileşmesi, tam olarak ve yüksek oranda programlanmış dört aşamayla sağlanır: hemostaz, iltihaplanma, proliferasyon ve yeniden şekillenme. Bir yaranın başarılı bir şekilde iyileşmesi için, dört aşamanın tümü uygun sıra ve zaman çerçevesinde gerçekleşmelidir. Pek çok faktör, bu sürecin bir veya daha fazla aşamasına müdahale edebilir ve bu da yanlış veya bozuk yara iyileşmesine neden olabilir. İnsanlarda kan, bağırsak epiteli, kemik dokusu, saç ve tırnaklar yüksek dereceli olarak tanımlanabilecek bir dereceye kadar rejeneratif seviyelere sahiptir. Ayrıca karaciğer, böbrek ve deri gibi organ ve organlara etkisi sınırlıdır.

1.2.2. Rejenerasyon ve mikrobiyota ilişkisi

Mikrobiyota, belirli bir ortamda yaşayan bir mikroorganizma topluluğunu (bakteriler, virüsler, arkeler, bakteriyofajlar ve mantarlar) ifade eder. Mikrobiyom ise yerleşik mikroorganizmaların toplu genomunu ifade etmektedir. Örneğin insan bağırsağı milyarlarca bakteriye ve yüzlerce bakteri türüne ev sahipliği yapmaktadır. Sağlıklı bağırsak mikrobiyotası, birçok biyolojik işlevi düzenleyerek (yani sağlam bir bağırsak bariyerini koruyarak, gıdaları metabolize ederek, enerji homeostazıyla dengeleyerek, patojenik organizmaların istilasını inhibe ederek ve bağışıklık tepkilerini modüle ederek) konakçıda sağlıklı bir durumun korunmasında önemli bir rol oynar. Bağırsak mikrobiyotasının (bağırsak disbiyozu) bileşimindeki bozulma, sindirim bozuklukları, obezite, felç, kanser, diyabet, romatoid artrit, alerjiler ve merkezi sinir sistemi hastalıkları dahil olmak üzere bir dizi insan hastalığıyla (mesela multiple skleroz ve Alzheimer hastalığı) ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, son yıllarda vücudun farklı bölgelerindeki bakteri bileşimini belirlemeye yönelik araçlara artan bir ilgi vardır. Yeni nesil sekanslama sayesinde mikrobiyota analiz yöntemi daha güvenilir, yüksek verimlilikli, kolay, yüksek çözünürlüklü mikrobiyal sınıflandırma yapabilir ve düşük maliyetli hale gelmiştir. Dolayısıyla teknik açıdan mikrobiyotanın son zamanlarda bir araştırma alanı olarak gelişmesi ve yaygınlaşması yeni nesil sekanslama sayesinde olmuştur. Canlıların üzerinde ve vücudunun iç bölgelerinde yaşayan mikroorganizmaların tamamı “mikrobiyota” olarak adlandırılmaktadır. Birçok mikroorganizma ile sürekli etkileşim için de olan insan vücudunun da bol miktarda mikroorganizma olması kaçınılmazdır.

Sağlıklı insan vücudunda bulunan ve insanlara zarar vermeden denge içinde yaşamını sürdüren mikroorganizma topluluklarına “mikrobiyota”, bu topluluğun sahip olduğu toplam genetik materyale ise “mikrobiyom” adı verilir, Her iki terim aynı anlamda da (yani birbirinin yerine) bazen kullanılmaktadır. Günümüzde mikrobiyota çalışmaları daha çok bakteriyel topluluklar üzerinde yoğunlaşmaktadır. Virüs ve mantar gibi diğer mikrop toplulukların mikrobiyota kapsamında araştırılması daha nadirdir. Bu yüzden, günümüzde mikrobiyota derken daha çok bakteri topluluğu anlaşılır yani bakteri topluluğu akla gelir. Bu tez kapsamında da araştırma açısından mikrobiyota terimiyle sadece bakterilerin toplamı yani bakterilerin oluşturduğu topluluk kastedilmiştir. Bakteriler dışındaki mikrobiyota bileşenlerin bu tezin kapsamı ve odağı dışındadır. Mikrobiyota, bir ortamdaki tüm mikroorganizmaların oluşturduğu topluluğun bütünüdür. Yukarıda da belirtildiği gibi, mikrobiyota'nın taşıdığı genetik materyale (yani bu tüm bakterilerin DNA'sına) topluca mikrobiyom adı verilir. Mikrobiyom, genellikle çok hücreli konakçı organizmadaki bölgeye özgü bir konumla ilişkili (mesela insan derisi ve bağırsağı gibi), belirli bir ortamdaki toplam mikrop koleksiyonunu temsil eder. Mikrobiyom, deri, ağız, vajina ve bağırsaklar gibi insan vücudunun çeşitli yerlerinde bulunan, birlikte yaşayan, simbiyotik ve patojenik mikroorganizmaların karmaşık ve heterojen bir ekosistemidir. Mikrobiyom, insan hücrelerinden on kat daha fazla mikroorganizma ve insan genomundan yüz elli kat daha fazla gen içermektedir. Bu konuyla ilgili son çalışmalar bize bu mikrobiyal toplulukların insan sağlığı üzerinde beklenenden daha büyük bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Mikroorganizmaların neden oldukları hastalık etkenlerinin saptanması, klinik örneklerin alınması, taşınması, gerektiğinde uygun ortamlarda saklanması, uygun ortamlara ekim yapılması, sonuçların doğru değerlendirilmesi ve doğru tedavinin belirlenmesinde insan mikrobiyotasının bilinmesi ve üye mikroorganizmaların tanınması oldukça önemlidir. İnsan vücudunda veya içinde yaşayan mikroorganizma miktarının insan hücrelerinden on kat fazla olduğu tahmin edilmiştir ve bu mikrobiyota ile, bize tek başına sahip olmadığımız faydalı metabolik ve genetik yetenekler sağlayan karşılıklı bir ilişki içinde bir arada bulunuyoruz. Spesifik olarak, insan mikrobiyotasının sindirim enzimi aktivitesinde rol oynadığı gösterilmiştir, patojen koruması ve vitamin sentezi. Bununla birlikte, bu ilişki zararlı olabilir ve mikrobiyotadaki değişiklikler diyabete yol açabilir, obezite, inflamatuvar barsak hastalığı, kolorektal kanser ve bireyin sağlığını etkileyen diğer birçok hastalık / faktör. Mikrobiyom, mikrobiyotadan genomik bilgilerin toplanmasını ifade eder ve insan mikrobiyomunu hangi organizmaların doldurduğuna ve bunların insan sağlığı üzerindeki

etkilerine ilişkin kompozisyon bilgileri şu anda aktif bir araştırma alanıdır [23]. İnsan mikrobiyomu esas olarak bakteri, mantar, virüs ve bazı ökaryotlardan oluşmaktadır. Bu mikroorganizmaların çoğu gastrointestinal sistemde, deride, solunum sisteminde ve üreme sisteminde bulunmaktadır. Bakterilerin insan vücudundaki sayısı, çeşidi ve dağılımı cinsiyet, hormonal değişiklikler, beslenme düzeni ve kişisel hijyen alışkanlıkları, yaş ve coğrafi bölge gibi faktörlerden etkilendiğinden değişiklik gösterir. İnsan bağırsağı mikrobiyotasına yönelik araştırma ilgisi, İnsan Mikrobiyom Projesi (HMP) ile başlamıştır. HMP, cilt, ağız boşluğu ve gastrointestinal sistem dahil olmak üzere insan vücudunun birçok bölümü çözülmüştür. HMP'nin amacı, insan vücudunun birçok yerindeki mikrobiyota türlerini tanımlamak ve konaktaki patojenik bakterileri ve simbiyotik florayı ayırt ederek mikrobiyota, genotipler, mikrobiyal metabolizma ve konakçının avantaj ve dezavantajlarını incelemektir [1]. Son yıllarda, insan bağırsak mikrobiyotası araştırmaları büyük ilgi görmüştür ve özellikle metagenomik araştırmaların geliştirilmesinden sonra, canlı türleri ve potansiyel uygulamaları hakkındaki anlayışımız arttı. Bağırsak mikrobiyotası çok çeşitlidir ve insan sindirim sisteminde trilyonlarca mikroorganizma içerir. Bağırsak mikrobiyotasının oluşumu ve çoğalması doğumda başlasa da bileşimindeki değişiklik temel olarak çeşitli genetik, beslenme ve çevresel faktörlere bağlıdır. Bağırsak mikrobiyotasının bileşimindeki ve işlevindeki değişiklikler, bağırsak geçirgenliğini, sindirimi ve metabolizmayı ve bağışıklık tepkisini değiştirebilir. Bağırsak florasının dengesindeki değişikliklerin neden olduğu proinflatuar durum, gastrointestinal ve metabolik hastalıklardan immün ve nöropsikiyatrik hastalıklara kadar birçok hastalığa yol açabilmektedir [24]. İnsan bağırsak mikrobiyotasının oluşumu yaşamın erken dönemlerinde, yani doğumdan önce başlar. Bağırsak mikrobiyotası, konakçı organizmanın normal işlevinde önemli bir rol oynar. Bağırsak mikrobiyotası, çeşitli metabolitleri sentezleyebilir ve konakçı ile etkileşim yoluyla insan sağlığı üzerinde olumlu veya olumsuz bir etkiye sahip olabilir. Bağırsak florası, patojenik mikroorganizmaların istilasını önlemek için kararlı bir sistem oluşturarak bağırsak yüzeyinde yaşar ve çoğalır [24]. Mikrobiyotanın koruyucu etkisi, bağırsak yüzeyini istila etmesi ve sistemin stabilitesini sağlayarak patojenik mikroorganizmaların istilasını önlemesidir [25]. Ek olarak, bağırsak mikrobiyotasının metabolik kapasitesi, kısa zincirli yağ asitleri (SCFA) üretmek için anaerobik fermantasyon yoluyla sindirilemeyen bileşiklerin parçalanmasını içerir. Bu fermantasyon ürünleri, bağırsak epitel hücreleri için önemli bir enerji kaynağıdır ve bu nedenle mukozal bariyeri güçlendirebilir [24]. Transkriptom ve mikrobiyota haritasını daha etkili ortaya

çıkarabilen Yeni Nesil Dizilimi teknolojisinin yaygınlaşması yara iyileşmesinde mikrobiyota'nın rolüne dikkat çekmektedir.

1.3. Rejeneratif Model Organizma Olarak Axolotl

Rejenerasyon sürecinde farklı doku ve organların yenilenme kapasitesi farklıdır ve yenilenme kapasitesi organizmanın türüne bağlı olarak değişebilir. Omurgalı canlılar en az rejenerasyona sahip sınıftır. Omurgalılar arasında memelilerde sınırlı düzeyde bir rejenerasyon gerçekleşirken bazı amfibiler sınıfında bulunan omurgalılar yüksek düzeyde bir rejenerasyon sahiptirler. Axolotl, amfibi sınıfının diğer omurgalıları arasında yüksek yenilenme yeteneğine sahip tek organizmadır. Axolotl (*Ambystoma Mexicanum*), olağanüstü rejeneratif kapasitesi nedeniyle kök hücre ve rejenerasyon araştırmalarında umut verici bir model olarak ortaya çıkmaktadır [26]. Deri ve doku hasar gördükten sonra hasar görmüş bölgede bir dizi moleküler ve hücresele olay gerçekleşmektedir. Yara iyileşmesi sürecinde mikrobiyomun dinamiklerini anlamak, altta yatan biyolojik mekanizmaları anlamak ve daha iyi yönetim ve tedaviye yönelik etkili çözümler tasarlamak için çok önemlidir. Semender uzvunun yenilenmesi, 200 yılı aşkın süredir bilinen bir biyolojik mucize olmuştur [27]. Bu büyüleyici biyolojik sorun, birçok bilim insanını, semender uzuvlarının neden yenilenirken insan uzuvlarının bunu yapamadığını açıklamak amacıyla mekanizmaları incelemeye çekmiştir [28]. Aksolotllar diğer semender türlerine göre yakın zamanda evrimleşmişlerdir. Yaklaşık 23cm uzunluğundadırlar. Büyürler ve çeşitli renklerde gelirler ve neredeyse tüm semenderlerin aksine neoteniktirler, yani gençlik özelliklerini yetişkinliğine kadar korurlar asla metamorfoza uğramazlar. Suda yaşamaları, asla karaya çıkmamaları, dış tüylü solungaçlarını ve kuyruk yüzgeçlerini tutmaları ve hareketli göz kapaklarından yoksun olmaları anlamına gelmektedir. Buldukları tüm Meksika göllerinin birkaç ortak noktası vardır. Birincisi, hepsi büyük, nispeten kalıcı su kütleleridir. İkincisi, göller çöllerle çevrilidir ve çoğu durumda bölgedeki tek kalıcı su kütesidir. Üçüncüsü, bu göllerin hiçbirinde tarihsel olarak büyük, yırtıcı balıkların olmamasıdır. Aksolotl hariç omurgasızlar; yassı solucan, hidralar, deniz yıldız. Orijinal benliklerinin küçük bir parçası bile tüm vücutlarını yenileyebilmektedir. Bu hayvanların ortak noktası hepsinin omurgasız olmasıdır. İnsanlar gibi omurgalılarda rejenerasyon, bir yaranın üzerindeki deri veya skar dokusunun yeniden büyümesi oldukça sınırlıdır. İnsanda karaciğer dışında ne organlar ne de uzuvlar yeniden büyüyebiliyor. Aslında neredeyse hiçbir omurgalı insanın yapabildiğinin çok ötesinde yenilenemez. Aksolotl ve semender grubunun diğer

üyeleri hariç uzuvlarını yeniden büyütebilen diğer omurgalılar kurbağalardır ancak kurbağalar tamamen yetişkin formuna döndüklerinde yeteneklerini kaybederler. Aksolotl ömrü boyunca yenilenme yeteneğini korumaktadır [29].

1.3.1. Axolotlda rejenerasyon

Amfibilerde uzuvları doğal olarak yenileme yeteneği, rejenerasyon çalışmalarında dikkate değer bir olgudur. Amfibilerde rejenerasyon, kuyruk ampütasyonu sonrası meydana gelen rejenerasyon ile ilgili ilk gözlemleri 18. yüzyıl İtalyan doğa bilimci Lazzaro Spallanzani'nin anlatımıyla başlar. Bugüne kadar devam eden araştırmalar, bu eşsiz olayın gerçekleşmesinde rol oynayan faktör ve molekülleri bulmaya çalışmıştır [13]. Hipotezler, memeliler sisteminde var olan veya olmayan aktörleri belirlemek ve üzerinde çalışmak için kullanılır. Memelilerde rejenerasyon optimal düzeyde işlev görür. Hasarlı veya ampute kol veya kuyruk kök hücreleri ve farklılaşmamış hücreler ve bu hücrelerin etrafındaki büyümeyi regüle eden transforme edici büyüme faktörü Beta (TGF- β), anteroposterior büyümeyi kontrol eden Sonic Hedgehog ve fibroblast büyüme faktörleri nöronal oryantasyondan sorumludur. Wnt sinyalleri ve rejenerasyonunda görev alan kemik morfojenik proteini, morfogenez, kontrollü büyüme ve farklılaşmada görev alan Hox proteinleri gibi sinyal moleküllerinin rejenerasyonu tetiklediği bilinen kök hücreler ve retinoik asit ile tam bir kol veya kuyruk yapılıdır, ampute parça ile eşleşecek şekilde yeniden yapılandırılır [30]. Aksolotllarda rejenerasyon hayatın her evresinde gerçekleşir ve bilindiği kadarıyla canlının rejenerasyon potansiyeli yetişkinlikte kaybolmaz. Larva dönemindeki rejenerasyon ile ergin dönemdeki rejenerasyon arasındaki fark, ergin dönemdeki rejenerasyon süresinin uzadığını gözlemlenmiştir [31]. Diğer semender türlerine göre yakın zamanda evrimleşmişlerdir. Yaklaşık 23cm uzunluğundadırlar. Büyürler ve çeşitli renklerde gelirler ve neredeyse tüm semenderlerin aksine neoteniktirler, yani gençlik özelliklerini yetişkinliğine kadar korurlar asla metamorfoza uğramazlar. Suda yaşamaları, asla karaya çıkmamaları, dış tüylü solungaçlarını ve kuyruk yüzgeçlerini tutmaları ve hareketli göz kapaklarından yoksun olmaları anlamına gelir. Aksolotlların fonksiyonel ve yapısal proteinlerinin ve sinyal yollarının birçoğunun memelilerinkine benzer olması, aksolotl deneylerinden elde edilen bilgilerin memelilere uygulanma potansiyelini arttırmaktadır. Bu canlılar, ölümcül olmayan herhangi bir hasarı onarabilir ve hasarlı doku veya organı tamamen rejenere etme yeteneğine sahiptir. Bu durum canlının iç organlarında, omurilik ve beyin gibi merkezi sinir sisteminin bileşenlerinde olduğu gibi kuyruk, solungaç ve ön/arka uzuvlarda da mevcuttur [32].

Hasar sonrası yenilenen doku veya organ üzerinde yara izi oluşmaz ve yeniden yapılanan doku veya organ hasar görmeden önceki seviyede fonksiyonlarını yerine getirebilir. Bir aksolotlun bir uzvunu yeniden büyütme şekli, uzvun hayatta kalan hücreleriyle başlar. Uzuv kesildiğinde veya kaybedildiğinde, bir kan pıhtısı kesikteki kanamayı hızla durdurur ve ampütasyon alanını bir hücre tabakası kaplar. Bu kısım bizim iyileşme yöntemimizden çok farklı değildir. Daha sonraki birkaç gün içinde epidermin altındaki hücreler hızla bölünmeye başlar ve blastema olarak bilinen koni şeklinde bir yapı oluşturur. Blastema, yenilenmenin anahtarını elinde tutan şeydir. Normal kemik, kırıldık veya kas hücrelerinin farklılaştığı, yani kimliklerini kaybedip tekrar kök hücrelere dönüştüğü yerdir. Yavaş yavaş hayvan yumurtasında ilk gelişmeye başladığında kök hücrelerin yapacağı gibi kemik, deri ve damarları düzeltmeye başlarlar. Blastemadaki hücreler, bölünmeye devam ederken sınırlar ve kan damarları onu vücudun geri kalanına bağlar. Uzuv sonunda tamamen büyür ve kaybolan uzuv tam bir kopyası gibi görünür.

1.3.2. Axolotlda rejenerasyon ve metamorfoz ilişkisi

Amfibilerin bir semender türü olan Axolotl, yüksek rejeneratif kapasite, düşük kanser insidansı, yara iyileşmesi, uyarılmış metamorfoza girme kabiliyeti ile yaşam boyu yeni doğmuş gibi deneysel olarak onaylanmış özelliklere sahiptir. Bu özellikler yakın zamanda, rejeneratif ve gelişimsel biyoloji için umut verici bir omurgalı model organizma olarak axolotl'in kurulmasına katkıda bulunmuştur [26]. Aksolotlde rejenerasyon ile ilgili güncel çalışmalar, transkriptom ve proteom profillemeye araçları kullanılarak ekstremite ve kuyruk rejenerasyonu sırasında aktive edilen genlerin, gen ağlarının ve yolların tanımlanmasına odaklanmıştır. Bununla birlikte, semenderlerin mikrobik çeşitliliği ve semender ile ilişkili mikrobiyotanın bağışıklık gibi biyolojik süreçler üzerindeki etkisi hakkında çok sınırlı veri bulunmaktadır. Ayrıca, literatürde aksolotl dahil olmak üzere birçok semender türünün mikrobiyal çeşitliliğinin sistematik olarak araştırılması eksiktir. Axolotl kritik derecede tehlike altında olan bir semender türü ve rejeneratif ve gelişimsel biyoloji için model bir organizmadır. Doğada ve tutsak yetiştirilmiş kolonilerde ömür boyu süren yeniliğe rağmen, bu hayvanların metamorfozu, Tiroid hormonları (TH'ler) uygulanarak deneysel olarak indüklenebilir. Tiroid hormonları (TH'ler), metamorfozun başlangıcında ve tamamlanmasında kilit oyuncularındır. TH'lerin doğal birikimi (anuranlarda olduğu gibi) veya uygulanması (aksolotlde olduğu gibi), karasal yaşam koşullarını uyarlamak için organların kritik bir şekilde yeniden düzenlenmesine yol açar [26]. Aksolotllardaki neoteni, metamorfoz geçirmeseler bile cinsel olgunluğa

erişmelerine neden olur. Birçok aksotl ırkı tamamen Neoteniktir veya Neotenik popülasyonlara sahiptir. Evrimsel analizler, aksotllardaki metamorfozun ve yeni türlerin evriminin nedensel faktörünün, tiroid uyarıcı hormonun işleyişini engelleyen bir mutasyon olduğunu göstermektedir. Bu nedenle tiroid üretilmez ve dolayısıyla tiroksin salgılanamaz. Bu, semenderlerin metamorfozunu önler. Dolayısıyla bu, evrim sürecindeki yıkıcı bir mutasyonun bile yeni türler ve tür grupları geliştirebileceğinin en açık örneklerinden biridir. Bir "ara tür" olarak kabul edilirler; çünkü kendilerine bu hormonlar verilirse bir başkalaşım geçirerek gelişimlerini tamamlarlar ve bambaşka bir canlı haline gelirler. Bu canlı aslında onun "yetişkin" halidir. Bununla birlikte, aksotl doğada normal olarak bu yetişkin aşamasına neredeyse hiç ulaşmaz yani neotenik olarak yaşamını tamamlar bu şekilde yani neotenik olarak yaşam sürdürmek üzere evrimleşmişlerdir ve dolayısıyla ilgili yaşam koşullarına adaptasyon sağlamıştır. Aksotllarda metamorfoz oluşturmak için araştırmacılarda tercih edilen iki farklı belli başlı yöntem mevcuttur. Birincisi bu hormonların canlıya intraperitoneal enjeksiyonla uygulanması diğeri ise hormonların canlının yaşadığı ortama (bu durumda suya) enjekte edilmesidir. Önceki çalışmaların çoğu metamorfik sürecin kendisine odaklanırken, araştırmacılar metamorfik aksotlların yenilenme yeteneği araştırılmıştır [31]. Yapılan çalışmalardan da anlaşılacağı üzere metamorfoza uğrayan aksotlda solungaç, pigmentasyon, kuyruk yüzgeci gibi sucul yaşamın ayırt edici özellikleri karasal yaşama uyum sağlamak için yeniden düzenlenmektedir. Söz konusu uyum sürecinin tamamlanması yaklaşık iki ay sürmektedir. Metamorfoz sırasında aksotllun solungaçları ve arka kuyruk yüzgeci kaybı olur ve cilt pigmentasyonuna uğrar [33]. Harici olarak uygulanan farklı dozlarda tiroid bezi konsantrasyonu, metamorfoz sona erdiğinde etki etse de, metamorfoz sürecinde ve metamorfoz ile değişen gen ekspresyonunda etki oluşturmaz [34].

1.3.3. Axotlda rejenerasyon ve mikrobiyota ilişkisi

Tehlike altındaki bir tür olan aksotl, yaşamı boyunca eksik vücut parçalarının tam ve fonksiyonel olarak yenilenmesini sağlayabilen birkaç yetişkin hayvandan biridir. Axotl larva ve yetişkin aşamalarında uzuvlar, kuyruk, beyin, omurilik ve iç organlar dahil olmak üzere ekstremitelerini yenileyebilir. Uzuv kaybedildiğinde çok az kanar ve yara 1 gün içerisinde kapanır. Aksotl rejenerasyonu ile ilgili hücresel ve moleküler araştırmalar için halka açık kaynaklar (örneğin Transkriptom, proteom ve genom verileri) arttı. Buna rağmen, buradaki biriken verilerin kapsamlı bir şekilde yorumlanmasını engelleyen

aksolotl mikrobiyom verileri çok az mevcuttur. Bu alandaki bilgi boşluğunu kapatmak için çalışılmış ve son zamanlarda neotenik ve metamorfik aşamalarda aksolotlun ilk çok organlı mikrobiyom profili incelenmiştir. Bu çalışma iki yaşam evresini mikrobiyom açısından kıyaslamak için yapıldı [26]. (Bu çalışmadan sonraki ayrı bir çalışmada ise neotenik aksolotlda rejenerasyon sürecinde mikrobiyomun uğradığı değişimler araştırıldı [26]. Demircan ve ark. tarafından yapılan bu çalışma kapsamında 16S rRNA gen amplikonlarını dizileyerek, rejenerasyonun farklı aşamalarında (0, 1, 4, 7, 30 ve 60 gün sonra) kesim bölgesi çevresindeki ekstremite dokularının mikrobiyom profillemesi yapıldı ve mikrobiyotadaki değişim gözlemlendi. Sonuç olarak bu bahsedilen çalışmada aksolotl uzuv rejenerasyonu sırasında mikrobiyomunun dinamiği gözlemlendi (Bu bağlamda bu tez çalışması mikrobiyom analizleri söz konusu bu rejenerasyon çalışmasının devamı niteliğindedir).

Rejenerasyonunun genel olarak üç ana fazı şu şekilde özetlenebilir: başlama fazı (0-1 gün), erken faz (4-7 gün), geç faz (30-60 gün). Bu fazlar aşama veya safha olarak da bilinir. Bu ardışık fazlar anatomik ve fizyolojik değişimler bakımından sırasıyla rejenerasyonun şu üç ana fazına karşılık gelmektedir: yara iyileşmesini, farklılaşma (blastema oluşumu) ve yeniden gelişim. Rejenerasyonun en etkili (belirleyici) aşaması erken faz evresidir. Bu faz kol kesildikten (4 cü 7 ci gün) aralığına denk gelmektedir. Bu fazda rejenerasyonun kalbi olarak nitelendirilebilecek bir olay meydana gelmektedir yani blastema dokusu oluşmaktadır. Oluşabilecek olaylar planlanmış ve biyolojik sinyaller gerekli yerlere iletmeye başlanmıştır. Normal hücreler kök hücrelere dönüşmektedir ve kök hücre aktivitesi sonucu dokular oluşmaktadır. Zamanla bir sonraki (üçüncü) safhada ise dokular organları oluşturmaktadır. Aşağıda söz konusu aksolotl uzuv rejenerasyonunun üç fazı hakkında ek bilgiler vardır.

Yara iyileşmesi (Wound healing) fazı: Patternler yakınındaki hücrelere hızla ulaşan ani sinyaller üretir. Bu kimyasal sinyaller keratinosit adı verilen deri hücrelerini 10 – 24 saat içerisinde açık yaranın üzerinde gezinmek için aktive eder yara kenarı mühürlenir ayrıca nötrofiller olarak adlandırılan bağışıklık hücrelerine sinyal verir ve onları enfeksiyonlarla savaşmaya yardımcı olmak için aktive eder. Hücre kalıntıları ve patojenleri temizlemek için hızla çalışırlar. Başka bir aktive edilmiş bağışıklık hücresi türü, memelilerdeki makrofajlardır. Makrofajlar genellikle yara iyileşme aşamasından sonra skar yaratırlar ancak aynı zamanda aksolotl makrofajlarında rejenerasyonu teşvik edici yeteneklere sahiptirler.

Blastema Formasyonu (Blastema Formation) fazı: Makrofajlar yeniden şekillenmesi için diğer hücreleri skarsız iyileşmeyi teşvik etmek ve blastemanın oluşumu ve büyümesi boyunca yaralanmadan sonraki ilk hafta içinde blastemayı oluşturmak için koordine eder ve yönlendirir.

Yeniden Gelişim (Restructuring) fazı: (Patterning and Scaling) olarak da bilinir. Bu fazda rejenerasyon sürecinde ilk günden sonra 2-3 ay geçmiş olur. Bu fazda yeni uzuv aksolotl için doğru boyuta büyümüş olur. Doğru boyuta ulaştığında uzuv büyümeyi ne zaman durduracağını nasıl bildiği bir sır olarak kalır, bilim adamları tarafından cevaplanması gereken birçok soru vardır.

1.4. Biyobelirteçler ve Multi-omik Çalışmalar

1.4.1. Biyobelirteçler

1.4.1.1. Biyoloji ve sağlık bilimlerinde biyobelirteçler

Biyobelirteç, bir organizmanın normal veya anormal biyolojik durumunu ölçerek belirlemeye yardımcı olan biyolojik bir madde, süreç veya olaydır. Biyobelirteçlere örnek olarak belirli biyomolekül, mikroorganizma veya tepkimeler (reaksiyonlar) gösterilebilir. Biyomolekül biyobelirteçler DNA, RNA, miRNA'lar gibi nükleik asitler, enzimler ve reseptörler gibi proteinler, peptitler, antikorlar ve benzeri moleküller olabilir [35]. Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımlamalarına göre biyobelirteç, “vücutta veya ürünlerinde ölçülebilen, hastalığın başlangıcını veya sonucunu etkileyen veya tahmin eden herhangi bir madde, yapı veya süreç” olarak tanımlanmaktadır [36]. Biyobelirteçler kanda, boşaltım ürünlerinde veya vücut salgılarında saptanabilir [35]. Biomarkers Definitions Working Group (Biyobelirteç Tanımları Çalışma Grubu) tarafından tanımlandığı gibi, ölçülebilen herhangi bir biyolojik belirteç, örneğin EKG, kan basıncı, idrar tahlili ve benzeri bir biyobelirteçtir [37]. Günümüzde çok güncel bir konu olan Hassas tıp (Precision medicine) için biyobelirteçler, nispeten yeni bir klinik araç setinin bir parçasıdır. Son zamanlarda önemli araştırmaların ve yatırımların yapıldığı biyobelirteç araştırmaları günümüzde birçok alan için giderek daha da ilgi çekici hale gelmiştir. Böylece biyobelirteç alanı bir disiplinlerarası alana dönüşmektedir. Son teknolojik gelişmeler, ileri ve yenilikçi dizileme teknolojileri ve yeni analitik teknikleri sayesinde kan, idrar ve tükürük gibi vücut sıvılarından önemli sayıda biyobelirteç tanımlanmıştır. Yeni keşfedilen biyobelirteçler, hastalıkları ve sağlık durumundaki değişikliklerin izlenmesi, biyoizleme çalışmaları, risk değerlendirmeleri, klinik teşhis, hastalığın teşhisi

(diagnosis) ve prognozu, ilaç endüstrisi ve daha pek çok alanda kullanılmaktadır. Tıp alanında hastalıkların teşhisi ve izlenmesinde kullanılan biyobelirteçler her geçen gün heyecan uyandırmaya devam etmektedir. Biyobelirteçler konusu, sadece tıbbın tüm alanlarında değil eczacılık alanında da hedefe yönelik ilaçların geliştirilmesinde önemi giderek artan bir konudur. Biyobelirteçler klinik ve subklinik hastalıkların tanısında, tedaviye yanıtın ve prognozun izlenmesinde kullanılmaktadır. Birçok hastalıkta protein ve peptit profillerinin analizi ile doku ve biyolojik sıvılardaki proteinlerin değerlendirilmesi (plazma, serum, idrar, bronkoalveolar lavaj, periton sıvısı, beyin omurilik sıvısı, süt, eklem sıvısı, tükürük, amniyotik sıvı ve benzeri) hastalıkların patogenezini anlamak için kullanılmaktadır. Biyobelirteçler, bulaşıcı hastalıklarda bakteriyel ile bakteriyel olmayan enfeksiyonları ayırt etmek, tedaviye yanıt verme sürecinde ve sonuçların değerlendirilmesinde kullanılmaktadır.

Temel ve klinik araştırmalarda ve klinik uygulamada biyobelirteçlerin kullanımı o kadar yaygın kullanılmaktadır ki, klinik araştırmalarda birincil son nokta karar verici olarak kabul edilirler. İyi derecede karakterize edilmiş çeşitli tedaviler ve popülasyonlarda klinik sonuçları doğru bir şekilde öngördüğü birçok kez gösterilen spesifik mikrobiyal biyobelirteçler için bu kullanımın uygunluğu gösterilmiştir. Biyobelirteç örnekleri, kalp atış hızı ve kan basıncından temel kimyaya ve kan ve diğer dokuların daha karmaşık laboratuvar testlerine kadar birçok etkeni içermektedir [38].

1.4.1.2. Mikrobiyal biyobelirteçler

Mikrobiyal biyobelirteçler, büyük ölçekli biyomedikal araştırmalarda temel bir rol oynamaktadır. Ölçülebilir biyolojik süreçler ve klinik sonuçlar arasındaki ilişkiyi anlamak, tüm hastalıklar için tedavi cephanemizi genişletmek ve normal, sağlıklı fizyoloji anlayışımızı derinleştirmek için kritik öneme sahiptir [39]. Mikropların biyobelirteç olarak son zamanlarda daha çok dikkat çeken bir hedef haline gelmiştir. Bu kapsamda birçok biyolojik süreçte ve hastalıklarda mikrobiyal biyobelirteçlerin keşfi ve etkili bir şekilde kullanımı önem arz etmektedir. Mikrobiyom alanındaki gelişmeler bu çabalara büyük katkı sağlamaktadır. Bazı alanlarda mikrobiyal biyobelirteçler hususunda kayda değer ilerlemeler sağlanmıştır. Bu alanlara örnek olarak inflamatuvar bağırsak hastalıklar (inflammatory bowel disease; IBD), kolorektal kanser (colorectal cancer; CRC) ve otizm spektrum bozukluğu (autism spectrum disorder; ASD). Rejenerasyon alanında ise mikrobiyal biyobelirteçler çok az çalışılmıştır. Aksolotl kol rejenerasyonu alanı da mikrobiyal biyobelirteçler açısından önemli potansiyele sahiptir. Buradaki

araştırma boşluğu hala büyük ölçüde doldurulmayı beklemektedir. Aksotl kol rejenerasyonun bağlamında mikrobiyal biyobelirteç keşfi ve karakterizasyonu bu yönde yapılacak yoğun ve etkili çalışmalara bağlıdır.

Mikrobiyal biyobelirteçler inflamatuvar bağırsak hastalıklarının patogeneğinde çok yönlü roller oynamaktadırlar. Yapılan moleküler analizler, taksonomik üyelerin ve mikrobiyal ürünlerin inflamatuvar barsak hastalığında rol oynadığına dair birçok olumlu kanıt ortaya koymuştur, ancak klinik biyobelirteçler olarak kullanımları henüz başlangıç aşamasındadır. Büyük bir ilerleme kaydedilmiş bir araştırma alanı olan inflamatuvar bağırsak hastalığı alanında mikrobiyal biyobelirteç türlerin tanımlanması ve valide edilmesi özel bir yere sahiptir. Bu hastalık bağlamında bu tür biyobelirteçler şu amaçlar için kullanılabilir: hastalık durumunun ve fenotipin tesbiti (tanı), tedavinin seçimi ve prognoz [40].

Kolorektal kanser, kanserin ikinci önde gelen nedeni olarak gösterilmektedir. Kolorektal kanserin saptanması ve prognozu için hassas, invaziv olmayan ve uygun maliyetli yöntemler geliştirmeye ihtiyaç duyulmaktadır. Faydalı konak işlevlerine ek olarak, bağırsak mikrobiyotasının karsinogeneizde rol oynayan kilit bir rol olduğuna dair birçok kanıt bulunmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda kolorektal kanser de tanımlanan prognostik mikrobiyal ile ilişkili belirteçler incelenmiştir. Fekal ile ilişkili mikrobiyota, kolon kanseri ile dinamik olarak bağlantılı olabileceği sonucuna varılmıştır [41].

Otizm spektrum bozukluğu, davranışsal ve sosyal bozuklukların yanı sıra gastrointestinal anormallikler, diş ve alerji gibi birden fazla durumla karakterize edilmiş karmaşık bir nörolojik ve gelişimsel bozukluktur [42]. Otizm spektrum bozukluklarının teşhisi için birkaç mikrobiyal belirtecin yararı araştırılmıştır ve ağ analizi kullanılarak ağız ve bağırsak mikrobiyotası arasındaki ilişki incelenmiştir. Otizm spektrum bozukluğunu ve komorbidite (ek hastalık) durumlarını teşhis etmek için mikrobiyal belirteçlerin geliştirmesi ve uygulanması hedeflenmiştir. Bu hedef gerçekleştiği takdirde tedavi alanında faydalı ipuçların sağlanacağı beklenmektedir [42].

1.4.1.3. mRNA biyobelirteçler

Tıp alanında mRNA transkriptleri, çeşitli hastalıkların tanı ve tedavisi için moleküler biyobelirteçler olarak geliştirilmektedir. Bu ve bunun gibi biyobelirteçler, hastalığın ilerlemesini daha erken ve daha doğru bir şekilde tahmin ve teşhis etmede ayrıca risk altındaki kişileri belirleme yeteneği sağlamaktadır. Mikroarraylerin kullanımı ayrıca geleneksel biyobelirteçlerle ilişkili olduğu bilinmeyen ortogonal (ilgisiz) biyobelirteçleri

tanımlama fırsatı da sağlamaktadır [43]. RNA ekspresyonu düzeyinde biyobelirteçleri saptamak için çeşitli yöntemler kullanılır. Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RTqPCR), gen ekspresyonunun seri analizi (Serial Analysis of Gene Expression; SAGE) ve mikrodizi analizi kullanılan yöntemlerden bazılarıdır. RNA'lar yalnızca genetik bilginin taşıyıcıları olarak değil, aynı zamanda transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası düzenlemenin öznelere olarak da hizmet eder. RNA'ların çok küçük seviyedeki bollukta saptanması ve ölçülmesi de kolaydır. Yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda, yeni nesil dizileme teknolojisi ile genom düzeyinde RNA ekspresyon düzeylerinin niceliksel ölçümlerini kolaylaştırıyor olarak görülmektedir. RNA'nın kapsamlı ekspresyon profilleri hem genetik hem de dinamik düzenleyici bilgiler sağlamaktadır ve bu nedenle hücrel durumun kesin ve doğrudan biyobelirteçler olarak işlev görebilir [44]. Fenotipi belirleyen genetik bilginin statik bir görünümünü sağlayan genomların aksine, genom transkripsiyonu dokular, gelişim aşamaları ve hastalık durumları arasında değişiklik göstermektedir. Bu nedenle, genlerin iç ve dış koşullara yanıt olarak nasıl düzenlendiğini anlamak için transkripsiyonel varyasyon bilgisi esastır. RNA dizilimi (RNAseq) ve tüm transkriptom mikrodizileri gibi modern transkripsiyonel teknikler, transkriptomun kapsamlı ve doğru bir görünümünü keşfetmek için uygulanmıştır [45].

1.4.2. Multi-omik çalışmalar

Multiomic bir çalışma, farklı deney türleri ve artan boyutlar nedeniyle genellikle çok farklı veri modalitelerine sahip veri kümelerine sahip olmak anlamına gelmektedir. Multiomic bir iş akışında (RNA, proteinler veya metabolitlerin profilini çıkarırken), RNAseq girişimlerinin transkriptom veri kümesi, yüzlerce ila binlerce transkript oluşturabilmektedir. Multiomik, farklı omik seviyelerde (örneğin genom, proteom, mikrobiyom gibi çok kapsayıcı boyutlarda) düzenleyici birimleri ortaya çıkararak biyolojik süreçlerde yer alan moleküler belirteçleri tanımlamayı amaçlar [46]. Her hasta için özel tıbbi hedef tedavi ve yönetimi ile bireyselleştirilmiş bir sağlık modeli öneren yeni bir kişiselleştirilmiş tıp dönemi geldi [47]. Bu rejim altında, sadece hastaların klinik profilleri değil, moleküler profilleri de ileri tedavi için kişisel olarak yönetilmektedir. Multi-omik analizlerden elde edilen detaylı bilgiler, Hastalıkların altında yatan mekanizmalarını anlamada, erken tanıyı kolaylaştırmada, kişiye özel tedavi stratejileri seçmede ve etkinliklerini değerlendirmede büyük potansiyele sahiptir.

1.4.2.1. Multi-omik veri madenciliği

Moleküler biyolojide çığır açan yüksek verimli analizi (high throughput analysis) tekniklerinde gün geçtikçe daha yaygınlaşmakta ve ileriye seviyeye taşınmakta. Bu bağlamda son on yılda mikrodizin metotları yerlerini büyük ölçüde yeni nesil sekanlamaya bırakmıştır. Standart yeni nesil sekanslamada da en yaygın kullanılan metot Illumina platformudur. Yeni nesil sekanslama sayesinde omik çalışmalar daha da hız kazandı ve daha çeşitli hale geldi. Epitranskriptom ve metatranskriptom omik sınıfına sonradan katılan omik çeşitlerine örnek olarak verilebilir. Yeni nesil sekanslamayı tamamlayıcı bir unsur olarak proteom alanında da büyük gelişmeler katedildi. Son yıllarda ise multi-omik (çoklu omik) yaklaşımı yenilikçi bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır. Bu gelişmelere paralel olarak, biyomedikal veri analizine yönelik makine öğrenimi uygulamaları da gelişiyor ve gereksinimlere uyum sağlıyor. Multi-omik veri analizi ve makine öğreniminin entegrasyonu, yeni mikrobiyal biyobelirteçlerin keşfedilmesine olanak sağlamaktadır. Son yıllarda araştırmalar sonucunda, Hassas tıp, veri madenciliği (data mining) ve tahmine dayalı algoritmalar, biyoinformatik ve tıp gibi disiplinler arası alanlarda büyük önemli ilerleme kaydedildi [48].

Multi-omik teknolojileri verilerin elde edilmesinde yeni bir çığır açarken, veri madenciliği ve makine öğrenmesi (Machine learning; ML) de bu verinin işlenmesinde ve anlamlandırılmasında yazılım ve analiz altyapısını sağlıyor. Makine öğrenmesi algoritmaları, genellikle onları oluşturan süreçler ve modeller hakkında özel bilgiye ihtiyaç duymadan, yapılarını ve ilişkilerini öğrenmek için verileri parçalara ayırmaktadır [49]. Makine öğrenmesi tekniklerinin gücü, verilerin boyutu ve kalitesiyle orantılıdır. Bu kapsamda Dizileme ve diğer yüksek verimli moleküler teknolojiler, pahalı olmayan, tekrarlanabilir bir şekilde çok miktarda yüksek kaliteli veri üretebilir. Dolayısıyla bu deneysel teknikler herhangi bir organizmanın daha benzeri görülmemiş bir sistem düzeyinde araştırılmasına izin verir. Çeşitli kaynaklardan gelebilen bu veri kümeleri, ekipman ve deney ortamları, çoğunlukla makine öğrenmesi düşünülerek oluşturulmadıkları için hesaplamalı modeller ve makine öğrenimi yöntemleri için makine öğrenmesinde girdi veri olarak direkt kullanıma hazır olmayabiliyor. Bu nedenle, çok sayıda heterojen multi-omik veriyi işleyen, normalleştiren, entegre eden ve daha fazla analiz ve makine öğrenmesi için bir uygulama alanı olarak kullanılacak birleşik özetlere dönüştüren yöntemlere ihtiyaç duymaktadır [49]. Makine öğrenimi ve sistem genomu (Machine Learning and Systems Genomics; MLSG) yaklaşımları, veri

madenciliği ve öngörücü algoritmalar kullanarak multi-omik verilerinden çoklu veri türlerini bütünleştirerek, MLSSG yaklaşımlarının fenotip-genotip ilişkilerinin yalnızca tek bir veri türünü kullanan bir analizden daha anlamlı bir yorumunu destekleyebileceğine işaret etmektedir. Bu nedenle, yeni nesil çoklu omik verileri kullanarak belirli bir nicel veya kategorik fenotipin tahminini üretebilen (yani regresyon ve sınıflandırma yapabilen) MLSSG yazılım çerçevelerinin (software frameworks) geliştirilmesine bir ihtiyaç vardır [50].

Çoklu omik veri entegrasyonu, Hassas tıp çağındaki en büyük zorluklardan ve aynı zamanda en büyük fırsatlarından biridir. Multi-omik yaklaşımlara imkân tanıyan bir diğer husus ise yüksek verimli çalışmaların ürettiği büyük biyolojik verilerin ilgili veri tabanlarında toplanması, birikerek artması ve büyük ölçüde erişime açık olmasıdır. Multi-omik yaklaşımların veri madencilik boyutundaki ilerlemeye şu örnek verilebilir: Klinik sonuç tahminini iyileştirmek için bir dizi yazılım aracı geliştirilmiştir ve geliştirilmeye devam etmektedir. Konunun daha iyi anlaşılması için multi omik veri entegrasyonu alanında şimdiye kadar geliştirilen kapsamlı araçları özetleyen yeni derleme yayınlara ihtiyaç bulunmaktadır. Bir multi-omik çalışmada hastaların sağ kalımı üzerine tahminlerde de bulunulmuştur [51]. Multi-omik çalışmaların yaygınlaşmasıyla multi-omik veri madenciliği de gelişip daha kompleks hale gelecektir. Bu ilerlemelerin rejenerasyon alanına da yansımaları olacaktır. Sonuç olarak gittikçe artan ihtiyacı karşılamak için multi-omik veri madenciliğinde daha çok akademik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Modern ve yüksek verimli omik ölçüm platformlarının geliştirilmesiyle, biyomedikal araştırmalar, biyolojik sistemi daha iyi anlamak için bu verilerden tam olarak yararlanmak için entegre (birleşik) bir yaklaşım benimsemelidir. Yeni deneysel tekniklerin ortaya çıkmasıyla elde edilen farklı omik verileri yeni biyobelirteçlerin keşfedilmesine olanak tanır. Makine öğrenmesi ise keşifte multi-omik verileri entegre etmek ve analiz etmek için kullanılır [52]. Multi-omik çalışmalar ile biyolojik süreçlerin altında yatan mekanizmayı belirlemek veri analizi, yorumlama ve görselleştirmeye yardımcı olmak ve daha fazla omik veri setlerini birleştirmek ve multi-omik analizlerinde istatistik ve makine öğreniminin uygulanması hedeflenmiştir [46].

Çalışmalarda elde edilen transkriptom örneklerinin veri boyutları değişebilmektedir. Bazı durumlarda terabayt boyutunda veri dosyaları oluşturabilir. Önemli türler arası varyasyona sahip bu veri dosyası boyutları, biyolojik olarak anlamlı multi-omik verileri entegre etmeyi zorlaştırır. Buradaki büyük veri kümeleri, biyolojik süreçlere, olaylara ve

hastalıklara dönüştürücü iç görüler sağlamak için çeşitli hesaplamaları kullanmak için çok daha iyi bir çözümlüğünde hücrel sistemlere benzeri görülmemiş bilgiler sağlamak amaçlanmıştır [53].

1.5. Amaç

Son zamanlarda yapılan yoğun mikrobiyota araştırmalarına rağmen bakterilerin yara iyileşmesine ve daha genel anlamda rejenerasyona etkisi ve bunun altında yatan moleküler mekanizmalar hala tam anlamıyla bilinmemektedir. Özellikle hangi bakteri türlerinin bu biyolojik süreçte biyobelirteç ve modülatör olarak kullanılabilceği konusu heyecan uyandırmakla beraber hala aydınlatılmayı bekliyor. İnsan üzerindeki çalışmalara ek olarak, rejenerasyon alanında gittikçe önem kazan bir model organizma olan aksotl yara iyileşmesi konusunda tamamlayıcı bilgiler ve kritik ipuçları sunmaktadır. Yara iyileşmesi aksotl kol rejenerasyonunda üç ana aşamadan biri olduğu için kol rejenerasyonuna yoğunlaşan araştırmalar yara iyileşmesine da ışık tutmaktadır. Bu çalışmanın ana hedefi olarak aksotl kol rejenerasyonu alanında mikrobiyota ve transkriptom verisinin veri madenciliği vasıtasıyla yeni aday biyobelirteçlerin keşfi belirlenmiştir. Bununla birlikte, bu çalışma yara iyileşmesi alanındaki söz konusu boşluğu doldurmaya yönelik bir adım olarak da düşünölmüştür. Bu çalışmada bulunan yeni aday belirteçler gelecekte insanlarda yara iyileşmesi çalışmalarında kullanılabilir mi? sorusunun cevabı da aranmaktadır. Neticede bu araştırmada aksotl kol rejenerasyonunun her aşamasını daha iyi anlamak için ilgili aksotl araştırmalarından elde edilen boylamsal mikrobiyota ve transkriptom verilerinin analizi öne çıkarıldı. Her iki veri türünün öncelikle ayrıntılı olarak ayrı ayrı incelenmesi, akabinde ise anlamlı farklılık gösteren değişkenleri saptanması hedeflenmiştir. Uygulanan çeşitli veri madenciliği metotlarıyla daha önce ulaşılmayan bulgulara ve kapsayıcı bakış açısına elde edilmesi amaçlanmıştır. Tespit edilen aday biyobelirteçlerin daha iyi anlaşılması için takip çalışması olarak aksotlda fonksiyonel olarak validasyon ve karakterizasyonu çalışmaları yapılabilir. Buradan da olumlu sonuçların çıkması durumunda bu yaklaşımı ile bulunan yeni aday belirteçler gelecekte insanlarda yara iyileşmesi çalışmalarında kullanılabilir. Uzun vadede bu çalışma ve bu tarz çabaların hem genel olarak rejenerasyonun daha iyi anlaşılmasına, hem de insandaki translayonel çalışmalara katkı sağlamayı öngörülmektedir. Beklenen bulgulara ek olarak, bu çalışma ile aksotl kol rejenerasyonu alanında daha önce hiç uygulanmayan bazı makine öğrenme yöntemlerinin uygulanması da önemli bir gelişme olarak düşünölmüştür. Bu yönden tatbik edilen veri

madenciliği yöntemi bu alanda yenilikçi bir yaklaşım teşkil etmektedir. Mikrobiyota alanında ileri biyoistatistiksel metotlar ve son araçlar kullanılarak yeni ipuçların yakalanması mümkün görünmektedir. Diğer ilgili alanlarda olduğu gibi, rejenerasyon alanında da ileriki zamanlarda multiomik veri üretimi ve analizi önem kazanması beklenmektedir. Böylelikle mikrobiyota verisiyle diğer omik veri türlerinin beraber kullanımını yeni fırsat ortaya çıkmıştır. Bu tür kompleks, çok boyutlu verinin analizini sağlayacak çözümler aktif ve güncel bir çalışma alanıdır. Tamamlanan bu tez çalışması bu bakımdan gelecekteki veri analizi çözümlerine ön hazırlık olarak değerlendirilebilir. Özet olarak bu çalışmanın hem bulgu hem metodoloji açısından aksolut kol rejenerasyonu alanında, özellikle de biyobelirteç keşfine yönelik katkı sunmak için tasarlanmıştır.



BÖLÜM 2

2. TEORİK KISIM

2.1. Mikrobiyota Veri Analizinde Kullanılan Metotları

2.1.1. Mikrobiyota alanındaki biyoistatistiksel metotlara genel bakış

İnsan bağırsağı, gıda metabolizması, enerji geri kazanımı ve bağışıklık sistemi düzenlemesi gibi fizyolojik fonksiyonları destekleyen milyarlarca bakteriye ev sahipliği yapmaktadır. Çevresel ve genetik etkenler mikrobiyal topluluğu bileşimini etki yapabilir dolayısıyla hastalık fenotipleriyle ilişkili mikrobiyal toplulukların saptanması, mikrobiyomun sağlık ve hastalıktaki işlevini belirlemede ilk adımdır. Mikrobiyal topluluk profili oluşturma için 16S rRNA gen dizilemesinin kullanılması, mikrobiyal araştırmaların ilerlemesine yardımcı olmuştur. Yaygın olarak kullanılmasına rağmen, 16S rRNA tabanlı taksonomik profil analizi amacıyla oluşturulmuş tek tip bir protokol yoktur. Belirli bir biyolojik numunedeki bakteri çeşitliliğini karakterize etmek için, yüksek çözünürlükte daha uzun okumaları sıralama yeteneği ile basit, yüksek çözünürlüklü bir yöntem gereklidir. Sıralama teknolojilerindeki ilerlemeler, bu zorlukların bazıları için çözüm bulunmasında destek sağlamıştır. Halihazırdaki sıralama teknolojisi, veri analiz aşamasında R programı tabanlı Bölücü Amplicon Gürültüsünü Giderme Algoritması 2 (Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2; DADA2 gibi kolayca bulunabilen katsayı analizi boru hattı ile birleştirilmiş, yüksek çözünürlüklü mikrobiyolojik profil oluşturmaya yardımcı olmuştur, çünkü DADA2 dizileri tür ve cins düzeyinde belirleyebilmektedirler. Yaygın bir yaklaşım olarak, Yeni Nesil Sekanslamada (Yeni Nesil Dizilim) tekniği ile deney (wet lab) aşamasında 16S rRNA geninin V3-V4 bölgesinin iki aşamalı amplifikasyonu yapılarak bakteri profili oluşturulur. Ardından ise biyoinformatik analizi (dry lab) aşamasında ücretsiz olarak temin edilebilen analitik araçları (mesela DADA2, QIIME, mothur ve METAGENassist) kullanılarak ham veri analizi gerçekleştirilir. Ham veri analizinden sonraki (downstream)

aşamasında ise Phyloseq ve MicrobiomeAnalyst gibi ayrı biyoinformatik çözüm araçları kullanılır. Bu pratik ve kapsamlı iş akışı, mikrobiyal profillemeye çalışmalarını yapmakla ilgilenen araştırmacılar için kullanışlı bir çözüm olarak karşımıza çıkmaktadır [54]. Son yıllardaki biyoteknolojik gelişmeler sayesinde mikrobiyotaya analizi nispeten daha hızlı ve fiyat bakımından daha uygun hale gelmiştir. Hızla artan verinin analizi her biri ayrı bir istatistiksel metoda dayanan birçok basamaktan oluşmaktadır. Günümüzde yaygın olarak kullanılan mikrobiyotaya verileri Yeni Nesil Sekanslama tekniğiyle üretilmektedir. Bu tarz veriler ise Büyük Veri niteliğine sahip oldukları için bunların analizi için ileri istatistik metotlara ihtiyaç duyulmaktadır. Yeni Nesil Dizileme (NGS) alanındaki son biyoteknolojik gelişmeler, biyoinformatik ve paralel hesaplama alanındaki ilerlemeler ile birleştiğinde, mikrobiyal toplulukların uygun maliyetli hızlı profillenmesi sağladı. Ayrıca sağlıklı ve hastalığı konak-mikrobiyom etkileşimlerinin daha iyi anlaşılmasına yol açmıştır. Buna göre, yara mikrobiyomunun incelenmesi de son yıllarda hız kazandı. Yazılım açısından verinin analizi biyoistatistiksel paketlere dayanmaktadır. Bu paketler yerel bir bilgisayarda kullanılabilmesi gibi, çevrimiçi sunuculardaki platformlar üzerinden ara yüzler vasıtasıyla da çalıştırılabilir. Paketler ve platformlardan oluşan araçların sağladığı çözümler veri analizinin altyapısını oluşturmaktadır. Genetik alanındaki gelişmelere ayak uyduran biyoistatistik metotların ve ileri araçların aksotl kol rejenerasyonu alanında kapsamlı bir şekilde uygulanması bu tez çalışmasının metodolojik alt yapısını oluşturmaktadır. Biyoinformatik alanında yapılan metodolojik çalışmalar daha hassas ve kesin sonuçlar veren formüller ve yöntemler üzerinde yoğunlaşmaktadır. Araçlar konusuna gelindiğinde ise uzmanlar hızlı algoritmalar, güvenilir sonuç üreten paketler ve dayanıklı pipelineler üzerinde yoğunlaşmaktadırlar. DNA dizileme yapabilmek için birkaç farklı yol vardır. Birinci seçenek shotgun dizilemesi, burada tüm DNA'yı ve dizi en çok burada öğütülüyor. Olabildiğince küçük parçalar elde ediliyor ve bunlar çok kısa olma eğilimindedirler. 100 ya da 200 nükleotid uzunluğundadır. İkinci seçenek 16S dizileme, tüm organizmalarda var olan ribozom ayırt edici bir özelliktir. Ribozom aslında birkaç RNA dizisinden oluşan bir bloktur ve birkaç düzine daha küçük protein tarafından dekore edilmiştir. Ribozom, genomdan kopyalanmış RNA parçalarını alır çiğneyip diğer taraftan aminoasitleri dışarı atar. Tüm organizmalar ribozoma sahiptir fakat insanların asıl odaklandığı şey, bu ekstra uzun nükleotid 16S özel genidir. Çoğu DNA dizisi çok uzun olduğu için genomu kapsayan bir sekanslama yapmak nispeten zordur. Bu yüzden tüm DNA dizi sekanslaması (whole-genome sequencing) yerine marker (belirteç) olarak kabul edilen bir kısma

yoğunlaşmak ve burada birkaç yüz bazlık bölümü sekanslamak pratik bir alternatiftir. 16S rRNA geninin sekanslanması da bu bağlamda yaygın olarak kullanılmaktadır. 16S rRNA genindeki V3-V4 alanı bu gendeki korunmuş (conserved) bir bölge olup DNA'da nisbeten küçük (kısa) bir bölgedir. Bu bölge ile ilgili elde edilen sekanslar (diziler) analiz aşamasında benzerliklerine göre gruplandırılır (classification yapılır). Birbirine çok benzeyen gruplar, bir grup içinde yerleştirildikten sonra kendi aralarında benzerlik göstermektedir. Bu benzerlik genelde en az %97 oranında oluşmaktadır. QIIME ve Mothur gibi nispeten daha alışlagelmiş (geleneksel) metotlarla elde edilen bu grupların her birine OTU (Operasyonel Taksonomik Birim), ilgili tabloya da OTU tablosu denilmektedir. DADA2 metodu kullanıldığında ise OTU'lar yerine ASV'ler, OTU tablosu yerine ise ASV tablosu elde ediliyor (DADA2 metodu bahsedilen 2 metoda göre daha yeni ve genellikle daha ileri kabul ediliyor). OTU veya ASV tabloları girilen veriler özelliklerini taşırlar ve birçok mikrobiyom veri analizinin temelini oluştururlar. Hastalık veya sağlıkla ilgili hangi OTU'nun hangi ASV'nin ilişkili olabileceğini belirlemek mümkündür. Her bir OTU'nun hangi taksonomik gruba karşılık geldiğini araştırmak mümkündür. Bunun için ilgili veri tabanda bu OTU ile ilgili yeterince bilginin olması gerekmektedir.

Veri madenciliği (Data Mining) son 10 yılda dünya çapında popülerlik kazanan disiplinler arası bir disiplin olarak ortaya çıkmaktadır. Günümüzde verilerin yaygınlaşması bilgisayarların yaygınlaşması ve ilgi toplumuna doğru atılan adımlar bu konuyu disiplinin merkezine yerleştirecektir. Yurtdışında yaygın olarak kullanılan bir alan olan veri madenciliği ülkemizde yeni uygulanmaya başlanmıştır ve öğrenilmeye çalışılmaktadır. Veri madenciliğinde kullanılan verilerin kalitesi de sonuçları etkileyeceğinden kullanılacak verilerin önceden işlenmesi son derece önemlidir. Kaliteli veriler nihayetinde kaliteli sonuçlar üretecektir. Veri kalitesi ön işleme ile artırılarak veri kalitesinin artırılması sağlanabilmektedir. Veri kalitesi veri madenciliğinde önemli bir konudur. Veri madenciliğinin güvenilirliğini artırmak için veri ön işleme yapılması önerilir. Aksi takdirde hatalı girdi verileri hatalı çıktı ile sonuçlanacaktır. Veri ön işleme çoğu durumda zaman alan ve yarı otomatik bir veri keşif aşamasıdır. Veri miktarındaki artış ve dolayısıyla büyük miktarda veriyi önceden işleme ihtiyacı otomatik veri ön işleme için verimli teknikleri önemli hale getirmiştir. Veri ön işleme için birçok teknik kullanılmaktadır. Bunlardan biri olan veri temizleme verilerdeki gürültüyü gidermek ve tutarsızlıkları düzeltmek için uygulanmaktadır. Başka bir teknik olan veri entegrasyonu farklı kaynaklardan gelen verileri tek bir tutarlı veri tabanında birleştirmektedir. Verinin

doğasına ve durumuna göre normalizasyon gibi veri dönüştürme yöntemleri de uygulanabilmektedir. Veri indirgeme, bazı gereksiz değişkenlerin kaldırılmasını ve bunların birleştirilmesini veya gruplandırılarak verilerin boyutunun azaltılmasını içerir. Veri madenciliği öncesinde veri ön işleme teknikleri uygulanarak elde edilen sonuçların kalitesi artırılmaktadır.

2.1.2. Mikrobiyota veri analizinde ASV metodunun kullanılması

OTU kümeleme yaklaşımları, benzer dizileri soyutlanmış bir konsensüs dizisine bulanıklaştırmaya çalışırken, böylece okuma havuzundaki sıralama hatalarının etkisini en aza indirir. Amplikon Dizisi Varyantı (ASV) yaklaşımı kümeleme işlemine farklı bakış açısıyla ve çözüm önerisiyle tasarlanmıştır. ASV yaklaşımı, hangi tam dizilerin okunduğunu ve her tam dizinin kaç kez okunduğunu belirleyerek başlayacaktır. Bu veriler, belirli bir frekanstaki belirli bir okumanın sıralayıcı hatasından kaynaklanmama olasılığını belirlemek için benzer okumaların karşılaştırılmasını sağlayan sıralama çalışması için bir hata modeliyle birleştirilecektir. Bu, özünde, her bir tam dizi için bir p değeri oluşturur; burada boş hipotez, sıralama hatasının bir sonucu olan tam diziyeye eşdeğerdir. Bu hesaplamanın ardından, diziler, güven için belirli bir eşik değerine göre filtrelenir ve tanımlanmış bir istatistiksel güvene sahip kesin dizilerin bir koleksiyonunu geride bırakır. Bunlar kümelenme veya referans veri tabanları olmadan oluşturulan kesin diziler olduğundan, ASV sonuçları aynı hedef bölgeyi kullanan çalışmalar arasında kolayca karşılaştırılabilir. Ek olarak, belirli bir hedef gen dizisi her zaman aynı ASV'yi üretmelidir ve kesin bir dizi olan belirli bir ASV, tür seviyesine ve hatta potansiyel olarak ötesine kadar daha kesin tanımlamaya izin veren çok daha yüksek bir çözünürlükte bir referans veri tabanı ile karşılaştırılabilir [55]. ASV yaklaşımı, zor örneklerle çalışırken veya hedeflenen dizi analizini veya genel olarak mikrobiyom analizini etkileyen yaygın karmaşık durumları düzeltmeye çalışırken birçok avantaj sunar. ASV yaklaşımı, mikroorganizmaların daha kesin tanımlanması için önemli bir avantaj sağlayabilir. Ayrıca bir örnek içindeki çeşitliliğin daha ayrıntılı bir resmini sağlayabilirler. ASV yöntemi, kendi avantajları ve dezavantajları ile analiz için bir dizi oturmuş (nitelikli) biyoinformatik uygulamasına sahiptir. Topluluk, çalışmalar arasında daha tekrarlanabilir ve karşılaştırması daha kolay yöntemlere doğru ilerledikçe ASV yönteminin önemi artacaktır [55][56][57].

Mikrobiyom veri analizi başlıca şu üç ana aşama olarak özetlenebilir: Ham veri analizi, orta aşama ve downstream. Diğer bir ifadeyle mikrobiyom veri analizinde iş akışı bu üç

ana aşamadan oluşmaktadır. Ham veri analizi aşamasında önce kalite kontrolü, sonrasında ise esas ham analizi yapılır. Illumina bazlı Yeni Nesil Sekanslama (NGS) metoduyla üretilen ham veri FASTQ formatındadır. FASTQ dosyaları örneklerin ham okuma (read) verilerini içerir. Ham veri analizi kendi içinde şu alt basamakları içerebilir: kalite kontrolü, okumaların kırılması (trimming) ve gürültülü (noisy) okumaların atılması (discarding). Orta aşamada da şu üç kritik adım gerçekleştirilir: kümeleme (clustering), taksonomik sınıflandırma (taxonomic clustering) ve bolluk tablosunun oluşturulması. Örneğin bir önceki yayınlanmış çalışma [2] sonucu bu basamak sonrasında bir ASV bolluk tablosu oluşturuldu. Ham veri analizi ve orta analiz aşamasında kullanılan boru hattı (pipeline) DADA2 olduğu için ortaya çıkan bolluk tablosu bir ASV bolluk tablosudur. Bolluk tablosundan itibaren gerçekleşen analizler genellikle downstream (akıntı yönünde aşağı seviyesinde) basamağı kapsamında ele alınır. Bu isimlendirmenin nedeni ham veri analizi basamağına ve sonrasında orta basamağı (örneğin taksonomik sınıflandırma) göre bu üçüncü basamağın iş akışında sıralama olarak daha aşağıda olması. Bu tez çalışmasında başlangıç noktası olarak daha önce yayınlanmış bir ASV bolluk tablosu seçildi. Dolayısıyla bu tez çalışmasında seçilen ASV bolluk tablosu mikrobiyom veri analiz için girdi olarak kullanılmıştır. Bu bakımdan downstream analiz aşamasında uygulanabilecek ileri analiz metotları bu çalışmada etkin bir şekilde uygulandı. Aşağıda söz konusu metodoloji hakkında detaylı açıklamalar verilmiştir.

2.1.3. ASV tablosunun incelenmesi

Bir OTU veya ASV bolluk tablosu üzerinden detaylı analizler yapmadan önce tablonun incelenmesi önemli ve faydalıdır. Hem OTU bolluk tablosunu, hem ASV bolluk tablosunu incelemek için aynı metotlar kullanılabilir yani metodolojik olarak bu basamakta fark yoktur. Bu tez çalışmasında ASV bolluk tablosu kullanıldığı için bolluk tablosundan sadece ASV tablosu olarak bahsedilecek. Bu inceleme (inspection) basamağı sayesinde veri hakkında özetleyici bilgiler elde edilir ve bir iç kontrol yapılır. Bu iç kontrole Veri Bütünlüğü Kontrolü (Data Integrity Check) denir. Bu analiz basamağında elde edilen bilgiler sonraki analiz basamaklarda (örneğin uygun metotların ve seçeneklerin uygulanmasında) daha bilinçli karar alma yönünde ve çıkan sonuçları yorumlama yönünden yol gösterici niteliktedir. ASV tablosunun incelenmesi için sabit ve tek bir istatistiksel çözüm yoktur. Burada bazı önemli hususlar üzerinde durulacaktır. İnceleme sırasında her bir örnek için sekanslama derinliği (toplam okuma sayısı) saptanır ve örnekler (yani kütüphaneler büyüklükleri) birbiriyle bu derinlik bakımından

kıyaslanır. Bunun dışında da ASV bolluk tablosu için toplam okuma sayısı (total read counts) ve örnek başına ortalama okuma sayısı (average counts per sample) da hesaplanabilir. Ek olarak başka bir sürü istatistik daha hesaplanabilir. Daha detaylı bir bakış kazanmak için tanımlayıcı istatistik analizi yapılır ve bu yolla her örnek için bir özetleyici istatistik hesaplanır. Bu özetleyici istatistiği ise kolayca görüntülemek için bir tanımlayıcı istatistik tablosu kullanılabilir. Ortaya çıkan sonuçları görüntülemek için bir grafik kullanılabilir. Bu tez çalışmasında ASV tablosu detaylı bir şekilde incelendi. Ancak bundan sonra diğer analiz basamaklarına geçildi.

2.1.4. Normalizasyon

Mikrobiyal toplulukları incelemek için yüksek verimli dizilemenin kullanımı yaygınlaşmıştır. Farklı mikrobiyal bollukların tanımlanması, ile patojenik ve probiyotik bakteriler için önemli ayırt edici özellikler belirlenmektedir. Buda bakterilerin hastalıklar ile olan ilişkisini belirlemede önemli rol oynamaktadır.

Normalizasyon, çeşitliliği test etmeden önce önemli bir adımdır. Bununla birlikte, mevcut normalizasyon yöntemleri genellikle, numuneler arasındaki sayıların dağılımının belirli bir yüzdeye eşit olduğunu varsayarak, boyut faktörleri oluşturarak farklı ölçeklerdeki sayıları ortak bir ölçeğe koymaya çalışır. Bu yöntemler, çeşitliliği bol türler çeşitliliği düşük veya orta derecede bolluğa sahip olduğunda genellikle istenmeyen sonuçlar vermektedir [58]. Mikrobiyom verilerini normalleştirmek için çeşitli yöntemler mevcuttur. Sıralama derinliğindeki farklılıkları hesaba katmak için sıralama veri örnekleri arasında normalizasyon yapılmaktadır. Bazı normalizasyon yöntemleri transkriptom alanındaki yöntemlerle aynıdır. Transkriptom verilerinde normalizasyon, dizileme derinliği ve gen uzunluğu gibi teknik prosedürlerden kaynaklanabilecek benzerlikleri en aza indirmek amacıyla transkripsiyonel veri normalizasyonu uygulanmaktadır. Transkriptom verilerinde gereken okuma sayısı, ilgilenilen en az RNA türü sayısına göre belirlenir. Verilerin dizileme derinliği, yani dizideki okuma sayısı, düşük dereceli genlerin tanımlanması, farklı durumlar arasındaki çok küçük kat değişikliklerinin saptanması ve yeni kopyaların saptanması gibi amaçlarla artırılabilir. Bu, daha yüksek ekspresyon seviyelerine sahip genlerin daha yüksek tespiti gibi yanlılığa yol açabilmektedir.

2.1.5. Rarefaksiyon

Örnekleme sonuçlarından tür zenginliğini değerlendirmek için kullanılan istatistiksel teknikler veya yöntemler nadirdir. Rarefaksiyon tekniği, aktif taksonların (OTU'lar) analizine yaygın olarak uygulanır ve kirlilik ve evrimsel ekolojide faydalıdır. Parite, belirli bir örneğin kimliğini temsil etmek için yeterli diziye sahip olup olmadığını belirlemek için kullanılabilir. Bir örnek grubun aynı topluluğa ait olup olmadığını belirlemek için de kullanılabilir [59]. Rarefaksiyon, numune sayısından daha az veya buna eşit sayıda numunenin seçilmesini (en küçük numune içinde) ve ardından kalan numune sayısı eşige eşit olana kadar daha büyük numunelerden rastgele okumaların atılmasını içerir. Bu genellikle değişiklik yapılmadan alt örnekleme ile yapılır; bu, normalleştirilmiş örneğe seçilen ve atanan okumaların orijinal örnek havuzuna dahil edilmeyeceği anlamına gelir. Bu, verilerin diğer istatistiksel araçlar kullanılarak daha fazla analiz için kullanılmasına izin veren dijital veriler olarak tutulmasını sağlar [59]. Analiz için en yaygın dikkate alınan miktar tür zenginliğidir (bir ekosistemdeki farklı türlerin sayısı), ancak aynı analizler bir alfa çeşitliliği için herhangi bir metriğe uygulanabilir. Rarefaksiyon analizi hesaplamada kullanılan gözlem sayısına karşı ölçülen bir niceliğin değerini (R) çizer. Daha az sayıda gözlem için R değerleri, rastgele alt kümeler alınarak elde edilir. Daha az gözlemle benzer bir R değeri elde edersek, o zaman R'nin doğru değerini iyi bir tahmininde yakınsadığı sonucunu çıkarmak mantıklıdır. Tersine, daha fazla örnek eklendikçe R sistematik olarak artıyor veya azalıyor, o zaman tüm popülasyon için iyi bir R tahmini yapamayacağımız sonucunu çıkarabiliriz [60].

2.1.6. ASV Bolluk profilinin görüntülenmesi

ASV Bolluk profilinin Görüntülenmesi amacıyla genelde çubuk grafik kullanılıyor. Çubuk grafik oluşturulurken Y ekseninde "absolüt bolluk" yerine "relatif bolluk" kullanmak daha yaygın bir yaklaşım. "Absolüt bolluk" ile direkt saptanan sayılar kıyaslanırken, "relatif bolluk" ile oranlar karşılaştırılıyor. Bu seçenekle kıyaslama yapmak daha kolaylaşıyor.

2.1.7. Alfa çeşitlilik analizi

Biyolojik çeşitliliğin iki önemli mekânsal ölçüsü, alfa ve beta çeşitliliğidir. Alfa çeşitliliği, yerel çeşitlilik olarak da bilinen belirli bir alan veya habitattaki türlerin

ortalama çeşitliliği olarak tanımlanmaktadır. Bu, tek bir numuneye uygulanabilen mikrobiyal çeşitliliğin bir ölçüsüdür. Öte yandan, beta çeşitliliği, alfa çeşitliliğinin alan çeşitliliğine oranıdır. İki bölgenin benzerliğinin veya farklılığının bir ölçüsü olan, iki habitat arasındaki tür çeşitliliğidir. Alfa çeşitliliği, tür zenginliği, tür homojenliği veya her ikisi ile ilgili olarak ekolojik bir topluluğun yapısı hakkında fikir verir. Mikrobiyal ekolojide, ortamlar arası farklılıkları değerlendirmek için yaygın bir başlangıç yaklaşımı, ampikon dizileme verilerinin alfa çeşitlilik analizidir [61]. Bir alanda bulunan türlerin veya aktif taksonların (OTU'lar) sayısı olan tür zenginliği, alfa çeşitliliğinin en basit ölçüsüdür. Ancak, OTU'ların bolluğunu veya sıklığını hesaba katan birçok başka parametre veya gösterge vardır. Genellikle, bir oktav grafiği kullanılırken zengin bir dağılım fark edilir. Mikrobiyal ekoloji açısından, ampikon dizileme verilerinin alfa çeşitlilik analizinin, mikrobiyal ortamlar arasındaki varyasyonu değerlendirmede ortak bir ilk adım olduğu bilinmektedir [62]. Alfa çeşitliliği, tek bir numune içindeki mikrobiyal çeşitlilik miktarını tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Genellikle farklı türlerin sayısını veya diğer taksonomik seviyeleri özetler. Bazı alfa çeşitlilik metrikleri, her türün diğerlerine göre bolluğunun tahminlerini içerir. Bu "eşitlik" temelli metriklerle, bir türün hâkim olduğu bir örnek, aynı türün eşit derecede bol olduğu diğer örneklerden daha az çeşitlilik gösterecektir. Diğer bir deyişle alfa çeşitliliği, bir bölgenin biyolojik çeşitliliğini ölçen üç seviyeli bir ölçeğin ilk kısmıdır. Bir bölgenin alfa çeşitliliği, bir ekosistemdeki tür çeşitliliğinin bir ölçüsüdür. Bu tür ölçümler yapmak genellikle karşılaşılan her türün bir temsilcisini saymayı veya toplamayı gerektirir.

Alfa çeşitliliği, beta ve gama olarak adlandırılan diğer iki ölçütten oldukça farklıdır. Alfa çeşitliliği, tek bir alandaki türlere atıfta bulunurken, beta çeşitliliği, belirli bir alandaki ekosistem çeşitliliğinin bir ölçüsüdür. Gama çeşitliliği, türün içinde bulunduğu ekosistemden bağımsız olarak, bir alanın genel çeşitliliğinin bir ifadesi olarak tanımlanır. Çeşitlilik tahminleri, mikrobiyom veri analizinde merkezi bir konudur. Genellikle gözlemlenen türlerin sayısını dikkate alarak, tek bir örneğin ne kadar çeşitli olduğunun bir ölçüsü olarak ifade edilmektedir. Alfa çeşitliliği ölçümleri de genellikle mikropların gözlemlenme sıklığına göre ağırlıklandırılmaktadırlar. Alfa çeşitliliğini ölçmek için yaygın olarak kullanılan bir dizi ölçüm vardır.

2.1.7.1. Observed metodu

Observed Metodu (gözlenen yöntem), en basit alfa çeşitlilik metriği olarak ifade edilmektedir. Yalnızca belirli bir taksonomik düzeyde bir örnekte gözlemlenen farklı

takson türlerin sayısını belirtmektedir. Benzer analizlerde ve başka taksonomik seviyelerde 'gözlemlenen türler' veya 'gözlemlenen OTU'lar' da kullanılmaktadır.

2.1.7.2. Chao1 metodu

Chao1 bolluğa dayalı bir tahmin edicidir. Bu, ihtiyaç duyduğu verilerin bir örnekleme belirli bir sınıfa ait bireylerin çokluğuna atıfta bulunduğu anlamına gelmektedir. Örnek, türlerin herhangi bir listesidir. Bildiğimiz gibi, çok sayıda birey tarafından temsil edilebilen yaygın türlere kıyasla, bir örnekte (nadir türler) yalnızca birkaç birey tarafından temsil edilen birçok tür olabilmektedir. Chao1 tahmincisi, öncekinin varlığına dayanmaktadır. Yani, örnekleme kaç türün yalnızca bir birey tarafından (single) temsil edildiğini ve kaç türün tam olarak iki birey tarafından temsil edildiğini (double) bilmemizi sağlamaktadır.

Chao indeksinin iki çeşit metodu vardır: Chao 1 ve Chao 2. Chao 1, bolluk tabanlı bir tahmin edicidir bu nedenle, belirli bir sınıfa ait bireysel örneklerin bolluğuna atıfta bulunan verilere ihtiyaç duymaktadır. Chao 2 ise olaya dayalı bir tahmin edicidir; bu nedenle, numunede bir türün bulunmadığını veya varlığını gösteren verileri gerektirir [62].

Chao1, tür zenginliğini tahmin etmek için geliştirilmiştir ve gözlenen OTU'lara dayalı olarak beklenen OTU'ları hesaplamaktadırlar.

Chao2, insidansa dayalı tahmin edici metottur. Yalnızca bir veya iki örnekte meydana gelen türlerin sayısını tahmin etmektedir. Bu, belirli bir örnekteki bir türün varlık-yokluk verilerine ihtiyaç duyduğu anlamına gelmektedir, yani yalnızca tür mevcutsa ve bu tür örnek sette kaç kez bulunduğu dair bilgi vermektedir.

2.1.7.3. Shannon metodu

Shannon Çeşitlilik İndeksi veya Shannon Entropy olarak da bilinen Shannon İndeksi, ekolojik literatürdeki popüler çeşitlilik indekslerinden biridir. Bu metriğin fikri, daha belirgin harfler ve karşılık gelen dizide orantılı olarak ne kadar eşitse, dizideki bir sonraki harfi tahmin etmenin o kadar zor olmasıdır. Shannon'ın Çeşitlilik İndeksi, bir veri setinden rastgele seçilen bireylerin tür kimliğinin tahmin edilmesindeki belirsizliği ölçmektedir [62].

2.1.7.4. Faith's phylogenetic diversity metodu

Mikrobiyom araştırmalarında asıl odak, numunelerdeki mikrop çeşitliliğini değerlendirmektir. Topluluk üyelerinin filogenetik ilişkilerini tanımlayan popöler bir ölçüm olan Faith'in filogenetik çeşitliliğinin, insan sindirim sistemindeki hastalık faktörlerini ayırt etmede diğer alfa çeşitliliği göstergelerinden daha duyarlı olduğu gösterilmiştir [63]. Faith'in filogenetik çeşitliliği, bir dizi terminal taksonu köke bağlayan minimum yayılan ağaç üzerindeki dal uzunluklarının toplamıdır. Adsız bir kök taksonun bu dahil edilmesi, Faith Phylogenetic Diversity metodu için örtük bir tamamlayıcılık yönü ile sonuçlanır. Tanımlamada uçların kökten aynı uzaklıkta olup olmadığına dikkat edilmelidir türler uçlarda gösterilen harflerle tanımlanmaktadır.

2.1.8. Beta çeşitlilik analizi

Beta çeşitliliği, örnekler arasında bir karşılaştırmadır başka bir deyişle örnekler arasındaki mikrobiyal bileşimdeki farktır, bölgesel ve yerel tür çeşitliliğinin bir oranıdır. Her bir örnek çifti arasındaki mesafeyi veya mikrobiyal bileşimdeki farklılıkları ölçmektedir. Beta çeşitliliği, iki örnek arasındaki farkı tek bir sayı olarak toplar, ancak örneklerin neden farklı olduğunu bize söylememektedir. Bu farkları görmek için farklı çizim teknikleri geliştirilmiştir, bu tekniklerdeki asıl amaç iki numune grubunda her taksonun bolluğundaki farkı görmektir. Çeşitlilik her taksonun hangi numunede en fazla örneğe sahip olduğunu gösterir. Alfa çeşitliliği ölçülerinin yanı sıra, mikrobiyom çalışmalarında en yaygın olanlardan bazıları Jaccard, BrayCurtis, MorisitaHorn ve Sorenson olmak üzere birkaç olası beta çeşitliliği indeksi kullanılabilir. Örnek çiftlerinin tüm kombinasyonları için beta çeşitlilik endekslerinin hesaplanması, koordinasyon ve mikrobiyal veri analizinde veri keşfi için yaygın olarak kullanılan bir mesafe matrisi oluşturur. Tam mesafe matris analizi için farklı yöntemler vardır [64].

2.1.8.1. Beta çeşitlilik analizinde kullanılan boyut indirgeme metotları

Beta çeşitlilik analizinde çok değerlikenli istatistiksel analiz yapıldığı için görüntüleme elde etmek için boyut indirgeme metotlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu boyut indirgeme metotlarıyla araştırılan örnekler de fiğüre konumlandırılır ve benzerlik açasından birbiriyle karşılaştırılır. Bu nedenle bu metotlar ordınasyon (ordination) metotları da denir. Ortaya çıkan fiğürlere de ordınasyon fiğürleri (ordination plots) denebiliyor. Sıkça kullanılan boyut indirgeme metotları arasında şunlar sıralanabilir: PCA, PCoA, MDS,

NMDS, tSNE ve UMAP. Bu metotlardan son ikisi (tSNE ve UMAP), daha sıklıkla single RNA-seq verisinin analizi için kullanılsa da bulk RNA-seq yani standart RNA-seq verisi ve mikrobiyota verisi üzerinde de uygulanabilir.

Temel bileşen analizi (Principal Component Analysis, kısaca PCA), gözlemlerin birbiriyle ilişkili bir dizi nicel olarak bağımlı değişken tarafından tanımlandığı bir dizi veriyi analiz eden çok değişkenli bir tekniktir. Temel Bileşenler Analizi, büyük bir değişken kümesini, büyük veri kümesindeki bilgilerin çoğunu içeren daha küçük bir değişkene dönüştürerek büyük veri kümelerinin boyutluluğunu azaltmak için yaygın olarak kullanılan bir boyutluluk azaltma yöntemidir. Amacı, diziden önemli bilgileri çıkarmak, onu ana bileşenler adı verilen yeni bir ortogonal değişkenler kümesi olarak temsil etmek ve gözlemlerin ve değişkenlerin benzerlik modelini harita üzerinde nokta olarak göstermektir [65]. Temel bileşen analizi en popüler çok değişkenli istatistiksel tekniklerden biridir ve farklı bilimlerin birçoğu tarafından kullanılmaktadır. PCA, tahmine dayalı modeller oluşturmadan önce değişkenlerin boyutunu azaltmak için keşifsel veri analizinde bir araç olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Özellikle gürültülü veya yüksek korelasyonlu açıklayıcı değişkenlere sahip veri kümelerinde, çok sayıda tahmin değişkenini birkaç temel bileşene indirgemek için kullanılabilir. Temel bileşenler, genellikle tahmine dayalı modeller oluşturmak için kullanılmaktadır. Temel bileşenler, aslında verilerdeki değişimi açıklayan orijinal değişkenlerin doğrusal kombinasyonlarıdır. PCA, bir veri kovaryans matrisinin özdeğer ayrıştırması veya bir veri matrisinin tek değer ayrıştırması ile gerçekleştirilebilir. Doğrusal kombinasyonlarda her bir değişkene karşılık gelen katsayılar, bileşendeki değişkenin göreceli ağırlığını gösterir. Katsayının mutlak değeri ne kadar büyük olursa, bileşenin hesaplanmasında karşılık gelen değişken o kadar önemli hale gelmektedir. Veri analiz yöntemleri mikrobiyom çalışmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikrobiyal toplulukları araştırmak için çeşitli yöntemler, 16S ribozomal RNA (rRNA) teknolojisini ve metagenomik ve metatranskriptomik dizilemeyi içerir.

Ekoloji, mikrobiyoloji ve genomik gibi alanlarda, örnekler arasındaki çift yönlü farklılığı tanımlamak için Öklid dışı mesafeler yaygın olarak uygulanmaktadır. Bu çift yönlü mesafeler göz önüne alındığında, verilerin görselleştirilmesini oluşturmak için temel koordinat analizi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, kafa karıştırıcı ortak değişkenler, ilgilenilen bilimsel soruyla ilgili kalıpları gözlemlemeyi zorlaştırabilir. Bu bağlamda veri görselleştirmesini iyileştirmek ve ilgilenilen etkilerin daha iyi sunulmasını sağlamak için Python, kullanımı kolay bir araç olarak düzeltilmiş temel koordinat analizi

ile ilgilenilen etkilerin gelişmiş sunumunu mümkün kılıyor [66]. Bray–Curtis farklılığı, ağırlıksız UniFrac mesafesi ve ağırlıklı UniFrac mesafesi gibi Öklid dışı mesafeler örnekler arasındaki çift farklılığı tanımlamak için ekoloji ve mikrobiyoloji gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu uygulamalarda, Öklid dışı mesafeler, aşırı değerlerin işlenmesi ve filogenetik bilgilerin dahil edilmesi gibi Öklid mesafelerine göre kritik avantajlara sahiptir. Öklidyen olmayan bir ikili mesafe matrisi göz önüne alındığında, klasik veya metrik çok boyutlu ölçekleme olarak da bilinen ana koordinat analizi (PCoA), araştırmacıların örnekler arasındaki varyasyonu görselleştirmesine ve gözlemleri daha düşük bir boyuta yansıtarak kümeleri potansiyel olarak tanımlamasına izin verebilir. PCoA'yı görselleştirmede uzun süredir devam eden bir zorluk, kafa karıştırıcı ortak değişkenlerin ana ortak değişkenin etkisini gizleyebilmesidir. Örneğin, diyetin mikrobiyom üzerindeki etkisi üzerine yapılan bir çalışmada, hastalar iki farklı yerden işe alınırsa, bölgeye bağlı kümelenme diyetten daha görsel olarak belirgin olabilir. Temel bileşen analizinde kovaryatları ayarlamak için çeşitli yöntemler önerilmiş olmasına rağmen, PCoA'da kovaryatları ayarlamak için mevcut bir yöntem yoktur.

Çok boyutlu ölçekleme (MDS), çok değişkenli ve keşfedici bir veri analizi tekniği olarak giderek daha popüler hale geliyor. MDS, nesnelerin algısal alanlarının boyutlarının çıkarılmasına izin veren bir dizi veri analiz yöntemidir. Bir MDS analizine giren ham veriler, genellikle incelenen uyaran veya nesnenin genel benzerliğinin veya farklılığının bir ölçüsüdür. MDS analizinin ana sonucu, nesnelerin noktalar olarak temsil edildiği uzamsal bir konfigürasyondur. Bu uzamsal temsilin noktaları, mesafeleri nesnelerin benzerliğine karşılık gelecek şekilde düzenlenmiştir: benzer nesnelere birbirine yakın noktalarla ve farklı nesnelere farklı noktalarla, uzak noktalarla temsil edilir. MDS analizinin amacı, her şey onların genellik ölçüsü (benzersizlik) olduğu bilindiğinde nesnelerin uzamsal konfigürasyonunu keşfetmektir. Mekânsal konfigürasyon, deneklerin potansiyel (küçük) bilinmeyen boyutlar açısından uyaranları nasıl değerlendirdiği hakkında bir fikir vermelidir. İlişkiler türetildikten sonra (bkz. Bölüm 1), veri toplama tamamlanır ve MDS çözümü bir bilgisayar programı kullanılarak belirlenmelidir. Birçok MDS programı, klasik ve metrik olmayan MDS arasında ayırım yapar. Klasik MDS, yakınlık matrisleri gibi verilerin bir haritadan ölçülen mesafeler gibi metrik özellikleri temsil ettiğini varsayar. Bu nedenle, klasik MDS uzayındaki mesafeler, mesafeleri ve yakın mesafeler arasındaki ilişkiyi en iyi şekilde korur. İnsan farkı derecelendirmelerinin bir veri matrisi için, böyle bir metrikle ilgili bir varsayım normalde çok güçlü olacaktır. Bu nedenle, metrik olmayan MDS, yalnızca ilişkilerin sırasının önemli olduğunu

varsayar. Metrik olmayan MDS konfigürasyonundaki mesafelerin sırası, mesafe ve ölçek bilgilerinin bununla hiçbir ilgisi olmasa bile, ilişkilerin sırasını en iyi şekilde yansıtır [67]. NMDS, bir mesafe veya farklılık matrisine dayalı bir koordinasyon üreten dolaylı bir gradyan analizi yaklaşımıdır. NMDS, düşük boyutlu bir uzaydaki nesnelere arasındaki çift yönlü farklılığı olabildiğince yakından temsil etmeye çalışır [68]. Bir dizideki nesnelere arasındaki varyansı veya yazışmayı en üst düzeye çıkarmaya çalışan yöntemlerin aksine, NMDS nesnelere arasındaki ikili farklılıkları düşük boyutlu uzayda mümkün olduğunca yakın temsil etmeye çalışır. Girdi olarak kullanılacak bir mesafe matrisi oluşturmak için herhangi bir fark faktörü veya mesafe ölçüsü kullanılabilir [69]. NMDS'nin amacı, çok boyutlu uzayda verilerin orijinal konumunu, kolayca çizilebilen ve görselleştirilebilen (PCA gibi) azaltılmış sayıda boyut kullanarak mümkün olduğunca doğru bir şekilde temsil etmektir. MDS'den farklı olarak, metrik olmayan MDS (NMDS), öge-öge matrisindeki farklılıklarla ögeler arasındaki Öklid mesafeleri ve her ögenin düşük boyutlu uzaydaki konumu arasında parametrik olmayan bir ilişki bulur. MDS ile NMDS arasındaki fark verilerin ölçüm ölçeğinde yatmaktadır. Metrik Çok Boyutlu Ölçeklendirme (MDS) yalnızca aralık ölçekli veriler için geçerlidir, oysa sıralı veriler için Metrik Olmayan Çok Boyutlu Ölçeklendirmeye (NMDS) ihtiyacımız vardır [70]. Tek hücreli transkriptomik, milyonlarca hücreden binlerce gen için RNA ekspresyon seviyelerini içeren sürekli büyüyen veri setleri sağlanmaktadır. Yaygın veri analizi ardışık düzenleri, verileri iki boyutta görselleştirmek için bir boyutluluk azaltma adımını içerir; bu adım, en sık olarak t-dağıtılmış stokastik komşu yerleştirme (t-SNE) kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Yüksek boyutlu verilerde yerel yapıyı ortaya çıkarmada üstündür, ancak düşük boyutlu uygulamalar genellikle ciddi eksikliklerden dolayı bazen anlamlı sonuçlar çıkmayabilmektedir. Tek hücreli RNA dizilimi, tek hücreli çözünürlükte gen ekspresyon profili oluşturmayı mümkün kılmıştır ve hücre heterojenliği, farklılaşması ve hücre büyümesini incelemek için yeni fırsatlar sağlar. Gelişen tek hücreli teknolojiler, transkriptom, genom, epigenom ve proteom gibi çoklu modaliteleri aynı anda inceler. Çok modlu ortak analiz, hücre alt popülasyonlarının daha yüksek bir çözünürlükte çözülmesini sağlar, RNA dinamiklerinin "hızını" ve hücre durumlarının tahmin edilebileceği süreyi uzatır ve kromatin erişilebilirliğindeki dinamik değişiklikleri hedeflenen hücrede transkripsiyona bağlar. Tek boyutlu hücre verilerini analiz etmenin temel adımı, onları iki boyutlu olarak görselleştirmektir. Belki de en yaygın olarak kullanılan doğrusal olmayan boyut azaltma teknikleri, dağıtılmış rastgele komşu yerleştirme (tSNE) ve tek biçimli çeşitlilik yaklaşımı ve projeksiyonudur (UMAP). Şu

anda, bu teknikler her bir yöntemle aynı anda uygulanmaktadır ve bireysel veri görünümleri manuel incelemeyle eşleştirilmelidir. Veriye dayalı bir boyut azaltma ve görselleştirme aracı olarak, t-dağıtılmış stokastik komşuluk yerleştirme (t-SNE) çeşitli alanlara başarıyla uygulanmıştır. Son yıllarda, sınıflandırma ve regresyon analizi için de artan bir ilgi görmektedir. Laurens ve arkadaşları, t-SNE yöntemini kullanarak yüksek boyutlu verileri görselleştirmede t-SNE tarafından üretilen görselleştirme çalışmaları, neredeyse tüm veri setlerinde diğer teknikler tarafından üretilen sonuçlara göre önemli ölçüde daha iyi sonuçlar verdiği sonucuna ulaşmışlardır [71].

Boyut küçültme, büyük, çok boyutlu veri kümelerinin analizine ve görselleştirilmesine izin verdiği için makine öğrenimi ve büyük veri analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle, verilerin gruplandırılması ve sınıflandırılması gibi görevlerin yerine getirilmesinde çok yardımcı olabilir. Son zamanlarda, entegre yöntemler, kümeleme doğruluğunu geliştirmek için umut verici bir yön olarak ortaya çıkmıştır. Yerel yapıyı koruyabilirler ve aynı zamanda verilerin küresel doğasını temsil edebilirler, böylece kümeleme performansını makul ölçüde iyileştirirler. Birleşik Manifold Projeksiyonu ve Yaklaşımı (UMAP), yerel yapıyı doğru bir şekilde temsil etmeyi ve küresel yapıyı daha iyi bütünleştirmeyi amaçlayan yakın zamanda önerilen birçok yönlü öğrenme yöntemidir. tSNE'ye göre birçok avantajı vardır. UMAP'nin büyük veri kümelerine iyi ölçeklendiği, tSNE'nin ise bunlarla mücadele ettiği gösterilmiştir. UMAP üç varsayıma dayanır, yani 1) veriler Riemann manifoldu üzerinde düzgün bir şekilde dağıtılır, 2) Riemann indeksi yerel olarak sabittir 3) manifold yerel olarak sınırlıdır. Bu varsayımlardan, manifoldu yüksek boyutlu veri noktalarından oluşan bulanık bir topolojik yapı ile temsil etmek mümkündür. Gömme çeşitliliği, verilerin düşük boyutlu izdüşümünün bulanık topolojik yapısını araştırarak bulunur. Bulanık bir topoloji oluşturmak için UMAP, veri noktalarını bir yükseklik grafiğinde çizer. Oluşturulan yükseklik grafiği, iki noktanın birleştirilme olasılığını temsil eden kenar ağırlıklarına sahip ağırlıklı bir grafiktir. UMAP, yüksek boyutlu veri noktaları arasındaki benzerliği hesaplamak için üstel bir olasılık dağılımı kullanmaktadır [72].

Michael ve arkadaşları, UMAP tabanlı transkriptomik veri kümelerinde protein komplekslerinin yollarının ve yeni etkileşimlerin tanımlanması yöntemiyle boyut azaltma teknikleri ile türler içinde ve türler arasında protein komplekslerinin ve yollarının haritalanmasında giderek daha yararlı hale geleceğini hedeflemişlerdir. Boyut azaltma teknikleri kullanılarak mevcut veri kümelerinin hücreler arasındaki ilişkilerini tanımlamak için UMAP gibi yaklaşımlar ile dokulardaki biyomoleküllerin mekansal

ilişkilerini, genetik etkileşimlerini veya insan popülasyonları arasındaki ilişkileri görselleştirmede yararlı olduğu sonuçlarına varmışlardır [73].

2.1.8.2. Beta çeşitlilik analizinde çok değişkenli istatistiksel analiz metotları

ANOSIM (Benzerlik Analizi), herhangi bir mesafe ölçüsüne dayanan iki veya daha fazla grup arasındaki anlamlı farkın parametrik olmayan bir testidir [74]. Mesafeler derecelere dönüştürülür. ANOSIM normalde, örnek gruplarının karşılaştırılacağı örneklerde takson verileri için kullanılır. Öğeler satırlara gider, sütunlara göre değişir ve gruplar her zamanki gibi bir grup sütunu ile belirtilmelidir. ANOVA ile kaba bir analogide, test gruplar arasındaki mesafelerin gruplar içindeki mesafelerle karşılaştırılmasına dayanmaktadır [75]. ANOSIM testindeki iki temel amacımızdan biri iki veya daha fazla örnek grubunun mikrobiyal toplulukları arasında istatistiksel bir fark olup olmadığını test etmek bir diğeri null hipotezini test etmektir. Null Hipotez; örnek gruplarınızın mikrobiyal toplulukları arasında fark yoktur test etmektir. ANOSIM testi bir ANOVA hipotez testine benzer, ancak ham veri yerine girdi olarak bir benzerlik matrisi kullanır. Aynı zamanda parametrik değildir, yani verileriniz hakkında fazla bir şey varsaymaz (normal dağılım vb.), bu nedenle sık sık çarpık mikrobiyal bolluk verileri için iyi bir bahistir. Parametrik olmayan bir test olarak, ANOSIM gerçek mesafeler yerine sıralanmış benzerlikler kullanır ve bu şekilde bir NMDS analizi için çok güzel bir tamamlayıcıdır. ANOSIM testinin ana noktası, iki veya daha fazla grup arasındaki farkların anlamlı olup olmadığını belirlemektir. Çalışmamızda, örnek gruplarının mikrobiyal topluluk kompozisyonunda önemli farklılıklar olup olmadığını test etmek için kullanılmıştır [76].

Birçok biyolojik, ekolojik ve çevresel veri setinde MANOVA'nın (çok değişkenli varyans analizi) varsayımları bazı analizlerde beklenen sonuçları vermeyebilir. Çok değişkenli örnek birim gruplarını karşılaştırmak için bir dizi daha sağlam yöntem önerilmiştir ve bunların birçoğu artık ekolojide çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Benzerliklerin analizini (ANOSIM), varyansın permütasyonel çok değişkenli analizini (NPMANOVA olarak da adlandırılan parametrik olmayan bir alternatif olan PERMANOVA) ve Mantel testini içerir. Bu yöntemlerin tümü, örnek birimler arasında hesaplanan bir benzerlik matrisinden (mesafeler, benzerlikler, benzerlikler) ANOVA benzeri test istatistikleri oluşturur ve gruplar arasında gözlemlerin rastgele permürasyonlarını kullanarak P değerleri elde eder, böylece yalnızca tek yönlü durum için değiştirilebilirlik varsayılır [77]. PERMANOVA, çok değişkenli modelleri mikrobiyom verilerine uydurmak için en

yaygın kullanılan parametrik olmayan veri analiz yöntemlerindedir. Mesafe matrislerine ve permütasyona dayalı çok değişkenli bir varyans analizi olarak tanımlanmaktadır [78]. Permütasyonel çok değişkenli varyans analizi (PERMANOVA) parametrik olmayan çok değişkenli istatistiksel bir testtir. Nesne gruplarını karşılaştırmak ve ölçüm alanı tarafından tanımlanan grupların centroidlerinin ve dağılımının tüm gruplar için eşdeğer olduğu null hipotezini test etmek için kullanılır. Null hipotezin reddedilmesi, nesnelere centroidinin ve / veya yayılımının gruplar arasında farklı olduğu anlamına gelir. Bu nedenle test, denemenize dahil olan iki nesne arasındaki mesafenin önceden hesaplanmasına dayanır [77]. Bunu biraz daha somut hale getirirsek. PCA, NMDS, PCoA vb. Gibi bir koordinasyonu hesapladığınızı varsayalım ve iki mikrobiyomun sadece hafifçe örtüştüğünü gösterir (örneğin ötrofik bir gölden ve berrak bir gölden metaproteomik örnekler). Mikrobiyal topluluğun iki ekosistem durumu arasında farklı olup olmadığını bilmek istersiniz. Bir PERMANOVA, ötrofik göl için numune kümesinin centroidinin berrak göl için numune centroidinden farklı olup olmadığını istatistiksel olarak belirlemenizi sağlar. PERMANOVA'NIN bir koordinasyon tekniğinin çıktısı üzerinde değil, altta yatan mesafe matrisleri üzerinde yapıldığı unutulmamalıdır [77].

Adonis, metrik ve yarı metrik uzaklık matrislerini kullanarak karelerin toplamalarının analizi ve bölümlenmesi için kullanılan çok değişkenli varyans analizi yapmayı sağlayan bir fonksiyondur. Çok değişkenli bir veri setinin karelerinin toplamalarını bölümlere ayırdığı sürece, doğrudan MANOVA'ya (çok değişkenli varyans analizi) benzerdir. Adonis, önce verilerin ilgili merkezlerini belirler ve hemen ardından bu belirlenen noktalardan sapmanın karesini hesaplayarak bir küme oluşturur. Ardından, ham veri permütasyonlarından elde edilen ardışık kareler toplamına dayalı olarak F-testi kullanılarak anlamlılık testi yapılmaktadır [79]. PERMANOVA'ya benzer şekilde ANOSIM, mikrobiyom çalışmalarında en yaygın kullanılan çok değişkenli yöntemlerden biridir. ANOSIM, grup içi ve grup arası benzerliği [80] bir mesafe ölçüsü aracılığıyla karşılaştırmak, bir grup içindeki örnekler arasındaki ortalama sıra benzerliğinin farklı gruplara ait örnekler arasındaki ortalama sıra benzerliği ile aynı olduğu hipotezini test etmek için kullanılır [81].

2.1.9. Hiyerarşik kümeleme

Çok değişkenli istatistiksel tekniklerden biri olan hiyerarşik kümeleme analizi (hierarchical clustering), sınıflandırılmamış ve bilinmeyen verileri benzerliklerine göre sınıflandırmak için kullanılmaktadır. Kümeleme analizi, birimler veya değişkenler

açısından ne kadar benzer olduklarına göre ayrı kümelerde veri toplama tekniğidir. Kümeleme analizi, benzer bireyleri aynı grupta toplamayı amaçlaması bakımından diskriminant analizine ve benzer değişkenleri aynı grup içinde toplamayı ve veri indirgeme özelliği sunması bakımından faktör analizine benzemektedir. Çoğu bilimsel araştırmada en yaygın olarak kullanılan istatistiksel tekniklerden biridir. Çoğu durumda, uygulamalar, gözlem sayısından daha fazla işleve sahip verileri işlemek için kümeleme algoritmalarına ihtiyaç duymaktadır. Benzer değerler aynı grup veya küme içinde bulunurken, aykırı değerler grupların dışında bulunur.

Hiyerarşik kümeleme analizini gerçekleştirmek için öncelikle nesnelere arasındaki belirli bir mesafe ölçüsünü belirlemek gerekmektedir. Ardından, her bir kümenin kompaktlığını (aynı kümedeki nesnelere benzerliği) ve bunların arasındaki ayrımı hesaplamak için bir metrik tanımlanması gerekmektedir. Bu tanımları kullanarak, kendi probleminiz için en iyi sonucu vermesi muhtemel olan bir kümeleme algoritması seçilmektedir. Mikrobiyom örneklerinin kümelenebilmesi, çeşitli yaklaşımlar kullanılarak birçok çalışmada başarılar elde edilmiştir. Denekleri mikrobiyom örneğine göre gruplamak için mesafeye dayalı ve parametrik modelleme dahil olmak üzere kümeleme algoritmaları kullanılmıştır.

Kümeleme analizinde uzaklık ölçümleri (distance metrics, distance measures) olarak çok sayıda metot kullanılabilir. En yaygın kullanılan uzaklık ölçümleri arasında şunlar sıralanabilir: Pearson korelasyon bazlı uzaklık, Bray-Curtis, Öklidyen uzaklık, Manhattan uzaklık, kullanılır. Pearson korelasyon bazlı uzaklık $1-r$ formülüyle hesaplanır. Yani 1'den Pearson korelasyon katsayısı çıkarılınca ilgili uzaklık bulunur. Bir diğer husus, korelasyonun azaldıkça uzaklığın artmasıdır. Kümeleme analizinde bağlantı metotları (linkage methods) olarak çok sayıda metot geliştirilmiştir. En yaygın kullanılan bağlantı metotları arasında şunlar sıralanabilir: tek bağlantı (single linkage), tam bağlantı (complete linkage), ortalama bağlantı (average linkage) ve Ward bağlantı (Ward linkage).

2.1.10. Çekirdek mikrobiyota analizi

"Çekirdek mikrobiyom" (core microbiome) terimi, son yıllarda mikrobiyal ekolojide yaygın olarak kullanılmaktadır. Çekirdek mikrobiyom araştırmaları, mikrobiyal ekoloji alanında günden güne artmaktadır. Genel olarak, çekirdek mikrobiyal topluluklar, herhangi bir mikrobiyal taksona, ilgili konakçıya veya ortama özgü bu taksonlarla ilişkili fonksiyonel ve genomik özelliklerin belirlenmesini ifade etmektedir. En yaygın olarak, çekirdek mikrobiyal topluluklar, belirli bir konakçı veya ortamdan iki veya daha fazla numune arasında paylaşılan mikrobiyal taksonlar olarak ölçülür. Çekirdek mikrobiyom

araştırmalarında, belirli bir konakçı tür veya ortamdaki iki veya daha fazla mikrobiyal topluluk arasındaki hangi taksonların paylaşıldığını belirlemek hedeflemektedir. Bu terimin artan popülaritesine ve kullanımına rağmen, pratikte temel bir mikrobiyomun en doğru şekilde nasıl ölçüleceği konusunda hala çok az bilgi mevcuttur [82].

2.1.11. Differansiyel bolluk analizi

Differansiyel bolluk analizi mikrop çeşitlerinin bolluğu bakımından grupların karşılaştırılması için kullanılır. Buradaki istatistiksel analiz tek değişkenli analizdir (univariate analysis) yani mikrop çeşitleri tek tek (ayrı ayrı) differansiyel bolluk açasından test edilir. Böylece gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren bakteri çeşitleri saptanır. İstatistiksel metot olarak parametrik testler veya parametrik olmayan testler mevcuttur. Parametrik metot olarak Student's t-test ve ANOVA seçeneği mevcuttur. Parametrik olmayan metotlar klasik (geleneksel) ve yeni metotlar olarak ikiye ayrılabilir. İki en çok bilinen ve uygulanan klasik (geleneksel) metot: Mann-Whitney U testi ve Kruskal Wallis-H Testi. İki en çok bilinen ve uygulanan klasik (geleneksel) metot: DESeq2 ve edgeR. Bu iki metot aslında RNA sekanslama verisi için geliştirilmiştir. Sonradan mikrobiyota ve diğer omik alanında da kullanımı yaygınlaştı. Bu yüzden (bu kökeninden dolayı) bu iki metoda sıklıkla RNA-seq metodu (RNA-seq methods) denebiliyor. Böylece bu iki metot bu isimlendirme altında sıklıkla toplanmış oluyor ve diğer metottan farkı vurgulanmış oluyor. Daha önce belirtildiği gibi, bu RNA-seq metotları mikrobiyota analizinde de kullanılıyor.

2.1.12. Rastgele orman sınıflandırması

Rastgele Orman (Random Forrest; RF) bir gözetimli (denetimli) makina öğrenmesi metodudur. Hem sınıflandırma hem regresyon için kullanılabilir. Burada sınıflandırma yönü üzerinde durulacaktır. Sınıflandırma için kullanıldığında bu metot bilinmeyen bir sınıfı tahmin etmek için kullanılır. Mikrobiyota çeşitlerinin her biri bu öğrenmede öznelik (feature) görevini görür. Rastgele Orman metodu önemli olan öznelikleri öncelik sırasına göre listeler ve vurgular. Böylece tahmin için en önemli olan öznelikler saptanmış olur. Bu özneliklerin önemli olma derecesi ''Ortalama Düşüş Doğruluğu''(Mean Decrease Accuracy) ölçümüyle gösterilir. Yani bir öznelik önemi (feature importance) derecesidir. Daha büyük daha çok öneme işaret eder. Böylelikle en önemli özneliklerin önem derecesine göre sıralandığı fiğüre de Ortalama Düşüş

Doğruluğu figürü (Mean Decrease Accuracy plot) denir. Bu figüre ayrıca değişken önemi figürü (variable importance plot) de denir. Bu bağlamda ve mikrobiyota analizi özelinde değişken ve öznitelik aynı şeyi yani ifade eder ve mikrobiyota çeşitleriyle karşılık gelir. Böylece sınıflandırma için en önemli mikrop çeşitleri saptanır.

Rastgele Orman, Breiman tarafından sınıflandırma ve regresyon problemlerini çözmek için geliştirilmiş yaygın bir öğrenme yaklaşımıdır. Community Learning (topluluk öğrenimi), aynı sorunu çözmek için birden fazla modeli entegre ederek doğruluğu artıran bir makine öğrenimi şemasıdır. Özellikle, tek bir sınıflandırıcıya kıyasla daha doğru sonuçlar elde etmek için toplu sınıflandırmaya birden çok sınıflandırıcı katılır. Diğer bir deyişle, çoklu sınıflandırıcıları entegre etmek varyansı azaltır ve özellikle kararsız sınıflandırıcılar durumunda daha güvenilir sonuçlar sağlanabilmektedir. Önemli ölçüde farklı ağaç yapılarına ve bölünmüş değişkenlere sahip Rastgele Ormanlar, farklı topluluk ağacı modelleri arasında farklı aşırı uyum ve aykırı değerleri teşvik eder. Bu nedenle, son tahmin eşleştirme, sınıflandırma probleminde fazla uydurmayı azaltırken, ortalama alma, regresyon problemlerinin çözümüdür [83].

Rastgele Orman modelini çalıştırmak için iki parametrenin ayarlanması gerekir: ağaç sayısı (N-tree) ve rastgele seçilen özelliklerin sayısı (M-try). Rastgele Ormanların M-try'ye kıyasla N-tree'ye daha az duyarlı olduğu bildirilmiştir. M-try parametresini azaltmak daha hızlı hesaplama ile sonuçlanabilir, ancak hem iki ağaç arasındaki korelasyonu hem de örneklerdeki her ağacın (tree) gücünü azaltır ve dolayısıyla sınıflandırma doğruluğu üzerinde karmaşık bir etkiye sahip olacaktır. Rastgele Orman sınıflandırıcısı (Random Forest classifier) hesaplama açısından verimli olduğu ve fazla detay gösterilmediği için N-tree mümkün olduğu kadar büyük olabilir [83].

Rastgele Orman sınıflandırma için kullanıldığında girdi olarak kullanılan örneklerin hangi sınıfa ait olduğu tahmin eder yani bu şekilde bir sınıflandırma (classification) yapar. Sınıfların tahminini (class prediction) yani sınıflandırmanın performansını değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan metotlar vardır. Bunlardan biri OOB (Out-Of-Bag) error yani "Torba dışı hata" ("Torbadan çıkma tahmininin hatası"). OOB hatası bir hata tahmin tekniğidir [84]. Bu metot Rastgele Orman tahminlerinin doğruluğunu değerlendirmek ve rastgele çizilmiş aday tahmincilerin sayısı gibi parametreleri ayarlamak için, uygun değerleri seçmek için yaygın olarak kullanılan [84]. Diğer ifadeyle, OOB hata ile Rastgele Ormanıyla oluşturulan makine öğrenimi modelinin tahmin hatası (prediction error) ölçülür. Bu tez çalışması bağlamında tahmin edilen sınıflar ise örneklerle ilgili özelliklerdir. Örnek olarak bu tez çalışmasında gün ve faz

sınıflandırması ayrı ayrı yapıldı gerçekleştirildi yani sınıflar iki farklı şekilde (ayrı ayrı) tahmin edildi. Dolayısıyla, bu iki yaklaşımla yapılan sınıflandırmanın sonuçları OOB hata tekniğiyle ayrı ayrı değerlendirildi. OOB yönteminin detaylarına göz önünde bulundurulduğunda ise, yaygın olarak kullanılan iki tane OOB hesaplanması göze çarpıyor. Birinci yaklaşım: tüm tahminleri topluca değerlendirilerek ele edilen bir OOB hata değerinin hesaplanması. Bu hesaplama sınıflandırma performansını özetleyen ve genel bir bakış sağlayan bir yaklaşımdır. İkinci yaklaşım: daha detaylıdır çünkü her sınıfın (grubun) tahmini ile ilgili ayrı ayrı bir OOB hata değerini verir. Bu ikinci yaklaşım yani sınıf bazlı yaklaşım için formül şöyledir: OOB hata = classification error (class.error) yani sınıflandırma hatası = (Yanlış sınıflandırma sayısı)/(Toplam sınıflandırma sayısı) = (Yanlış tahmin sayısı)/(Toplam tahmin sayısı). Bu ikinci yaklaşımla algoritmanın her sınıfı tahmin etmedeki başarısı ayrı ayrı olarak bulunur ve bu değerler birbiriyle kıyaslanır. Her iki yaklaşımla elde edile sonuçlar OOB hata tablosu ile özetlenebilir.

2.2. Transkriptom Veri Analizinde Kullanılan Metotları

Transkriptom veri analizi birkaç basamakta gerçekleştirildi. Kalite kontrolü basamağında örnekler arasındaki ekspresyon dağılım farkı kutu (boxplot) grafiği incelendi. Bu şekilde girdi verinin durumu ve örnek grupları arası karşılaştırma analizleri için elverışı olup olmadığı kontrol edildi. Bir sonraki aşamada ise global gen ekspresyonu incelenerek transkriptom veri setine genel bir bakış sağlandı. Bu amaç için bir denetimsiz makine öğrenme yöntemi olan boyut indirgeme (dimension reduction) yöntemi uygulandı. Spesifik metot olarak yakın zamanda geliştirilen ve gittikçe yaygınlaşan bir boyut indirgeme metodu olan UMAP metodu kullanılmıştır. Sonuçlar da UMAP grafiği ile görüntülendi. Bu şekilde transkriptom seviyesinde örnekler arasında karşılaştırma yapıldı. Bu bağlamda transkriptom birçok değişkenden (yani mRNA'dan) oluştuğu için bu gerçekleştirilen analiz basamağı bir çoklu değişken analizidir (multivariate analysis). Bir sonraki basamakta ise tekli değişken analizi (univariate analysis) yapıldı. Bu yolla gruplar arasında mRNA bazından karşılaştırma yapıldı ve ekspresyon seviyesi anlamlı değişen değişkenler (bu durumda mRNA'lar) saptandı. En anlamlı bulunan 10 gen hakkında detaylı istatistiksel ve isimlendirme bilgisi toplantı ve gösterildi. Son olarak en anlamlı bulunan 5 genin differansiyel ekspresyon profili ayrı ayrı incelendi ve çubuk grafiklerle görüntülendi. Bu şekilde bu genlerin ekspresyon patternleri daha iyi anlaşılabilir oldu.

2.3. Literatür Taraması

Literatür taramaları ile daha önce yapılan birçok çalışmada aksolotl da omurilik hasarı sonrası rejenerasyonu etkileyen moleküler mekanizmalar, aksolotl da rejenerasyonu etkileyen bakteri profilleri, aksolotl kuyruk rejenerasyonu gibi bu alanda birçok çalışmada eksik kalan yönlerin tamamlanması amaçlanmıştır. Aksolotl kol rejenerasyonu sürecinde yara iyileşmesinde etkili olan bakteri profillerini anlamak ve gelecek çalışmalara bir ön hazırlık olarak gösterilebilecek literatürde eksik kalan bu yönde katkı sağlamak hedeflenmiştir.

Yapılan araştırmaya katkı sağlanacağı düşünülen makale ve tez çalışmaları Pubmed, Google Scholar, Açık Erişim Medipol (Kurumsal Akademik Arşiv), Yüksek Öğretim Kurumu (YÖK) Tez veri tabanı kullanılarak aksolotl, yara iyileşmesi, mikrobiyota analizi, rejenerasyon konularında 79 adet makale ve akademik tez çalışmaları incelenmiştir. Literatür taraması 1996 – 2021 yılları arası çalışmalardan yapılmıştır.

Aksolotl mikrobiyomu üzerine literatür araştırması yapılmıştır. Yapılan araştırmalarda *Demircan ve diğ.* tarafından yapılan çalışma mikrobiyom araştırmalarında aksolotlun ilk çok organlı mikrobiyom profilinin incelenmesi üzerine yapılan çalışma olduğu görülmektedir **Çizelge 2.1**.

Çizelge 2.1: Aksolotl Mikrobiyomu üzerine yapılan önceki çalışmaların özeti.

Yazarlar, yıl	Örnek Alınan Yer	Çalışma Özeti
Demircan ve diğ. Scientific Data, 2019	Uzuv	Aksolotl rejenerasyonu üzerine hücrel ve moleküler araştırmalar için halka açık kaynakların artmasına rağmen (örneğin, transkriptomproteom ve genom verileri) aksolotl mikrobiyom verileri nadiren bulunur, bu da bu alanda biriken verilerin kapsamlı bir şekilde yorumlanmasını engellemektedir. Bu bilgi boşluğunu doldurmaya yönelik bir ilk çaba olarak, neotenik ve metamorfik aşamalarda aksolotl'un ilk çok organlı mikrobiyom profili incelenmiştir [2].

Transkriptom üzerine literatür araştırması yapılmıştır. Yapılan literatür araştırması sonucuna göre temel düzeyde transkriptom üzerine 6 çalışma bulunmuştur. Bu çalışmaların özeti **Çizelge 2.2** de gösterilmektedir.

Randal Voss ve diğ. tarafından yapılan aksolotl uzuv ampütasyonu sonrası alınan 10 replike RNA'larından gen ekspresyonu tahmin edilmiştir ve örnekler arasında yaşanan farklılıklar gösterilmiştir.

Dunja Knaap ve diğ. tarafından yapılan çalışmada aksolotl uzuv ampütasyonu sonrasında rejenerasyon sırasında blastema dokusunun nasıl oluştuğunu anlamak için bir dizi gen incelenmiştir. Yara iyileşmesi ve rejenerasyon arasındaki karşılaştırma, ampütasyona özgü genler tanımlanarak yapılmıştır. Yapılan çalışmada gen ekspresyonunun üç ayırt edilebilir aşaması saptanmıştır.

Ron Stewart ve diğ. tarafından yapılan çalışmada aksolotl ampütasyon sonrası uzvun yeniden büyüme sürecine odaklanılmıştır. Büyüme sürecini daha iyi anlamak için bir zaman süreci boyunca blastema dokusunun RNA dizilimi yapılmıştır.

Çizelge 2.2: Aksolotl Transkriptom üzerine yapılan önceki çalışmaların özeti

Yazarlar, yıl	Örnek Alınan Yer	Çalışma Özeti
Randal Voss ve diğ., 2015	Uzuv	Aksolotl amputasyon sonrası 20 zaman noktasının her birinde, distal uzuv ucundan toplanan 1 mm heterojen dokudan izole edilen 10 replike RNA numunesi için gen ekspresyonunu tahmin edilmiştir. Uzuv transkripsiyon programının, yaralanmamış durumdan zamanla aşamalı olarak ayrıldığı ve zaman bitişik örnekler arasındaki farklılığın çoğunlukla kademeli olduğu gösterilmiştir [85].
Dunja Knapp ve diğ., 2013	Uzuv	İlk yara iyileşme tepkisinden sonra ekstremitte blastemasının nasıl oluştuğunu anlamak, rejenerasyon araştırmaları önem kazanmıştır ve Rejenerasyon sırasında ifade edilen blastema oluşumunun düzenlenmesi için muhtemel aday bir dizi gen belirlenerek incelenmiştir [86].
Ron Stewart ve diğ., 2013	Uzuv	Uzvun yeniden büyüme sürecini daha iyi anlamak için, genomu dizilenmemiş bir tür olan aksolotl'de bir zaman süreci boyunca blastemanın derin RNA dizilimi gerçekleştirilmiştir [87].
Cheng Han Wu ve diğ., 2013	Uzuv	Blastema dokularının genomik bilgilerini elde etmek için ampütasyondan 14 gün sonra hem blastema dokularından hem de aksolotllar denerve güdük uçlarından de novo transkriptomlar dizildi ve Solexa DNA dizilimi kullanılarak karşılaştırıldı [100].
		Ekstremitte rejenerasyonu sırasında epidermis-sinir-mezenkimal

James R Monaghan ve diğ., 2012	Uzuv	etkileşimlerle ilişkili genleri tanımlamak için, yara epidermisindeki ve alttaki hücrelerdeki üç yaralanma tipi arasında yaralanmayı takip eden histolojik ve transkripsiyonel değişiklikleri incelenmiştir. 1) hayvanın uzvunu yenilemeyecek yan tarafında yara, 2) uzvunu yenilemeyecek denerve uzuv, ve 3) bir uzvunu yenileyecek olan innerve edilmiş bir uzuv incelenmiştir [101].
Robert B Page ve diğ., 2009	Uzuv	Meksika aksolotl'unda derideki morfoloji ve gen ekspresyonundaki metamorfik değişiklikleri araştıran indüklenmiş metamorfozun ayrıntılı bir zaman süreci araştırılmıştır. Transkripsiyonel biyobelirteçlerin derinin spesifik larva ve yetişkin hücre popülasyonlarında ifade edildiğini ve bu biyobelirteçlerdeki zamansal değişikliklerin doku yeniden şekillenmesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [102].

Çizelge 2.3: Transkriptom üzerine yapılan çalışmalarda kullanılan programlar ve metotlar.

Çalışmanın yazarları ve yılı	Kullanılan programlar ve kaynaklar	Kullanılan veri analiz metotları
Randal Voss ve diğ., 2015	Sal-Site; (www.ambystoma.org), GEO; mikroarray veri analizi programları	ANOVA, t-testi gibi mikroarray veri analizi teknikleri
Dunja Knapp ve diğ., 2013	Python, Phrap paketi	MySQL database ve mikroarray veri analizi programları
Ron Stewart ve diğ., 2013	Illumina NGS	Differansiyel ekspresyon, RNA-seq, kümeleme
Cheng Han Wu ve diğ., 2013	Illumina NGS	Illumina NGS analiz metotları
James R Monaghan ve diğ., 2012	RMA, Affymetrix Expression Console software, R	Mikroarray veri analizi metotları
Robert B Page ve diğ., 2009	Mikroarray veri analizi programları	Mikroarray veri analizi metotları

Yukarıdaki tabloda adı geçen 6 çalışmada kullanılan programlar ve veri analizleri gösterilmiştir **Çizelge 2.3**. Bu tez çalışmasında önceki yayınlanmış çalışmalardan yaklaşım ve metotlar açısından farklılaşmaktadır. Dolayısıyla bu çalışmada hem özgün bir yöntem kullanılmıştır hem de bulunan yeni bulgular elde edilmiştir.

BÖLÜM 3

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Kullanılan Girdi Verilerinin ve Analiz Metotlarının Seçimi

Son yıllardaki biyoteknolojik gelişmeler sayesinde mikrobiyota analizi hızlı ve fiyat bakımından daha uygun hale gelmiştir. Hızla artan mikrobiyota analizleri ile ilgili literatürde de birçok kaynak bulunmaktadır. Artan verinin analizi her biri ayrı bir istatistiksel metoda dayanan birçok basamaktan oluşmaktadır. Yazılım açısından verinin analizi biyoistatistiksel paketlere dayanmaktadır.

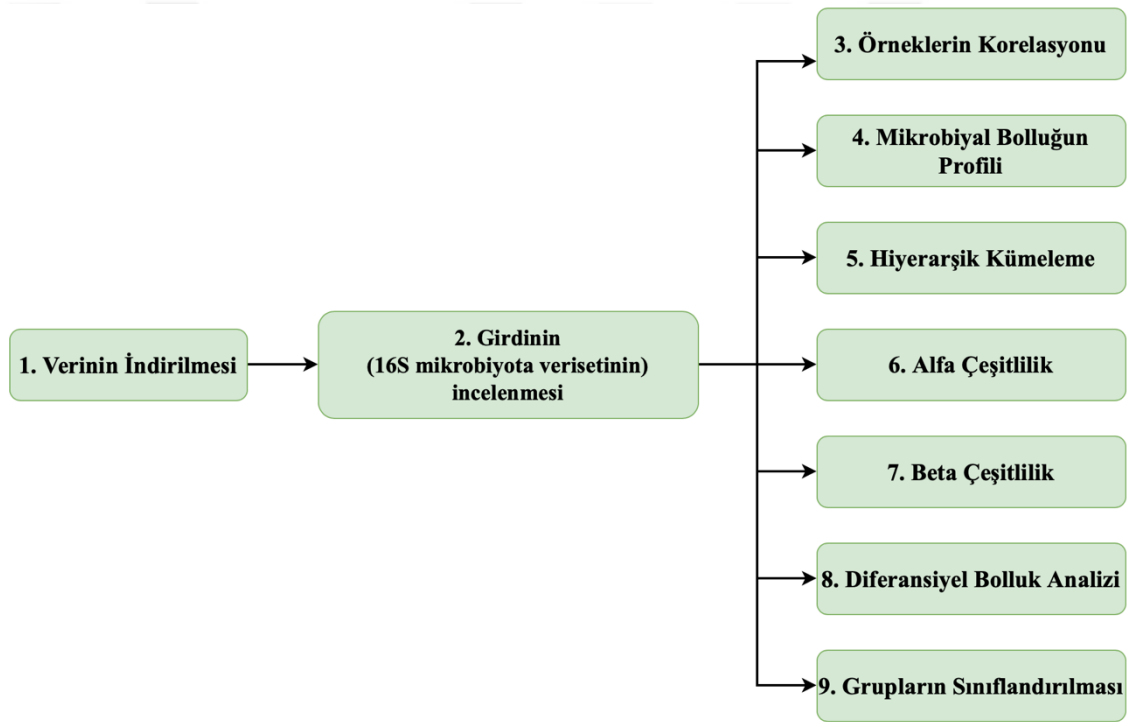
Bu tez çalışması sırasında aksolotl kol rejenerasyonu sürecindeki mikrobiyota ve transkriptom değişimleri veri madencilik vasıtasıyla detaylı araştırıldı. Mikrobiyom veri girdisi olarak 2019'da Demircan ve diğ. tarafından yayınlanmış olan makalenin [2] sonuçları arasında olan ASV bolluk tablosu kullanıldı. Buna ulaşmak için derginin online sayfasında makalenin içinde belirlenen link kullanıldı. Transkriptom veri girdisi olarak 2015'te Voss ve diğ. tarafından yayınlanmış olan makalenin [85] sonuçları arasında olan gen ekspresyon tablosu kullanıldı. Buna ulaşmak için ilgili GEO linki kullanıldı. Transkriptom verisiyle ilgili GEO ID: GSE67118.

Mikrobiyom örneklerinin oluşturduğu ve girdi olarak kullanılan mikrobiyom verisi 16S tabanlı bir analiz yaklaşımı kullanılarak bu çalışmada bu verinin analizinde MicrobiomeAnalyst [88] kullanıldı. Bu programla aşağıdaki analiz basamakları gerçekleştirildi. Verinin incelenmesi, bolluk profilinin görüntülenmesi, gruplar arası çeşitliliğin alfa ve beta çeşitlilik metodlarıyla karşılaştırılması, hiyerarşik kümeleme analizi ve Rastgele Orman yöntemiyle sınıflandırma. Makine öğrenmesi bağlamında çeşitlilik analizinde denetimsiz öğrenme kullanılırken sınıflandırma denetimli öğrenme kullanıldı. Mikrobiyom verisinin analizinde, gruplar arası farklılıkların beta çeşitlilik analizi bakımında testi için çok değişkenli varyans analizi (PERMANOVA) yöntemi kullanılmıştır. Orman yöntemiyle sınıflandırma basamağında modelleme amacıyla standart (default) seçenek olan 500 ağaç kullanıldı. Transkriptom analizi şu 3 basamakta

gerçekleştirilmiştir: Kalite kontrolü (girdi verinin incelenmesi), global seviyesinde gen ekspresyonun araştırılması (çok değişkenli analiz) ve differansiyel ekspresyon analizi (tek değişkenli analiz). Tüm bu analizler için Geo2R programı [89] kullanılmıştır. Çok değişkenli analiz bir denetimsiz makine öğrenmesi metodu olan UMAP ile gerçekleştirilmiştir.

3.2. Uygulanan Mikrobiyota Veri Madenciliğinin Metodolojisi

Veri analizi yapılacak olan mikrobiyota veri seti veri tabanından indirilerek Excel üzerinde verinin özetleyici istatistiğine bakarak verinin uygunluğu kontrol edilmiştir. Daha sonra verinin dağılımını korelasyon tablosu kullanılarak test edilmiştir. Gruplar arası çeşitlilik Alfa ve Beta çeşitlilik analizi metotlarıyla karşılaştırılmıştır. Hiyerarşik küme analizi ve Rastgele Orman yöntemleriyle sınıflandırma yapılmıştır.



Şekil 3.1: Mikrobiyom veri madenciliğinin iş akışı.

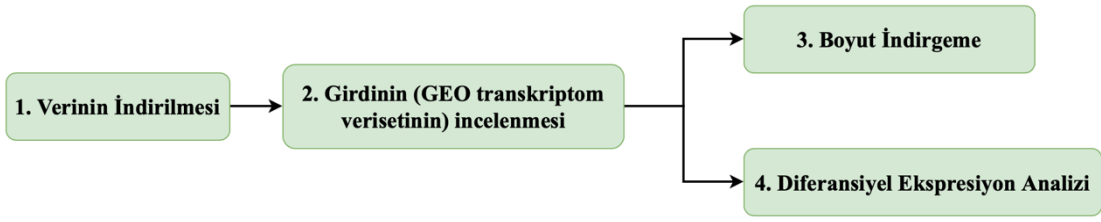
Çizelge 3.1: Mikrobiyota veri madenciliğinin basamakları ve teknik detayları.

Analiz Aşaması	Analiz Detayı	Analiz Türü	Analiz Yaklaşımı	Programlar
1) Girdinin (16S mikrobiyota verisetinin) incelenmesi	Özetleyici istatistik tablosu	Özetleyici İstatistik (Descriptive Statistics)	Tek Değişkenli Analiz	Excel
2) Örneklerin korelasyonu	Korelasyonu tablosu	Çıkarımsal İstatistik	İki Değişkenli Analiz	

		(Inferential Statistics)		
3) Mikrobiyal bolluğun profili	Çubuk grafiği	Özetleyici İstatistik	Tek Değişkenli Analiz	MicrobiomeAnalyst
4) Hiyerarşik kümeleme	Isı haritası ile denetimsiz makine öğrenmesi	Çıkarımsal İstatistik	Çok Değişkenli Analiz	
5) Alfa Çeşitlilik	Nokta grafiği ve kutu grafiği + ANOVA			
6) Beta Çeşitlilik	Boyut indirgeme (PCoA grafiği) + PERMANOVA ile denetimsiz makine öğrenmesi			
7) Differansiyel bolluk analizi	Gruplar arası farkın tek değişkenli analizi (ANOVA)		Tek Değişkenli Analiz	
8) Grupların sınıflandırılması	Rastgele orman ile denetimli makine öğrenmesi		Çok Değişkenli Analiz	

3.3. Uygulanan Transkriptom Veri Madenciliğinin Metodolojisi

Transkriptom analizinde kullanılan veri seti GEO veri tabanından indirilmiştir ve girdi olarak kullanılmıştır. Transkriptom analizi için kullanılacak veri seti öncelikle kalite açısından kontrol edilmiştir. Aksolotl kol rejenerasyonu sırasında transkriptomun temporal dinamiği görüntülenmiştir ve günlere göre benzerlikler gösterilmiştir. Örnekler içindeki gen ekspresyon dağılımı incelenmiştir. Aynı zamanda ekspresyon dağılımı örnekler arasında da karşılaştırılmıştır. Çok değişkenli bir analiz olan ve aynı zamanda bir denetimsiz makine öğrenmesi metodu olan UMAP ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2: Transkriptom veri madenciliğinin iş akışı.

Çizelge 3.2: Transkriptom veri madenciliğinin basamakları ve teknik detayları.

Analiz Aşaması	Analiz Detayı	Analiz Türü	Analiz Yaklaşımı	Program
1) Girdinin (GEO transkriptom veri setinin) incelenmesi	Kalite kontrolü (Çubuk grafiği)	Özetleyici İstatistik	Tek Değişkenli Analiz	Geo2R
2) Boyut indirgeme	Global ekspresyon verisinin UMAP analizi ile denetimsiz makine öğrenmesi	Çıkarımsal İstatistik	Çok Değişkenli Analiz	
3) Diferansiyel ekspresyon analizi	Gruplar arası farkın tek değişkenli analizi (LIMMA)		Tek Değişkenli Analiz	

BÖLÜM 4

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Mikrobiyota Analiz Sonuçları

4.1.1. Mikrobiyota bolluk tablosunun incelenmesi

Analizde başlangıç noktası olarak kullanılacak ASV bolluğu tablosu formatındaki mikrobiyota verisi öncelikle tanımlayıcı istatistik metotları kullanılarak incelendi. Bu şekilde bu esas girdi verinin özetleyici istatistiği elde edildi **Çizelge 4.1**. Bu tür bir özetleme veriye kuş bakışı sunmaktadır ve örnekler arasında tanımlayıcı istatistikler temelinde kıyaslama imkânı sunmaktadır. Bu bağlamda, örnekler arasında toplam ASV sayısı bakımından fark olduğu gözlemlendi. Bu da örnekler arasında sekanslama derinliği açısından belli bir fark olduğunu ortaya koydu. En küçük sayı (minimum) olarak sıfır bulundu. Bunun sebebi bazı ASV'lerin belli örneklerde hiç olmayışı yani bolluklarının sıfır olması. ASV verisi okuma (read) sayısına dayanan bir veri olduğu için değişken çeşidi süreksiz (kesikli) değişken'dir (discrete variable). Bu yüzden en küçük sayı sıfır çıkması çok tabii bir durumdur. Öbür yandan, En büyük sayı da (maximum) en yüksek bolluk sahip olarak saptanan ASV'nin sahip olduğu bolluğu ifade eder. Bu şekilde her örnekteki bu tür en çok bol olan ASV'lerin (the top abundant ASV) bolluk seviyesi da tespit edilmiş oldu. Tanımlayıcı istatistik tablosundaki Say (count) istatistiği sayesinde tablodaki satır sayısı yani ASV sayısı 4433 olarak bulundu. Doğal olarak bu sayı tüm örneklerde aynı çıkmış oldu. Bu her örnekte bu ASV'lerin bolluk olarak bulunduğunu göstermiyor. Yani yukarıda da belirtildiği gibi bazı ASV'ler bazı örneklerde bolluk bakımından sıfır seviyesinde yani yok olarak bulunabilir. Özetle, yapılan tanımlayıcı istatistik analizi daha ileri (çıkarımsal) istatistik aşamasına geçmeden önce veri hakkında önemli, özetleyici bilgiler sağladı. Bu özet sayesinde hem kullanılan veriye faydalı bakış açısı elde edildi, hem de sonraki aşamalara daha bilinçli bir geçiş sağlandı.

Çizelge 4.1: ASV tablosunun tanımlayıcı istatistiği.

	G1R1	G1R2	G1R3	G1R1	G1R2	G1R3
Ortalama	66,49	69,71	74,66	32,70	81,25	62,74
Ortance	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Kip	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Örnek Varyans	358291,44	392161,62	662747,19	83049,15	822766,51	296209,69
Standart Sapma	598,57	626,23	814,09	288,18	907,06	544,25
Standart Hata	8,99	9,41	12,23	4,33	13,62	8,17
Basıklık	420,86	396,50	1881,28	344,18	850,47	358,87
Çarpıklık	18,35	17,96	37,72	17,08	25,59	17,18
En Büyük	18696,00	18620,00	43609,00	7473,00	37709,00	15189,00
En Küçük	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Aralık	18696,00	18620,00	43609,00	7473,00	37709,00	15189,00
Say	4433,00	4433,00	4433,00	4433,00	4433,00	4433,00
Güvenirlilik Düzeyi(95,0%)	17,63	18,44	23,97	8,49	26,71	16,03
Toplam	294755,00	309042,00	330958,00	144943,00	360187,00	278140,00

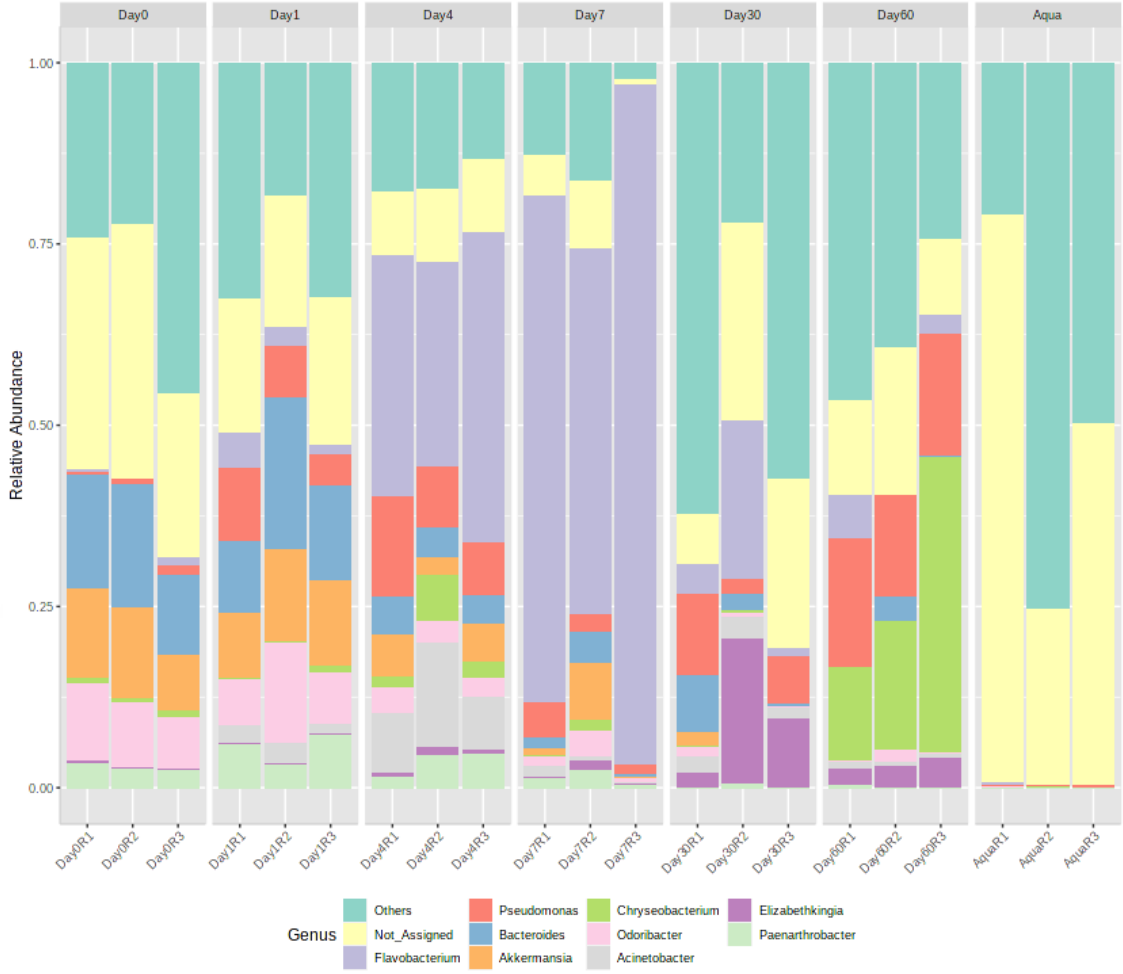
	G1R1	G1R2	G1R3	G1R1	G1R2	G1R3
Ortalama	54,71	71,15	70,36	78,53	70,79	92,41
Ortance	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Kip	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Örnek Varyans	1316546,23	1845497,22	3732720,37	12318712,93	4867323,18	33184196,10
Standart Sapma	1147,41	1358,49	1932,02	3509,80	2206,20	5760,57
Standart Hata	17,23	20,40	29,02	52,71	33,14	86,52
Basıklık	3609,85	2677,48	3957,41	4361,62	4248,62	4431,41
Çarpıklık	57,66	48,05	61,43	65,79	64,55	66,56
En Büyük	72584,00	79423,00	125067,00	232765,00	145376,00	383515,00
En Küçük	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Aralık	72584,00	79423,00	125067,00	232765,00	145376,00	383515,00
Say	4433,00	4433,00	4433,00	4433,00	4433,00	4433,00
Güvenirlilik Düzeyi(95,0%)	33,79	40,00	56,89	103,35	64,96	169,62
Toplam	242528,00	315410,00	311928,00	348131,00	313793,00	409656,00

	G1R1	G1R2	G1R3	G1R1	G1R2	G1R3	S1R1	S1R2	S1R3
Ortalama	66,99	72,29	66,43	52,84	87,73	56,13	29,20	35,04	36,80
Ortanca	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Kip	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Örnek Varyans	235955,73	1835686,38	848687,64	377712,63	1177258,93	1680429,75	495504,52	609244,32	572202,32
Standart Sapma	485,75	1354,88	921,24	614,58	1085,02	1296,31	703,92	780,54	756,44
Standart Hata	7,30	20,35	13,84	9,23	16,30	19,47	10,57	11,72	11,36
Basıklık	483,91	1313,07	1051,54	753,42	1236,11	3289,48	1659,74	1208,91	949,69
Çarpıklık	18,50	35,32	29,95	24,84	30,30	54,50	38,07	32,68	29,34
En Büyük	17244,00	54021,00	39283,00	21849,00	51513,00	80019,00	34949,00	34728,00	27766,00
En Küçük	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Aralık	17244,00	54021,00	39283,00	21849,00	51513,00	80019,00	34949,00	34728,00	27766,00
Say	4433,00	4433,00	4433,00	4433,00	4433,00	4433,00	4433,00	4433,00	4433,00
Güvenirlilik Düzeyi(95,0%)	14,30	39,89	27,13	18,10	31,95	38,17	20,73	22,98	22,27
Toplam	296971,00	320444,00	294501,00	234231,00	388892,00	248840,00	129428,00	155313,00	163146,00

4.1.2. Mikrobiyota örneklerinin ASV bolluğu bakımından ikili kıyaslanması

Bir sonraki aşamada mikrobiyota örnekleri ASV bolluğu bakımından ikili kıyaslandı. Bunun için bir çıkarımsal istatistik olan Pearson korelasyonu kullanıldı. Sonuçlar bir korelasyon tabloyla özetlendi. Bu tablo doğası gereği simetriktir. Bu yüzden tekrar

tanımaktadır. Bu yolla söz konusu mikrobiyom profili sayesinde mikroyomun zamansal dinamiği (temporal dynamics) anlaşılmıştır. Şekil 4.1’de mikrobiyal topluluktaki değişimler taksonomik seviye olarak cins (genus) seviyesinde dikey çubuk grafiği şeklinde gösterilmiştir. Bu grafikte kıyaslamayı kolaylaştırmak için göreceli bolluk (relative abundance) kullanılmıştır. Bu sonuç incelendiğinde üç rejenerasyon fazı arasında ciddi farklılıklar göze çarpmaktadır. İlginç olarak ikinci faza (blastema oluşumu fazına) karşılık gelen örnek gruplarındaki (yani dördüncü ve yedinci günde) genus bolluğu diğer tüm örnek gruplarından oldukça farklıdır. Bu fazda, mikrobiyal bollukta ve çeşitlilikte şu değişim olmuştur: *Flavobacterium* en baskın (dominant) cins haline gelmiştir. Bir sonraki fazda ise bu baskınlık ortaya kalkmıştır ve yerini başka cinslere bırakmıştır. Bu bağlamda mikrobiyal bolluk açısından blastema oluşumu bir şekilde özellikle *Flavobacterium* ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Bir başka ilginç sonuç ise sadece Gün60 (dpa60) örneklerinde *Chryseobacterium* bolluğunun artması. Diğer bir ifadeyle, aksolotl kol rejenerasyonunda zaman olarak en sonunda bu cinsin arttığı gözlemlendi. Görselde de belirtildiği gibi akvaryum suyu örneklerin diğer örneklerden farklılığı dikkat çekmektedir. Akvaryum suyu grubu bir kontrol grubu olarak kullanıldığı için bu beklenen bir durumdur.

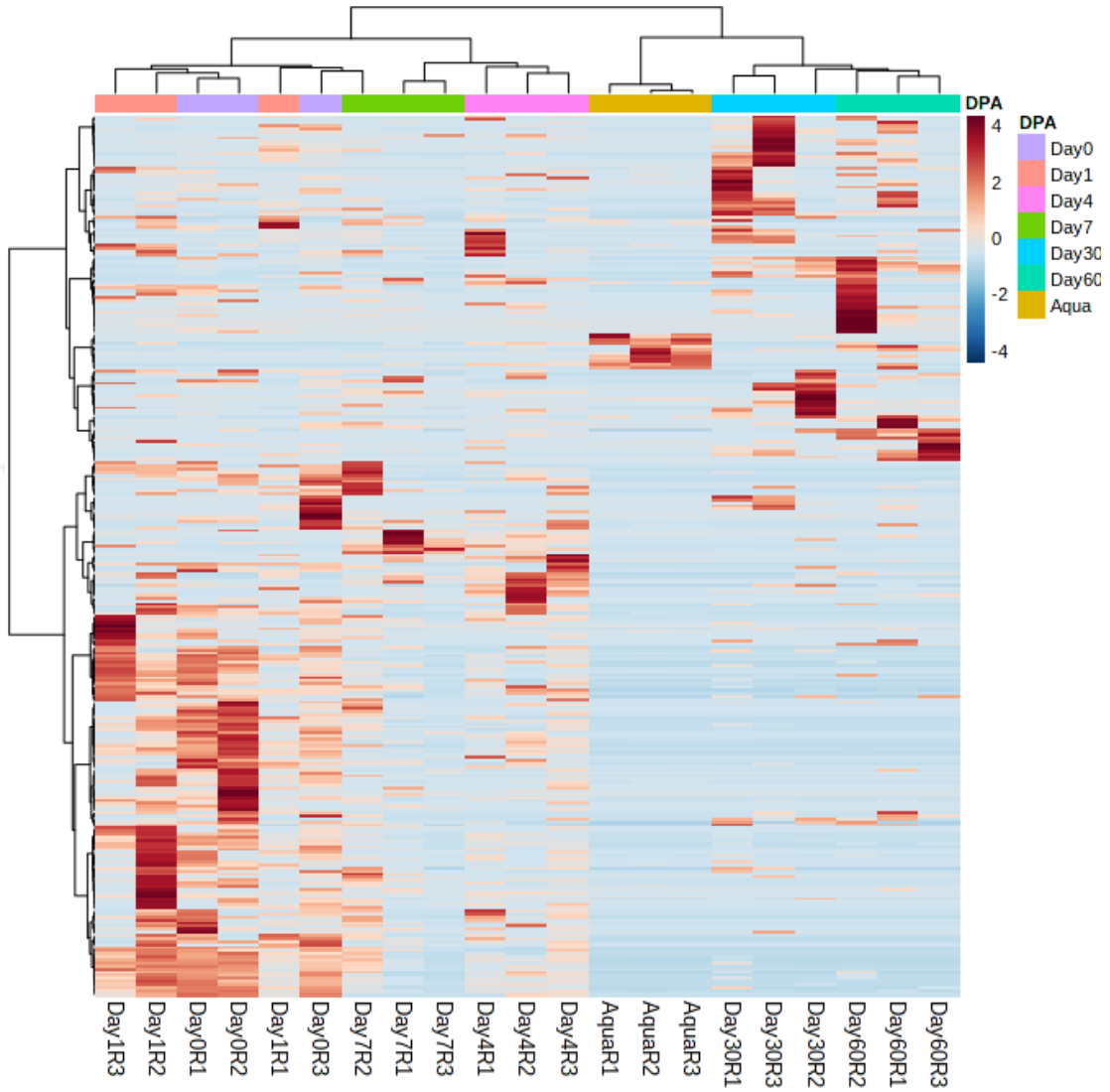


Şekil 4.1: Genus seviyesinde mikrobiyal bolluğun profillenmesi.

4.1.4. Hiyerarşik kümeleme analizi

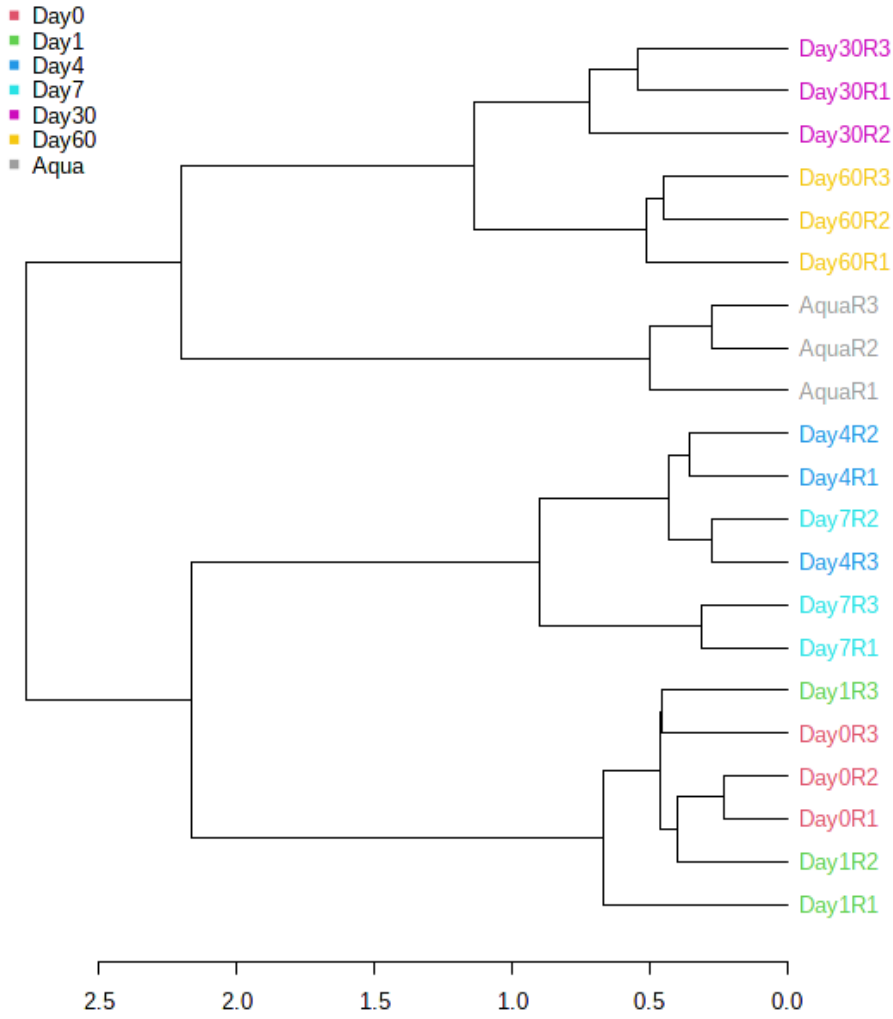
Mikrobiyal bolluk bakımından örnekleri ve ASV'leri birbiriyle kıyaslamak ve yeni ipuçları elde etmek için hiyerarşik kümeleme analizi. Hem örneklere hem özneliklere (ASV'lere) kümele uygulandı. Ortaya çıkan küme sonucu ısı haritası figürüyle görüntülendi **Şekil 4.2** Isı haritasındaki dendogram sayesinde yakın kümelenen örnekler ve ASV'ler tespit edildi. Bu analizde odak noktası örnekler olduğu için ve ASV'lerin sayısı çok fazla olduğu için ASV'lerin ID'leri gösterilmedi. Ortaya çıkan küme sonucu rejenerasyon günü örneklerinin rejenerasyon fazlarına göre kümelendiğini göstermiştir. Böylelikle rejenerasyon fazları ASV'ler bolluğu bakımında birbirinden ayrıştığı görüldü. Her üç rejenerasyon fazı için bu fazlarda sayısal olarak miktarı yüksek olan bazı ASV'lerin varlığı gözlenmiştir. Bu differansiyel bolluk profili aday biyobelirteçlerin saptanması için bir temel oluşturmaktadır. Mikrobiyom seviyesinde açıkça görünen farklılar çubuk grafikte (bir önceki adımda) elde edilen sonuçlarla da uyum içindedir.

Birinci faz gruplarının (Gün0 ve Gün1 örneklerinin) ve ikinci faz gruplarının (Gün4 ve Gün7 örneklerinin) birbirine yakın gruplaşması kayda değer bir bulgu olarak saptandı.



Şekil 4.2: ASV bolluğuna dayalı hiyerarşik kümeleme ısı haritası.

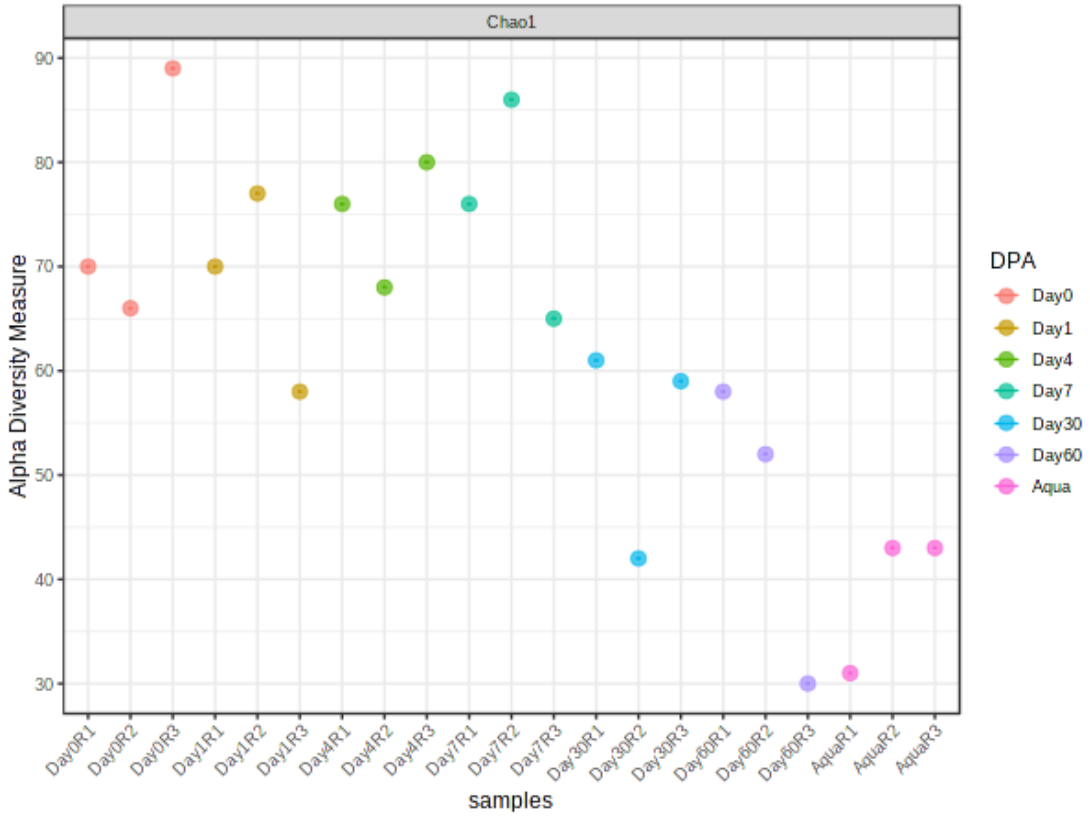
Isı haritasıyla gözlemlenen mikrobiyom profilin ek bakış elde etmek ve örneklerin mikrobiyal bolluğa kümelenmesini daha yakından incelemek için hiyerarşik kümeleme analizi dendogram üzerine odaklanarak tekrar yapıldı. Neticede elde edilen dendogram figürü örneklerin arasındaki benzerlikleri ve farklılıkları görüntüleme açısından daha net ortaya koymaktadır Şekil 4.3. Bu tür dendogram görüntülemesi ısı haritasına ek olarak düşünülmüş ve sonuçta değerli bir bakış açısı sağlamıştır. Dendogramın sağladığı bir başka katkısı ise örneklerin arasındaki farklılıkların uzunluk şeklinde sayısal olarak ifade edilmesidir.



Şekil 4.3: ASV bolluğuna dayalı hiyerarşik kümeleme dendogramı.

4.1.5. Alfa çeşitliliğin profillenmesi ve anlamlılık testleri

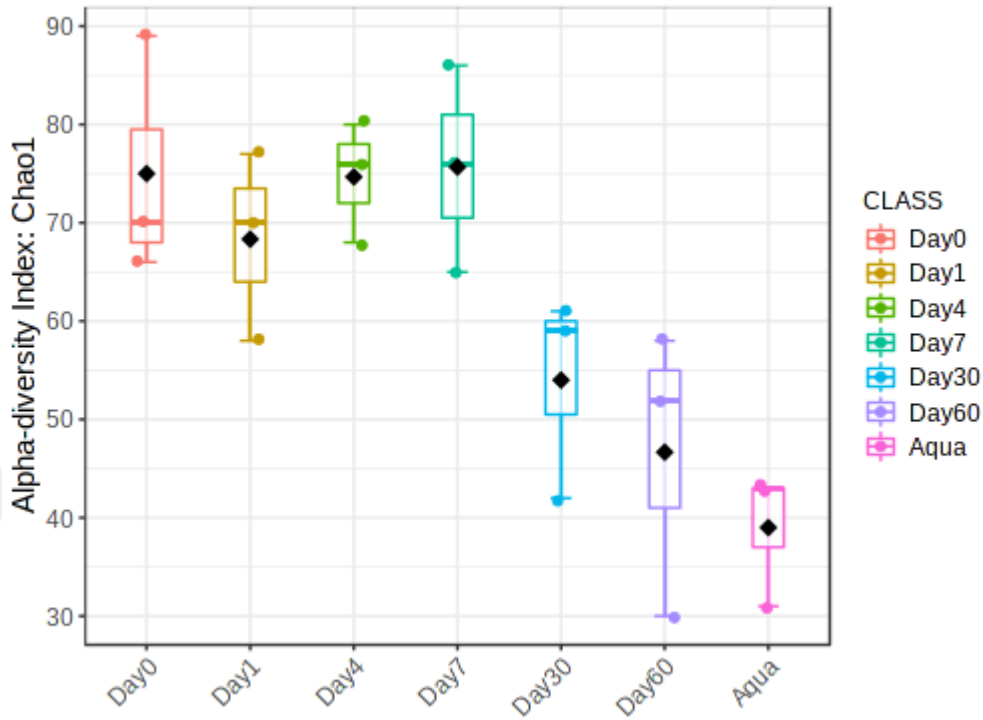
Aksolotl kol rejenerasyonu sürecinde mikrobiyomun genus seviyesindeki çeşitliliğini anlamak için alfa çeşitlilik analizi uygulanmıştır. Bu analiz sayesinde üç rejenerasyon fazı arasında fark ve dolayısıyla alfa çeşitlilik mikrobiyal çeşitlilik değişimi belirgin bir şekilde gözlemlenmiştir. Chao1 metriği ile yapılan alfa çeşitlilik analiz sonuçları nokta grafiği ile gösterildi **Şekil 4.4**. Bu analiz kapsamında üçüncü fazda alfa çeşitlilikte büyük düşüş yaşandığı anlaşıldı. Bununla ilgili olarak, en geç rejenerasyon zaman noktasına (timepoint) karşılık gelen Gün60 grubunda diğer rejenerasyon zaman noktalarına göre alfa çeşitliliğin en düşük seviyede olduğu gözlemlendi. Kontrol olarak kullanılan Su grubunda ise alfa çeşitliliği diğer tüm gruplara göre daha düşük olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.4: Genus seviyesindeki mikrobiyal bolluğa dayalı, Chao1 metoduyla elde edilmiş, alfa çeşitliliği nokta grafiği.

Chao1 metriğiyle tespit edilen alfa çeşitliliğine daha derinlemesine bakış açısını kazanmak için ek görüntüleme elde edildi. Bu amaçla alfa çeşitlilik açısından gruplar arasında kıyaslamayı daha pratik bir şekilde yapabilmek için grupların alfa çeşitlilik dağılımları kutu grafiği (histogram) figürü ile görüntülendi **Şekil 4.5**. Bu görüntülemeye her gruptaki örnek birer nokta olarak belirtildi. Bu şekilde hem her örneğin alfa çeşitliliği hem grupların ortanca kolaylıkla gözlemlenebilmiştir. Kutu grafiği sayesinde alfa çeşitliliğinde meydana gelen değişimler ve rejenerasyon boyunca bir şekilde gözlemlendi. Üçüncü rejenerasyon faz diğer fazlara göre daha düşük alfa çeşitliliğe sahipken kendi içinde kısmen farklılık göstermektedir. Alfa çeşitlilikteki genel trend üçüncü fazda bu çeşitliliğin ciddi anlamda düşmesi. Su grubunun alfa çeşitliliği ise diğer gruplara göre daha düşük bulundu. Özet olarak kutu grafiği sayesinde nokta grafikteki sonuca ek yeni sonuç sağlandı. Her iki grafik de aksotl kol rejenerasyonu sırasında mikrobiyotanın alfa çeşitliliğinde büyük ölçüde değişime uğradığını gözler önüne serdi. Gruplar arasındaki ortalama farkı çoklu grup karşılaştırması (multiple group comparison) ile test edildi. Sadece bir değişken (yani alfa çeşitlilik değeri) incelendiği için tek değişkenli analizi (univariate analysis) uygulandı. ANOVA metodu kullanılarak

gerçekleştirilen bu testin sonucunda gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.002$).

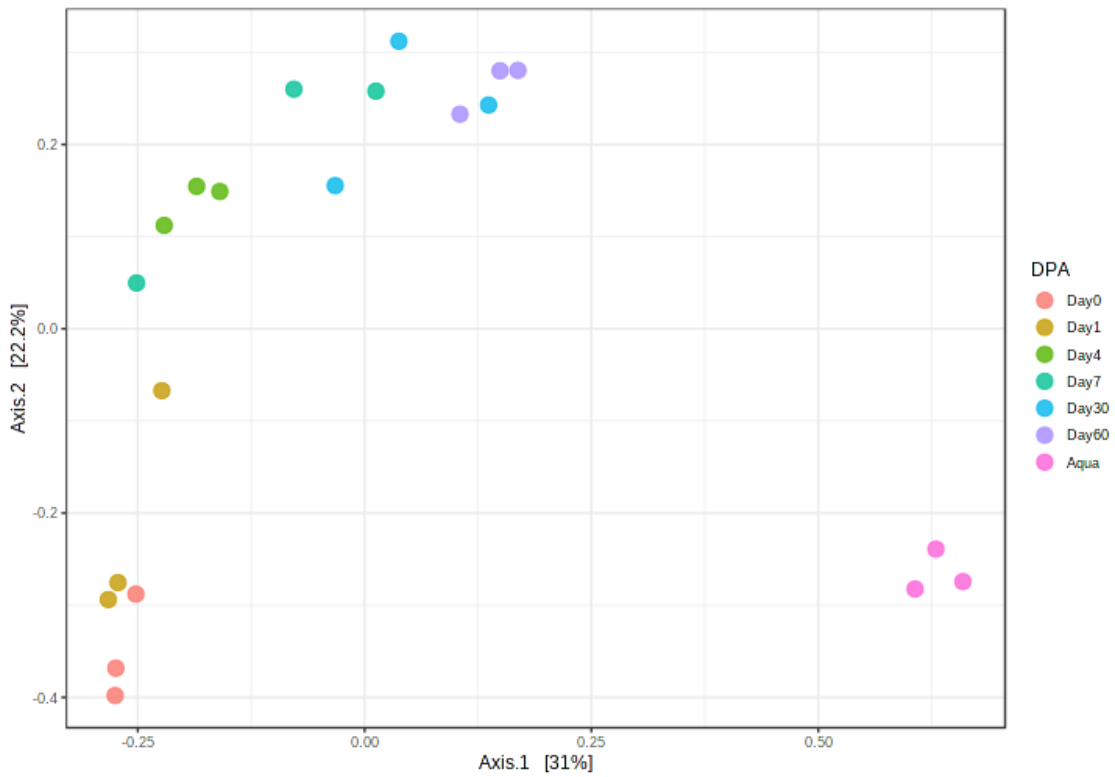


Şekil 4.5: Genus seviyesindeki mikrobiyal bolluğa dayalı, Chao1 metoduyla elde edilmiş, alfa çeşitliliği kutu grafiği.

4.1.6. Beta çeşitliliğin profillenmesi ve anlamlılık testleri

Aksolotl kol rejenerasyonu sürecinde mikrobiyom genus çeşitliliğini anlamak için beta çeşitlilik analizi uygulanmıştır. Bu analiz sayesinde üç rejenerasyon fazı arasında beta çeşitlilik farkı ve dolayısıyla bu çeşitliliğin zamansal (temporal) değişimi açıkça gözlemlenmiştir. Uzaklık ölçümü olarak Bray-Curtis indeksi'nin kullanılarak elde edilen beta çeşitlilik analiz sonuçları PCoA grafiği ile gösterildi (Şekil 4.6). Bir boyut indirgeme metodu olan PCoA metoduyla örnekler iki boyutlu bir figüre konumlandırıldı yani ordınasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Bu görselde örnekler ait oldukları gruba göre renklendirildi. Bu analiz rejenerasyonun başlangıcından sonuna kadarki süreçte devamlı bir şekilde bir farklılaşma olduğunu ortaya koydu. Görselde değişimin bu devamlılığı bir çeşit gradyan (gradient) şeklinde gözlemlendi. Böylelikle görüntülenen ordınasyonda en geç rejenersyon zaman noktasına (timepoint) karşılık gelen Gün60 grubunun ilk zaman noktası grubuna (Gün30'a) göre en uzak konumda yer aldığı gözlemlendi. Kontrol grubu olarak su grubunda ise beta çeşitlilik beklendiği gibi diğer gruplardan farklı çıktı. Özetle PCoA figürü ile örneklerin beta çeşitlilik bakımından ordınasyonu gözlemlendi. Gruplar

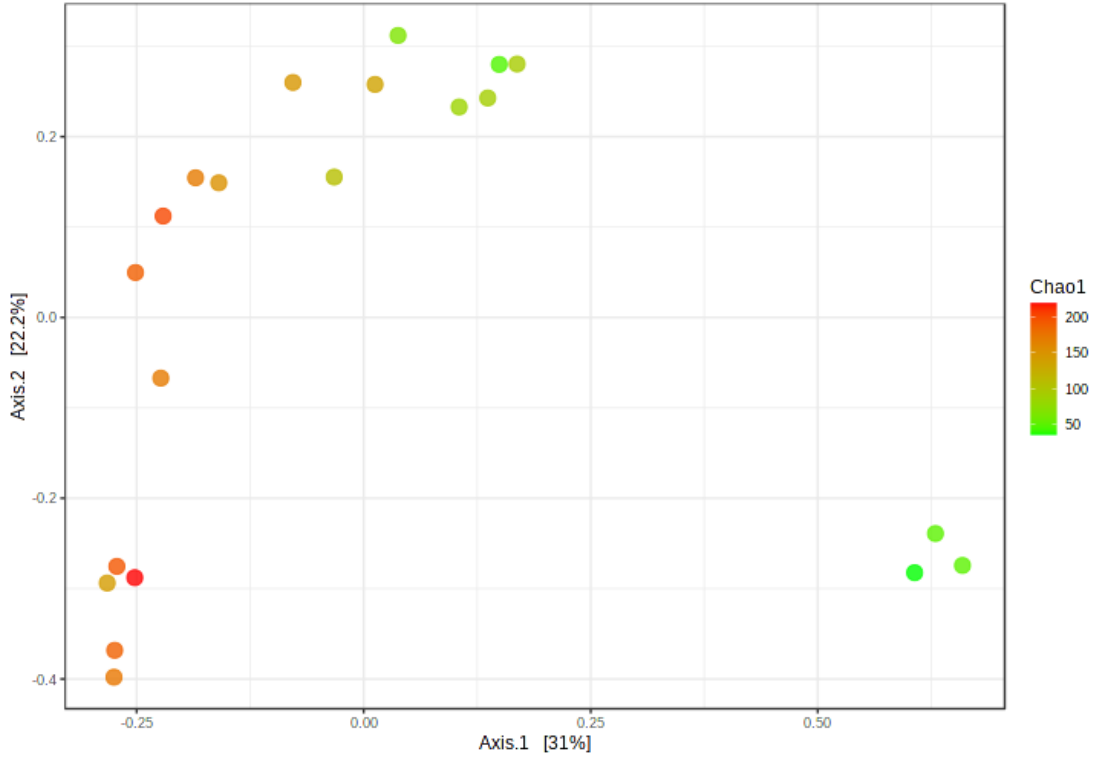
arasındaki fark çok değişkenli analiz (multivariate analysis) ile test edildi. Permutational ANOVA (PERMANOVA) metodu kullanılarak gerçekleştirilen bu testin sonucunda gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$). Figürdeki Eksen 1 ve Eksen 2'in kapsadığı yüzdeler sırasıyla 31% ve 22% olarak saptandı. Böylece bu yüzdelerin toplamı %53 olarak bulundu. Bu sonuç örneklerin arasında gözlemlenen ayrışmanın kapsanan varyasyon açısından yeterince dayanağı olduğuna işaret ediyor. Diğer bir ifadeyle verideki biyolojik sinyal gözlemlenen ayrışmayı yeterince destekliyor. Netice olarak örneklerin beta çeşitlilik bakımından ayrışıp gruplarda toplanması istatistiksel olarak güvenilir bulundu.



Şekil 4.6: Genus seviyesindeki mikrobiyal bolluğa dayalı, beta çeşitliliği PCoA grafiği.

Bir sonraki işlem olarak aksotl kol rejenerasyonu sürecinde mikrobiyomun hem beta çeşitlilik hem alfa çeşitlilik bakımında nasıl değiştiği entegre bir şekilde araştırılmıştır. Bu kapsamda her iki sonuç aynı PCoA figüründe görüntüledi **Şekil 4.7**. Bu analiz de önceki çeşitlilik analizleri gibi genus seviyesinde uygulanmıştır. Figürdeki örneklerin konumu ve eksenlerin kapsadığı yüzdeler Şekil 6 ile tamamen aynıdır. Yenilik olarak bu görüntüleme sayesinde üç rejenerasyon fazı arasında hem beta çeşitliliğin hem alfa çeşitliliğin zamansal (temporal) değişimi açıkça gözlemlenmiştir. Uzaklık ölçümü olarak Bray-Curtis indeksi'nin kullanılarak elde edilen beta çeşitlilik analiz sonuçları PCoA

grafisinde örneklerin konumlandırılmasını (ordinasyonunu) belirledi. Burada örneklerin arasındaki beta çeşitlilik farkı örneklerin arasındaki uzaklık olarak ifade edildi. Bir ordinasyonda PCoA'nın boyut indirgeme özelliğinden faydalandı. Böylece çok değişkenli veri türü olan genusların bolluğuna dayalı olarak örnekler arası fark analiz edildi ve ortaya çıkan sonuçlar örneklere odaklanarak görüntülenmiştir. Öbür yandan oluşturulan görselde örnekler alfa çeşitliliğe göre renklendirildi. Bu analiz rejenerasyonun başlangıcından sonuna kadarki süreçte hem alfa hem beta çeşitlilik açısından aynı anda (eşzamanlı) bir farklılaşma olduğunu ortaya koydu. Zamansal olarak bu farklılaşma her iki veri çeşidi için de bir süreklilik (continuum) gösterdiği gözlemlendi. Figürdeki bu simültane değişimin devamlılığı bir çeşit gradyan (gradient) olarak değerlendirilebilir. Böylelikle konum (beta çeşitlilik) ve renklendirme (alfa çeşitlilik) farkları aynı anda düşünüldüğünde en büyük farklılık en geç rejenerasyon zaman noktasına (timepoint) karşılık gelen Gün60 grubu ile ilk zaman noktası grubu (Gün30'a) arasında olduğu gözlemlendi. İlginç olarak söz konusu rejenerasyon sırasında beta çeşitlilik farklılık gittikçe derinleşirken (örnekler arasında ayırım artarken), alfa çeşitlilikte ise devamlı bir düşüş gözlemlendi. Bu pattern şöyle yorumlanabilir: Rejenerasyon sırasında araştırılan zaman dilimlerinde mikrobiyota içerik olarak önceki zaman dilimine kıyasla gittikçe farklı hale geliyor ve aynı zamanda kendi içinde ise gittikçe daha homojen hale gelmektedir. Kontrol grubu olarak kullanılan su grubu ise hem beta çeşitlilik diğer tüm gruplardan farklı çıktı, hem de alfa çeşitlilik açısından oldukça düşük bulunmuştur. **Şekil 4.1** ile beraber düşünüldüğünde bu patternin altında yatan en olası sebep olarak bazı bakteri taksonlarının belirli zaman dilimlerinde mikrobiyal topluluğu baskılamasıdır. Özetle bu PCoA figürü hem önceki çeşitlilik sonuçlarını teyit etmiştir, hem de bu konuya bütünleştirici bir bakış açısı sağlamıştır.



Şekil 4.7: Genus seviyesindeki mikrobiyal bolluğa dayalı, alfa çeşitliliği ve beta çeşitliliği aynı anda gösteren PCoA grafiği.

4.1.7. Gruplar arası farkın tek değişkenli analizi

Bir sonraki işlem olarak aksotl kol rejenerasyonu sürecinde mikrobiyom bolluğunun tek değişkenli analizi (univariate analysis) gerçekleştirilmiştir. Bu basamakta örnek grupları arasında bolluğu değişen genuslar (cinsler) araştırıldı yani genus değişken olarak değerlendirilip incelenmiştir. Gruplar arasındaki ortalama farkı çoklu grup karşılaştırması (multiple group comparison) ile test edilmiştir. ANOVA metodu kullanılarak gerçekleştirilen bu testin sonuçları için çoklu test için kontrol (controlling for multiple testing) işlemi de uygulanmıştır. Bir genusun anlamlı değişimi için eşik değer (cut-off threshold) olarak $FDR < 0.05$ seçilmiştir. Elde edilen test sonuçları Tablo 3 gösterilmiştir. Söz konusunda ham p değerleri yanı sıra FDR değerleri de gösterildi. Anlamlı olarak bulunan genuslar FDR değerine göre sıralanmıştır. Burada en düşük FDR değerine sahip genus en anlamlı aileye karşılık gelmiştir. Tabloda son olarak (ayrıca) her anlamlı genus için gruplar arasındaki farkın büyüklüğü (magnitude) ilgili bir istatistik olarak gösterilmiştir. Bu tek değişkenli analiz ile bolluğu istatistiksel olarak anlamlı değişen 26 genus saptanmıştır. Bu 26 genus arasında bolluk seviyesi en anlamlı değişim gösteren genus olarak Angelakisella ($FDR = 2.9584E-4$) bulunmuştur. Tespit edilen bu anlamlı genuslar **Şekil 4.1**'de gözlemlenen mikrobiyom dinamiğinin sürücülere (drivers) olarak

ve **Şekil 4.6** da gözlemlenen örnek bazından kümelenmenin nedenleri olarak sayılabilmektedir. Böylelikle mikrobiyata bileşimi (microbiota composition) içindeki bu tarz anlamlı bolluk seviyesi değişimi biyobelirteç olarak kullanıma da potansiyel olarak imkân tanımaktadır. Bir sonraki aşamada bu husus daha detaylı bir şekilde araştırılmıştır.

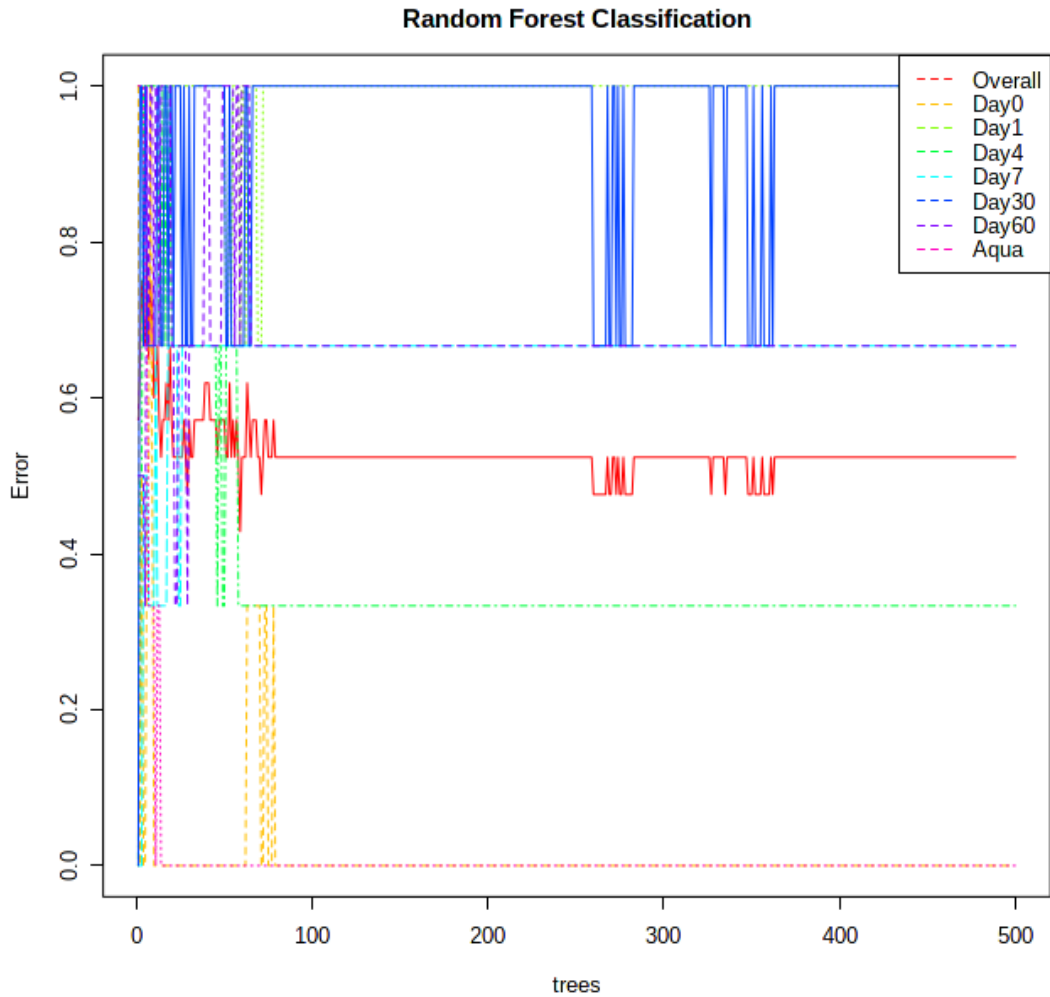
Çizelge 4.3: Bolluğu anlamlı olarak değişen aileler.

	Pvalues	FDR	Statistics
Angelakisella	3.2157E-06	0.00029584	20.761
Pseudomonas	1.6479E-05	0.00075802	15.814
Devosia	3.8638E-05	0.0011652	13.655
Reyranela	5.0659E-05	0.0011652	13.022
Hydrogenophaga	8.4872E-05	0.0015616	11.88
Flavobacterium	0.00010466	0.0016048	11.44
Acinetobacter	0.00014973	0.0019679	10.717
Rikenella	0.0003477	0.0039985	9.153
Parabacteroides	0.00046232	0.004726	8.6646
Delftia	0.00053814	0.0048484	8.4122
Corynebacterium_1	0.00060974	0.0048484	8.2085
Paenarthrobacter	0.0006324	0.0048484	8.1497
Chryseobacterium	0.00079574	0.0056314	7.7861
Ruminococcaceae_UCG_014	0.0010166	0.0066802	7.411
Akkermansia	0.0011448	0.0070212	7.2337
Anaerotruncus	0.0014837	0.0085315	6.8564
Aquabacterium	0.0017408	0.0094208	6.6306
Bacteroides	0.004636	0.023695	5.3493
Cutibacterium	0.0056627	0.027419	5.1079
Odoribacter	0.0065774	0.030256	4.9314
Flectobacillus	0.0073949	0.032397	4.7958
Pseudorhodobacter	0.0096303	0.040114	4.4975
Emticicia	0.010029	0.040114	4.4527
Gordonibacter	0.011339	0.043468	4.3181

4.1.8. Rastgele Orman metodu kullanılarak grupların sınıflandırması

Gruplar arası farkın tek değişkenli analizi basamağını Rastgele Orman metodu kullanılarak grupların sınıflandırması basamağı takip etmiştir. Bu yolla önceki basamakta

bulunan patternlere ek ipuçları elde etmek amaçlanmıştır. Gruplar arası farkın tek değişkenli analizi ile 26 anlamlı genus bulunmuştur. Bu analizde genusa değişken olarak yaklaşılmıştır. Rastgele Orman metodu kullanılarak ise grupları tahmin etmede katkı sağlayan aileler araştırılmıştır. Amaç mikrobiyom bolluk verisini kullanarak denetimli (gözetimli) makine öğrenmesini (supervised machine learning) uygulamaktır. Bu hedef için aile seviyesindeki bolluk verisi girdi olarak kullanılmıştır. Bu analizde ailelere öznelilik (feature) olarak yaklaşıldı. Rastgele Orman analizi default seçenek olan 500 ağaç kullanılarak yapılmıştır. İlk önce aile seviyesindeki mikrobiyal bolluğa dayalı rastgele orman sınıflandırmasının performansı değerlendirilmiştir. Sonuçların özeti **Şekil 4.8**'te gösterilmiştir. Ortalama hata yaklaşık olarak 0,5 olarak bulunmuştur. Hata eğrilerinin ağaç sayısı 500'e yaklaşırken dengelendiği görülmüştür. Buna dayanarak bu ağaç sayısını yeterli olduğuna karar verilmiştir. Denetimli öğrenmede bazı grupları tahmin için başarılı çalışırken, bazıları için ise yeterince başarılı değildi. En doğru tahmin edilen grup Gün1 grubu olmuştur.

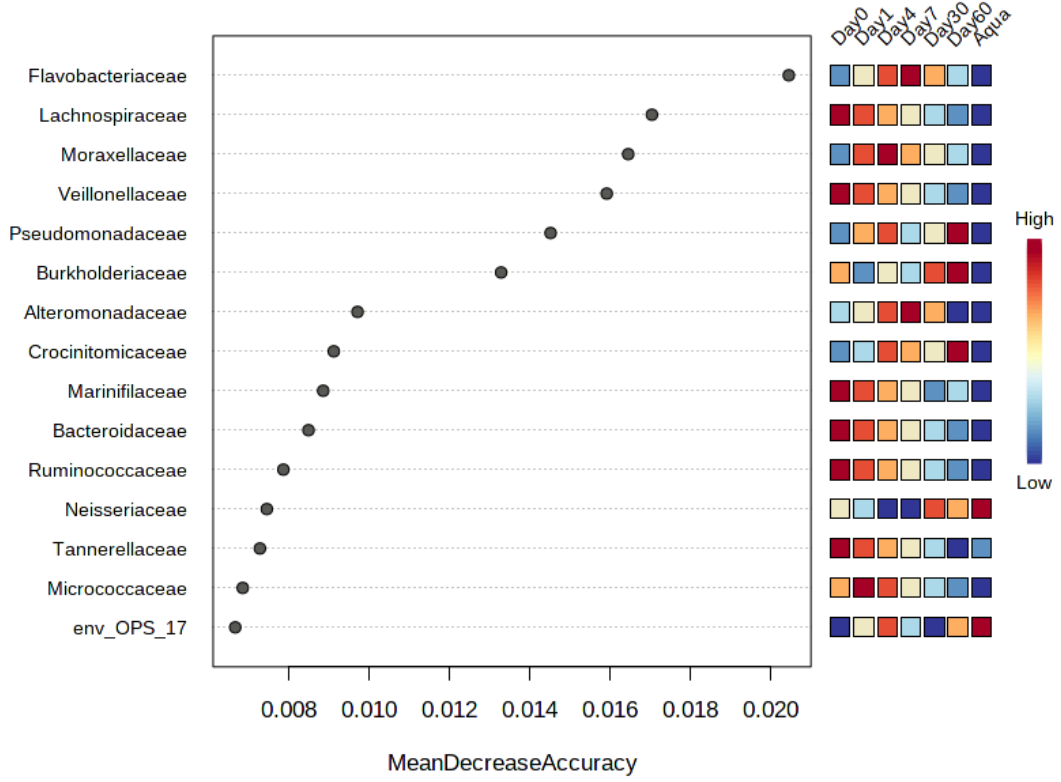


Şekil 4.8: Aile seviyesindeki mikrobiyal bolluğa dayalı rastgele orman sınıflandırmasının performansı.

Çizelge 4.4: OOB hatası: OOB error (Out-of-bag error).

The OOB hatası: 0.476								
	Day0	Day1	Day4	Day7	Day30	Day60	Aqua	class.error
Day0	3	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Day1	2	0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0
Day4	0	0	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.333
Day7	0	1	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.333
Day30	0	0	0.0	0.0	1.0	2.0	0.0	0.667
Day60	0	0	0.0	0.0	3.0	0.0	0.0	1.0
Aqua	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	0.0

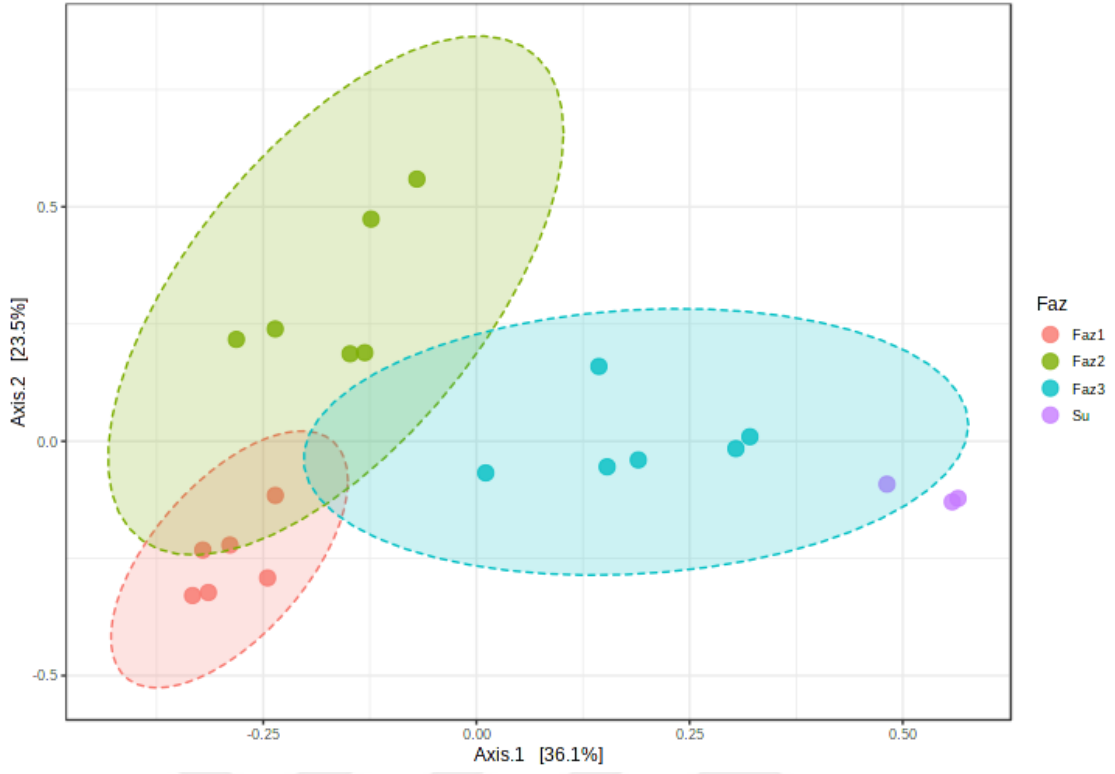
İkinci kısım olarak aksotl kol rejenerasyonu sürecinde grupları tahmin etmede en önemli olan aileler araştırıldı. Bu kapsamda girdi verideki aileler öznitelik olarak değerlendirildi. Neticede 15 aile önemli nitelik olarak saptandı. Tespit edilen anlamlı bu aileler **Şekil 4.2** ve **Şekil 4.3**'te gözlemlenen örnek bazından kümelenmenin de önemli sebepleri arasında düşünülebilir. Böylelikle aile seviyesinde bu tarz anlamlı bolluk seviyesi değişimi mikrobiyal biyobelirteç olarak kullanıma da potansiyel olarak imkân tanımaktadır. Öznitelikler tahmindeki öneme göre sıralandığında *Flavobacteriaceae* en önemli aile olarak listede en yukarıda bulunmuştur. Buradaki önem Mean Decrease Accuracy (Doğruluğun Ortalama Düşüşü) ölçümüyle belirlenmiştir. *Flavobacteriaceae* için bu değer 0.02'in yani %2'in üzerinde idi. Vurgulanan aileler arasında özellikle bu *Flavobacteriaceae* ailesi özellikle ikinci rejenerasyon fazına ait grupları tahmin etmede önemli bulunmuştur. Bu bakımdan bu aile blastema oluşumu için aday mikrobiyal belirteç olarak değerlendirilebilir ve daha ayrıntılı olarak araştırılabilir. Bir önceki basamakta da tek değişkenli analizi metoduyla *Flavobakterium* genusu anlamlı olarak farklılık gösteren aileler arasında saptanmıştır. Bu bakımdan o basamak ve bu basamaktaki sonuç arasında bir benzerlik var. Özetle denetimli öğrenme ile *Flavobacteriaceae* ve önemli öznitelikler listesindeki diğer aileler hakkındaki edinilen yeni bilgi rejenerasyon basamakları bazında aksotl rejenerasyon sürecine faydalı yeni bakış açısı sunmuştur.



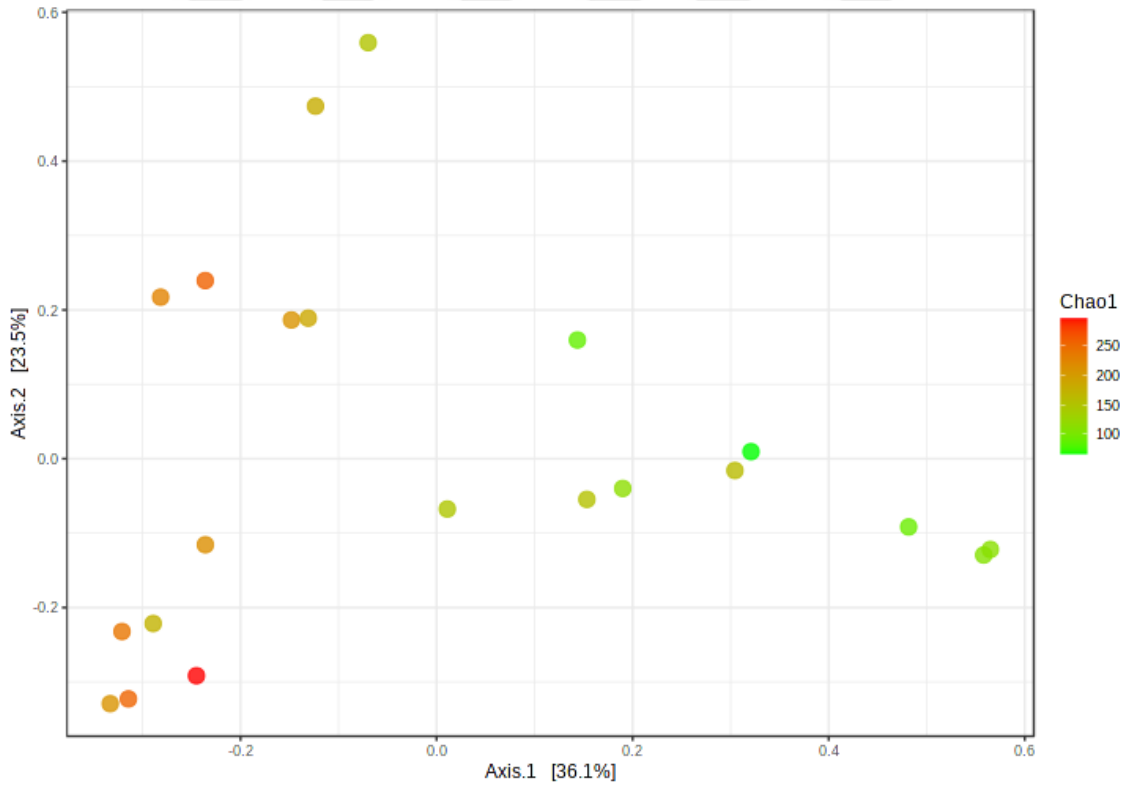
Şekil 4.9: Aile seviyesindeki mikrobiyal bolluğa dayalı rastgele orman sınıflandırmasıyla belirlenen en önemli 15 öznelik.

4.1.9. Rejenerasyon fazı bazında gerçekleştirilen sınıflandırma

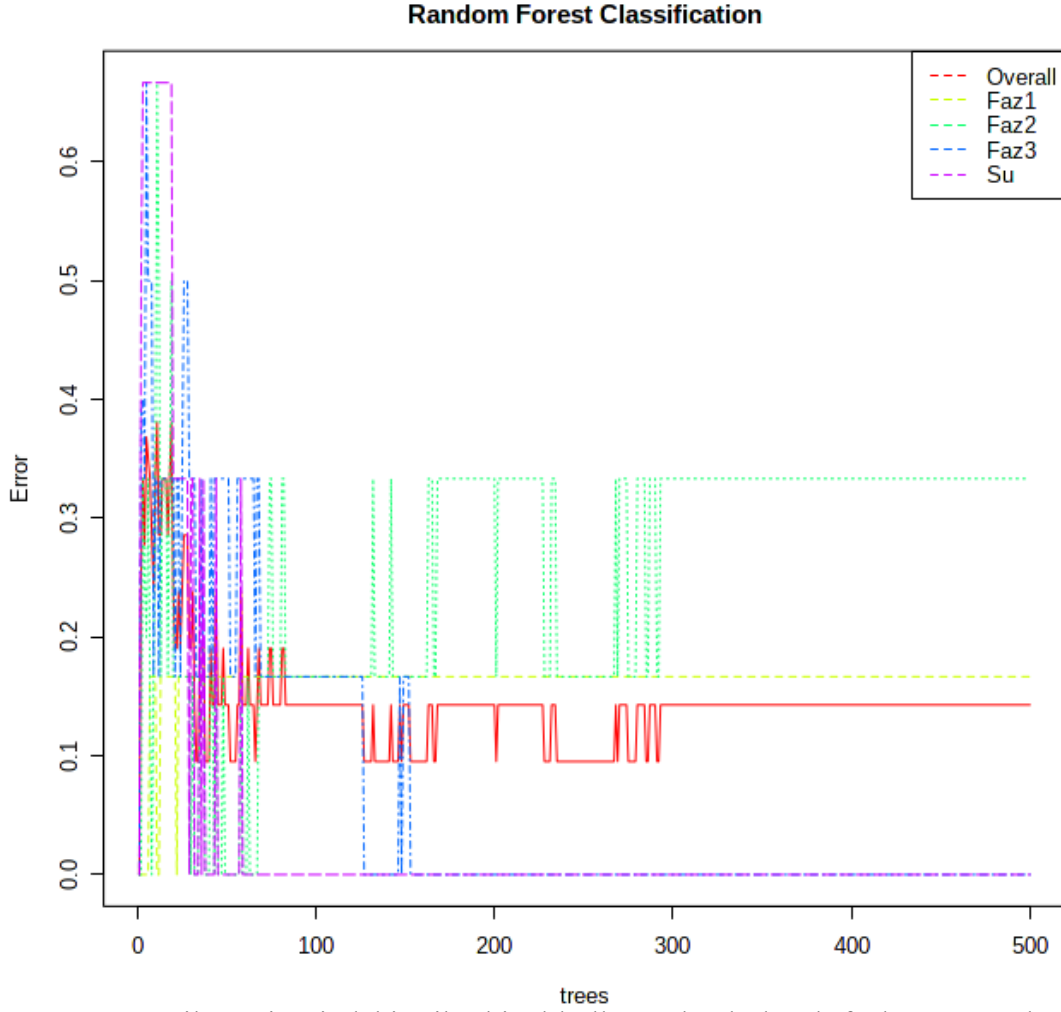
Mikrobiyom verisinde gruplar arası farklılıkları faz bazında beta çeşitlilik analizi ile test edilmiştir. Mikrobiyom verisinin analizinde, beta çeşitlilik analizi bakımından testi için çok değişkenli varyans analizi (PERMANOVA) yöntemi kullanılmıştır. Zamanla bir farklılaşma olduğu görülmektedir **Şekil 4.10**. Farklılaşma bir süreç şeklinde gelişmektedir ve bu süreç zaman ile uyumlu olduğu görülmektedir. Yani zamanla bakteri yoğunluğundaki başkalaşım göstermektedir. Burada grafik yüzdeleri toplandığında (%59.6) sonuç kapsayıcıdır ve bu da sonucun kabul edilebilir nitelikli bir sonuç olduğunu göstermektedir. Burada PCoA (Principal Coordinate Analysis) kullanılmıştır çünkü bakterilerde non-linear ilişki gözlemlenebilmektedir ve biz bu ilişkiyi gözden kaçırmak istenmediği ve bakteri değişimindeki yoğunluğu daha net görebilmek için bu analiz kullanılmıştır.



Şekil 4.10: Rejenerasyon fazı bazında Genus seviyesindeki mikrobiyal bolluğa dayalı beta çeşitliliği PCoA grafiği.



Şekil 4.11: Rejenerasyon fazı bazında genus seviyesindeki mikrobiyal bolluğa dayalı, alfa çeşitliliği ve beta çeşitliliği aynı anda gösteren PCoA grafiği.

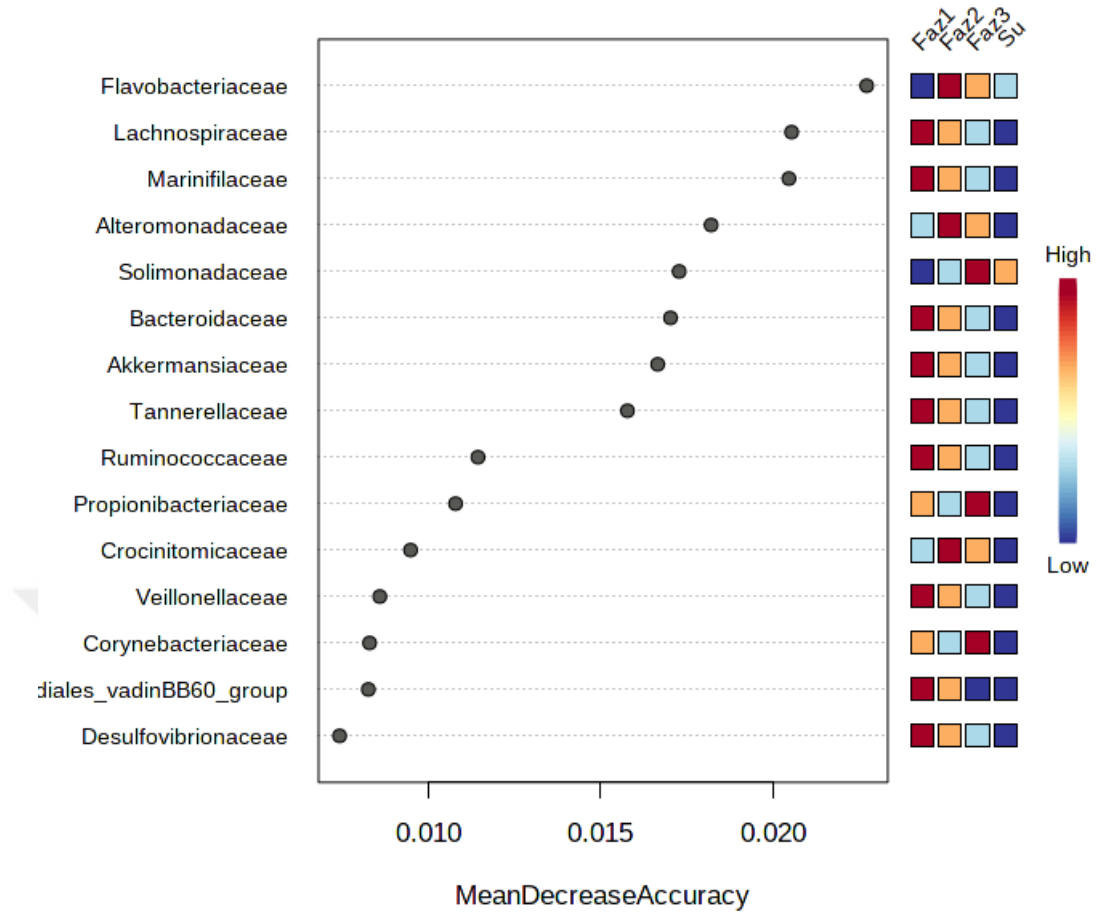


Şekil 4.12: Aile seviyesindeki mikrobiyal bolluğa olarak dayalı fazların rastgele orman sınıflandırmasının performansı.

Rastgele Orman metodu kullanılarak rejenerasyon fazlarına göre tekrar sınıflandırma yapılmıştır Şekil 4.12 de üçüncü faza ve su'ya (aqua) ait örneklerinin daha doğru tahmin edilmesi gösterilmektedir.

Çizelge 4.5: Rejenerasyon fazını tahmin etmedeki hatanın ölçülmesi.

The OOB hatası: 0.143					
	Faz1	Faz2	Faz3	Su	class.error
Faz1	5	1	0.0	0.0	0.167
Faz2	1	4	1.0	0.0	0.333
Faz3	0	0	6.0	0.0	0.0
Su	0	0	0.0	3.0	0.0



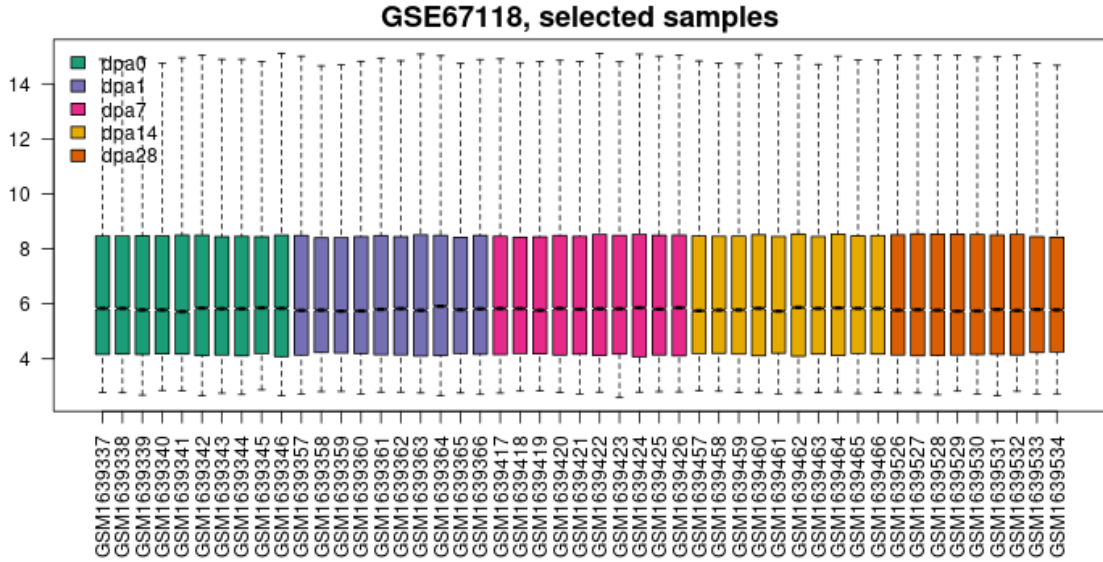
Şekil 4.13: Aile seviyesindeki mikrobiyal bolluğa dayalı olarak fazların rastgele orman sınıflandırmasıyla ilgili belirlenen en önemli 15 öznelik.

4.2. Transkriptom Analiz Sonuçları

4.2.1. Kalite kontrolü

Transkriptom analizi için kullanılacak veri seti (GSE67118) öncelikle kalite açısından kontrol edildi. Bu basamakta örnekler içindeki gen ekspresyon dağılımı incelendi. Aynı zamanda ekspresyon dağılımı örnekler arasında da karşılaştırılmıştır. Bu amaç için kutu grafiği kullanıldı **Şekil 4.14**. Veri seti şu 5 örnek grubunu kapsıyordu: Gün0, GÜN1, Gün7, Gün14 ve Gün28. Bu veri setinde kullanılan mikrobiyom veri setinden farklı olarak su örneği ve Üçüncü rejenerasyon fazı için bir geç zaman dilimi yoktu. Öbür yandan bu veri setinde örnek gruplarındaki örnek sayısı mikrobiyom veri setine göre daha fazlaydı. Bu da istatistiksel olarak daha fazla güvenilirlik sağlıyordu. Kutu grafiğiyle elde edilen sonuç kalitenin yeterince yüksel olduğunu gösterildi. Daha spesifik olarak bu görüntüleme verinin üretilmesinde herhangi bir teknik sorunun yaşanmadığına, verimin (deneysel çıktının) derinlik açısından örnekler arasında aşağı yukarı aynı olduğuna ve örneklerin normalize edilmiş olduğuna işaret etti. Örneklerin gen ekspresyon ortancası

(median) ise yaklaşık olarak 6 olarak bulundu. Bu ortanca değeri bu tür verilerde beklenen bir sonuçtur. Ortancanın gruplar arasında aşağı yukarı aynı olduğu gözlemlendi. Bu ve dağılım şeklinin benzerliği neticesinde örneklerin normalize edildiğine işaret etti. Bu durum ise verilerin genel olarak karşılaştırılmaya oldukça müsait olduğunu gösterdi. Böylece girdi olarak kullanılan bu veri setinde bir sonraki basamakta gruplar arası karşılaştırmalar daha güvenilir ve etkin bir şekilde yapılabilir.

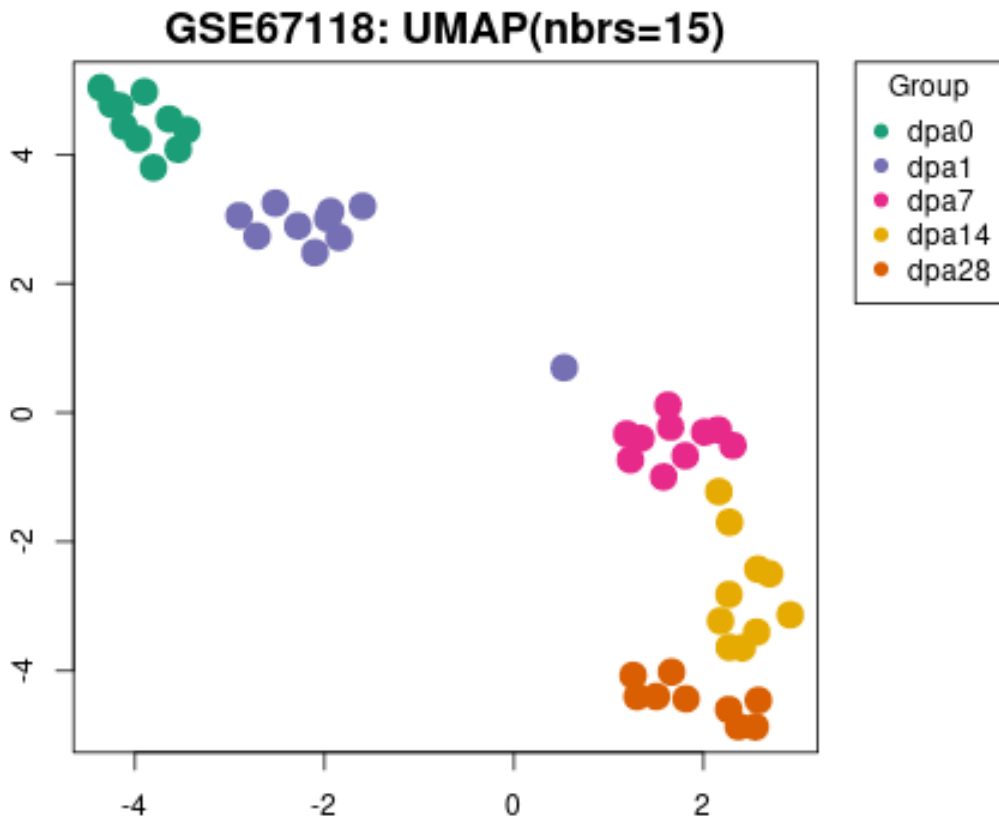


Şekil 4.14: Girdi olarak kullanılan verinin örnekler bazında dağılımını gösteren kutu grafiği.

4.2.2. Global gen ekspresyonu seviyesinde akslotl kol rejenerasyonunun dinamiği

Kalite kontrolü basamağında sonra veri setine genel bir bakış sağlamak ve global gen ekspresyonu değerlendirmek için bir denetimsiz makine öğrenmesi yöntemi olan boyut indirgeme yöntemi uygulanmıştır. Spesifik olarak bu basamakta boyut indirgeme metodu olarak UMAP kullanıldı. Bu şekilde örnekler içerdiklerin tüm genlerin ekspresyonu bakımından değerlendirildi. Bu şekilde gen sayısı kadar olacak eksen sayısı 2 eksene düşürülmüş yani veri de 2 boyuta indirgenmiş oldu. Bu görüntüleme örnekler arasında karşılaştırma yapmak için büyük katkı sağlamıştır **Şekil 4.15**. Sonuç olarak akslotl kol rejenerasyonu sırasında transkriptomun temporal dinamiği görüntülenmiştir. Mikrobiyom durumunda olduğu gibi burada da örneklerin rejenerasyon fazlarına göre gruplaştığı açıkça görüldü. Diğer bir ifadeyle Gün0 ile GÜN1 birbirine benzerlik gösterirken, Gün7 ise Gün14'ye benzer oldu. Üçüncü faza ait Gün28 grubu ise bunlardan farklı konumlanmıştır yani içerik olsa diğer tüm gruplardan farklıydı. Bu bakımdan elde edilen bu sonuç (rejenerasyon fazlarına göre gruplaşma) mikrobiyom sonucuyla tutarlı

bulunmuştur. Daha spesifik olarak mikrobiyom sonucuyla benzer çıkan bir husus ise örnek grupları arasındaki farklılığın kendini görselde konumlandırma olarak bir kısmi süreklilik (continuum) şeklinde göstermesi. Bu pattern mikrobiyomdaki gibi belirgin olmasa da rahatlıkla fark edilebilecek nitelikteydi. Bu açıdan kısmen daha az olan netlik (belirgin) grup sayılarının azlığından daha kaynaklanıyor olabilir. Alternatif olarak gözlemlenen farkların niteliği şu şekilde de yorumlanabilir: Aksolotl kol rejenerasyonu sürecinde mikrobiyomun yeniden yapılandırılması (restructuring) transkriptoma göre daha büyük çapta oluyor. Diğer bir ifadeyle bu biyolojik süreçte mikrobiyotadaki değişim transkriptomdaki değişimden daha fazla olabilir. Özet olarak bu basamak Global gen ekspresyonu seviyesinde aksolotl kol rejenerasyonunun dinamiğine genel bir bakış sağladı. Bir sonraki basamakta ise transkriptomdaki değişim tek tek mRNA'lar seviyesinde yani tek değişkenli analiz (yani gruplar arası karşılaştırmalar) ile araştırıldı.



Şekil 4.15: UMAP analiziyle örneklerin transkriptom seviyesinde karşılaştırılması.

4.2.3. Differansiyel ekspresyon analizi

4.2.3.1. Differansiyel ekspresyon gösteren genlerin tespit edilmesi

Bu çalışmada incelenen transkriptom verisi differansiyel ekspresyon analizi için bir kaynak oluşturmaktadır. Bu kapsamda transkriptom verisinin madenciliğiyle differansiyel ekspresyon gösteren genler tespit edildi. Ekspresyon seviyesi anlamlı olarak değişen gen listesi tek değişkenli analiz kullanılarak ve çoklu grup karşılaştırılması yapılarak tespit edilmiştir. Girdi veri Affymetrix mikrodizin verisi olduğu için bu tür veriler için özel olarak geliştirilen *LIMMA* metodu kullanıldı. Her gen çeşidi bir değişken olarak değerlendirildi ve bu yolla örnek grupları arasında anlamlı olarak farklılık gösteren genler saptandı. Çizelge 4.6 anlamlılık olarak en üstte çıkan 10 geni (top 10 significant genes) göstermektedir. Bu 10 gen tüm genler FDR değerine göre düşükten büyüğe sıralandığında en düşük FDR değerleri gösteren genlerdir. Bu 10 genden daha fazla anlamlı gen bulunmasına rağmen seçim kriteri (eşik değeri) olarak en anlamlı 10 gen olma durumu uygulandı. Söz konusu sonuç tablosu tespit edilen anlamlı genlere ait Affymetrix ID, gen ismi ve istatistikler bilgisini içermekteydi. Neticede bu 10 gen differansiyel ekspresyon gösteren gen (differentially expressed genes; DEGs) olarak kabul edilmiştir. Bu gen listesi iki yönden yorumlandı. Bu genlerin aksotl kol rejenerasyonu sürecinde anlamlı değişim göstermesi bu süreçte fonksiyonel olarak rol aldığına işaret ediyor. Bu açıdan bu genler potansiyel rejenerasyon genleri olarak değerlendirilebilir. Bu genlerle rejenerasyonla ilişkisi ciddi olarak araştırılması gereken bir konudur. Bunun için yoğun deneysel fonksiyonel validasyon ve karakterizasyon çalışmalarına ihtiyaç var. Eğer bu genlerin rejenerasyonda görev aldığı doğrulansa bu görevin ne olduğu tam anlatılmadığıdır. Bu konuda şu ihtimaller düşünülebilir: Bazı genlerin ürünleri (gene products) regülasyon için önemliyken, öbürleri yapısal veya başka açıdan rejenerasyona bulunuyor olabilirler. Anlamlı genler için ikinci ilginç yorum ise bunların kodladığı mRNA'ların rejenerasyon biyobelirteçi olarak değerlendirilmesi. Bu bakımdan tespit edilen gen listesi aksotl kol rejenerasyonu alanında potansiyel biyobelirteç bağlamında önemli bir bulgudur. Bu aday biyobelirteçlerin de daha iyi anlaşılması ve adaylıkların netliğe kavuşturulması için deneysel karakterizasyonu yapılması gerekmez. Her hâlükârda bu çalışma aksotl model organizmasında rejenerasyon genlerin ve biyobelirteçlerin keşfi bağlamında araştırma boşluğu doldurmaya yönelik önemli bir adımdır.

Çizelge 4.6: Seviyesi en anlamlı olarak değişen 10 genin bilgileri ve istatistikleri.

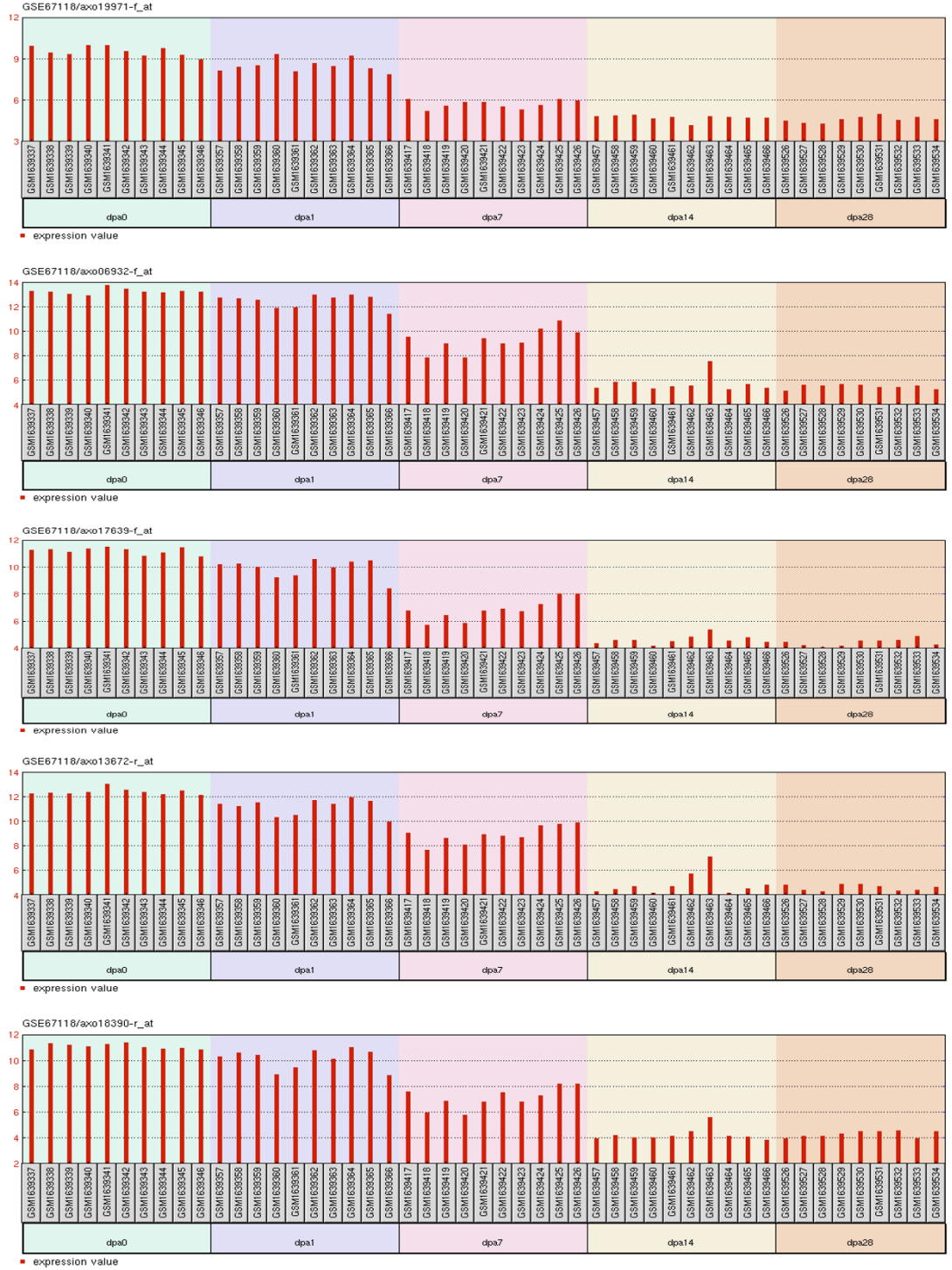
Affymetrix ID	Gene Sembolü	p değeri	Adjusted p değeri
axo19971-f_at	TNXB	4.29e-37	8.62e-33
axo06932-f_at	SLC25A4	2.90e-35	2.91e-31
axo17639-f_at		1.58e-34	1.06e-30
axo13672-r_at	SMPX	1.59e-33	8.01e-30
axo18390-r_at	MLF1	3.95e-33	1.59e-29
axo05262-r_at	DHRS7C	1.07e-32	3.56e-29
axo07667-f_at	COX7A1	1.35e-32	3.87e-29
axo04639-f_at	LDB3	1.67e-32	4.19e-29
axo25173-f_at		2.16e-32	4.81e-29
axo04719-r_at	PFKM	4.63e-32	8.65e-29

Çizelge 4.7: Seviyesi en anlamlı olarak değişen 10 genin tam ismi.

Gene Sembolü	Gene İsmi
TNXB	tenascin XB isoform 2 [Homo sapiens]
SLC25A4	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 4 [Homo sapiens]
	hedgehog acyltransferase-like [Homo sapiens]
SMPX	small muscle protein, X-linked [Homo sapiens]
MLF1	myeloid leukemia factor 1 isoform 1 [Homo sapiens]
DHRS7C	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7C [Homo sapiens]
COX7A1	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 1 (muscle) precursor [Homo sapiens]
LDB3	LIM domain binding 3 isoform 4 [Homo sapiens]
	No Hit
PFKM	phosphofructokinase, muscle [Homo sapiens]

Tespit edilen 10 differansiyel ekspresyon gösteren genden en anlamlı 5 gen öncelikli hale getirilerek daha ayrıntılı araştırıldı. Bu adımda bu 5 genin differansiyel ekspresyon profilini daha iyi anlayabilmek için ilgili ekspresyon seviyelerinin örnekler arasında nasıl farklılık gösterildi araştırıldı. Analiz sonuçları her gen ayrı ayrı çubuk grafiği ile görüntülendi **Şekil 4.16**. Söz konusu beş genin de differansiyel ekspresyon patterni benzerlik gösteriliyordu. Rejenerasyonun ilk fazında (yara iyileşmesi fazında) yüksek miktarda olan bu genlerin ekspresyonu sonraki rejenerasyon fazlarında gittikçe düşüyordu. Bu sonuç göz önünde bulundurulduğunda bu genlerin özellikle yara iyileşme fazında rol alabildikleri ve bu faz için biyobelirteç olma potansiyeline sahip oldukları akla

gelmektedir. Özetle bu analiz sayesinde bu 5 anlamlı genin differansiyel regülasyonu daha iyi anlaşıldı ve bu genler daha çok yara iyileşmesiyle ilgili olabilecekleri düşünüldü.



Şekil 4.16: En anlamlı olarak bulunan genlerin differansiyel ekspresyon profili.

İlginç bir bulgu olarak ise aşağıdaki gözlem karşımıza çıkmaktadır: Aksotl transkriptom verisinin madenciliğiyle bu çalışmada en anlamlı olarak saptanan *TNXB* (tenascin XB isoform 2 [Homo sapiens]) genin (Affymetrix ID: axo19971-f_at) farede ve

insanda doku tamiriyle ilişkili olduğu biliniyor [90]. Bu tez çalışmasında ile aksolotldaki bu gen ilk defa rejenerasyonla ilişkisi. Bu şekilde aynı genin hem aksolotldaki rejenerasyonda hem de insandaki yara iyileşmesiyle yakından alakalı bulunması bu çalışmada vurgulanması gereken önemli bir sonuçtur. Aksolotl *TNXB* geni hakkında yapılan literatüre araştırmasında ve genetik veri tabanlarda kayda değer bir bilgi bulunamadı. Bunun sebebi aksolotlun daha az çalışılan bir canlı olması olabilir (Birçok aksolotl gen hakkında biyolojik rol açısından neredeyse hiç bilgi yok). Bu çalışmada bulunan anlamlı genler (yani aday biyobelirteçler) arasında bu aday biyobelirteç olarak özellikle şu 2 özellik bakımından önceliklidir: *TNXB* diğer 9 gene göre daha anlamlı bulunmuştur (yani bu sonuç istatistiksel olarak daha güvenilirdir) ve bu genin sadece sekans olarak değil, görev olarak da korunmuş olabileceğine dair işaretler var. Bu özellikler bu geni gelecek araştırmalar için daha öncelikli hale getirmektedir. Gelecekte *TNXB* ilgili yapılacak ayrıntılı deneysel ve biyoinformatik çalışmaların translasyonel tıp açısından da faydalı olabilir. Uzun vadede bu çalışmalar insandaki yara iyileşmesi alanında ilerlemelere ve önemli buluşlara yol açabildiği düşünülmektedir.

Çizelge 4.8: Anlamlı bulunan genlerle ilgili genel bilgiler.

Gene Sembolü	Genel Bilgi
TNXB	TN-X, deri, bağlar, tendonlar, akciğerler, böbrekler, optik sinirler, meme ve adrenal bezler gibi yetişkin dokularında yapısal olarak eksprese edilir. Çok çeşitli organlarda, TN-X esas olarak bağ dokusu içinde bulunur. peritendinum (tendonların dış yapısal bileşeni), epimisyum ve perimisyum (kas bileşenleri), renal glomerül, kan damarları ve deri dermisi gibi [91]. TN-X'in özellikle deri içinde önemli bir yapısal ve mimari işlevi olduğu öne sürülmüştür.
SLC25A4	ADP/ATP translokaz 1 veya adenin nükleotid translokator 1 (ANT1), insanlarda SLC25A4 geni tarafından kodlanan bir enzimdir [92]. Bu genin ürünü, ADP'yi sitoplazmadan mitokondriyal matrise ve ATP'yi mitokondriyal matristen sitoplazmaya aktaran kapılı bir gözenek olarak işlev görür. Protein, iç mitokondri zarına gömülü bir homodimer oluşturur. Kalpte (RPKM 227.6), beyinde (RPKM 24.6) işlev görmektedir.
SMPX	Bu gen, bilinen fonksiyonel alanları olmayan küçük bir proteini kodlar. Bu gendeki mutasyonlar, X-linked deafness-4 (sağırılık) bir nedenidir ve kodlanmış protein, mekanik strese maruz kalan iç kulak hücrelerinin korunmasında rol oynayabilir [93].
MLF1	Miyeloid lösemi faktörü 1, insanlarda MLF1 geni tarafından kodlanan bir proteindir [94]. Bu gen ve nükleofosmin arasındaki translokasyonlar, miyelodisplastik sendrom ve akut miyeloid lösemi ile ilişkilendirilmiştir. En çok testis, yumurtalık, iskelet kası, kalp, böbrek

	ve kolonda bulunur. Dalak, timus ve periferik kan lökositlerinde düşük ekspresyon göstermektedir [95].
DHRS7C	Sarkoplazmik retikulum tarafından sitozole sekestre kalsiyum iyonunun salınımının düzenlenmesinde yer aldığı tahmin edilmektedir. Hücre dışı bölgede ve uzunlamasına sarkoplazmik retikulumda yer aldığı tahmin ediliyor. Kalp ve iskelet kası metabolik fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynar [96].
COX7A1	Sitokrom c oksidaz polipeptidi 7A1, mitokondriyal insanlarda COX7A1 geni tarafından kodlanan bir enzimdir. Mitokondriyal olarak kodlanmış alt birimler elektron transferinde işlev görür ve nükleer olarak kodlanmış alt birimler kompleksin düzenlenmesi ve birleştirilmesinde işlev görebilir. Bu nükleer gen, VIIa alt biriminin polipeptid 1'ini (kas izoformu) kodlar ve polipeptid 1 sadece kas dokularında bulunur. Alt birim VIIa'nın diğer polipeptitleri hem kas hem de kas dışı dokularda bulunur ve farklı genler tarafından kodlanır [97].
LDB3	LDB3 proteini kalp (kalp) kasında ve hareket için kullanılan kaslarda (iskelet kası) bulunur. Kas lifleri içinde, LDB3 proteinleri, kasların gerilmesi (kasılması) için gerekli olan sarkomer adı verilen yapılarda bulunur. Bu protein, diğer proteinlere bağlanır (bağlanır) ve sarkomerler içinde Z-diskleri adı verilen çubuk benzeri yapıların stabilitesinin korunmasında rol oynar [98].
PFKM	6-fosfofruktokinaz, kas tipi insanlarda kromozom 12 üzerinde PFKM geni tarafından kodlanan bir enzimdir. Bu enzim, vücutta depolanan enerjinin ana kaynağı olan glikojen adı verilen karmaşık bir şekerin parçalanmasında rol oynar. Bu gen, dokuya özgü bir şekilde tetramerik PFK'yi oluşturmak üzere eksprese edilen ve birleştirilen PFK'nin üç protein alt biriminden birini kodlar [99].

Çizelge 4.9: Anlamli bulunan genlerin insandaki yara iyileşmesi ve rejenerasyonla ilişkisi.

Gene Sembolü	Gene İsmi	Anlamli olarak değişen 10 genin literatürde yara iyileşmesi veya rejenerasyonla ilişkisi
TNXB	tenascin XB isoform 2 [Homo sapiens]	TN-X esas olarak bağ dokusu içinde bulunur. Peritendinum (tendonların dış yapısal bileşeni), epimisyum ve perimisyum (kas bileşenleri), renal glomerül, kan damarları ve deri dermisi gibi [91]. Bu proteinin yara iyileşmesi sırasında matris olgunlaşmasında işlev gördüğü düşünölmektedir.
SLC25A4	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 4 [Homo sapiens]	Herhangi bir ilişkiye literatürde rastlanmadı
SMPX	small muscle protein, X-linked [Homo sapiens]	Herhangi bir ilişkiye literatürde rastlanmadı
MLF1	myeloid leukemia factor 1 isoform 1 [Homo sapiens]	Herhangi bir ilişkiye literatürde rastlanmadı

DHRS7C	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7C [Homo sapiens]	Herhangi bir ilişkiye literatürde rastlanmadı
COX7A1	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 1 (muscle) precursor [Homo sapiens]	Herhangi bir ilişkiye literatürde rastlanmadı
LDB3	LIM domain binding 3 isoform 4 [Homo sapiens]	Herhangi bir ilişkiye literatürde rastlanmadı
PFKM	phosphofructokinase, muscle [Homo sapiens]	Herhangi bir ilişkiye literatürde rastlanmadı



BÖLÜM 5

5. SONUÇ VE GELECEKTEKİ ÇALIŞMALAR

5.1. Sonuç

Yüksek rejeneratif kapasiteye sahip olan model organizma aksolotl hayvanlardaki doku hasarlı yaralanmalar ve doku hasarlı hastalıklar alanında kritik ipuçları sunmaktadır. Rejenerasyon çalışmalarında kullanılan bu model organizmanın altında yatan mekanizmayı anlamak ve hangi bakteri türlerinin rejenerasyon sürecinde etkili olduğunu hala çok önemli bir konudur. Son zamanlarda yapılan yoğun mikrobiyota araştırmalarına rağmen bakterilerin yara iyileşmesine etkisi, konak ile mikrobiyata arasındaki ilişki merak uyandırmaktadır. Aksolotl birçok organlarını zarar görse veya kopsa dahi çok kısa bir sürede rejenerate edip tamir edebilmektedir. Bu canlıdaki ilginç özellikler arasında şu belirgin özellik dikkat çekmektedir: hasar almış beynini, kesilmiş omuriliğini ve kalbini tamir edebilme yeteneği. Bu model organizma odaklı çalışma yapılarak uzun vadede sinir sistemi, kalp damar sistemi, üreme sistemi hastalıkları gibi hastalıklara tedavi bulmak amaçlanıyor. İnsan üzerindeki çalışmalara ek olarak, rejenerasyon alanında gittikçe önem kazanan bir model organizma olan aksolotl yara iyileşmesi ve doku hasarlı hastalıklar konusunda tamamlayıcı bilgiler ve kritik ipuçları sunmaktadır. Aksolotl kol rejenerasyonunun alanında artan çalışmalara rağmen bu sürecin altında yatan kompleks mekanizma hala tam olarak anlaşılammamaktadır. Bu araştırma alanındaki gelişmeler omurgalı hayvanlarda rejenerasyon ve yara iyileşmesinin temelinde yatan hücresel ve moleküler mekanizma hakkında önemli bilgi sağlayacaktır. Bugüne kadar aksolotl kol rejenerasyonu alanında mikrobiyal ve mRNA biyobelirteçler açısından büyük bilgi eksikliği bulunmaktadır. Bu tez çalışmasının odak noktası olarak rejenerasyon ve yara iyileşmesi alanındaki söz konusu araştırma boşluğu doldurmaya yönelik bir adım olarak aksolotl araştırmaları sonucu benzer deneysel tasarımla elde edilmiş ve yayınlanmış mikrobiyota ve transkriptom verilerinin veri madencilik teknikleriyle analizi ve yeni aday biyobelirteçlerin keşfi olarak belirlendi.

Bu tez çalışmasında aksolotl uzuv ampütasyonu sonrası meydana gelen uzuv rejenerasyon süreci mikrobiyom ve transkriptom verinin madenciliği vasıtasıyla araştırılmıştır. Bunun için girdi olarak daha önce yayınlanmış mikrobiyom bolluk tablosu ve transkriptom tablosu kullanılmıştır. Bu iki veri üzerinde boyut indirme tekniğiyle denetimsiz makine öğrenimi uygulanarak örneklerin gruplandırılması araştırılmıştır. Bu analiz her iki veri çeşit bakımından da örneklerin rejenerasyon fazına göre gruplandığı gözlemlenmiştir. Böylece ileri istatistiksel metotlar kullanılarak aksolotl uzuv rejenerasyonu sürecindeki değişimler incelenmiştir. Bu analizlerin neticesinde istatistiksel olarak anlamlı olarak sayıları değişen bakteriler ve mRNA'lar tespit edildi. Bu anlamlı listeler yeni aday biyobelirteç listeleri olarak değerlendirilebilir. Mikrobiyom verisine Rastgele Orman teknikliğiyle denetimli makine öğrenmesi uygulanarak önemli tahmin edici özelliğe sahip öznitelikler saptandı. Bu bakteriler ve mRNA'lar potansiyel rejenerasyon biyobelirteçleri olarak değerlendirilebilir. Bu aday biyobelirteçlerin validasyonu ve karakterizasyonu için ek deneysel ve biyoinformatik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Isı haritasında çeşitlilik gösteren mikrobiyal bolluk sonuçlarına göre, ikinci faza karşılık gelen örnek gruplarındaki (yani dördüncü ve yedinci günde) genus bolluğu diğer tüm örnek gruplarından oldukça farklılık gösterdiği görülmüştür. Bu fazda, mikrobiyal bollukta ve çeşitlilikte; *Flavobacterium* en baskın (dominant) cins haline geldiği görülmüştür. Bir sonraki fazda ise bu baskınlık ortadan kalkmıştır ve yerini başka cinslere bırakmıştır. Bu bağlamda mikrobiyal bolluk açısından blastema oluşumu bir şekilde özellikle *Flavobacterium* ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Isı haritasındaki bir başka ilginç sonuç ise sadece Gün60 (dpa60) örneklerinde *Chryseobacterium* bolluğunun artmasıdır. Diğer bir ifadeyle, aksolotl kol rejenerasyonunda zaman olarak en sonunda bu cinsin arttığı gözlemlenmiştir.

5.1.1. Sonuçların genel değerlendirilmesi

- Bu tez çalışmasında aksolotl uzuv ampütasyonu sonrası meydana gelen uzuv rejenerasyon süreci mikrobiyom ve transkriptom verinin madenciliği vasıtasıyla araştırılmıştır.
- Yapılan analizlerde girdi olarak daha önce yayınlanmış mikrobiyom bolluk tablosu ve transkriptom tablosu kullanılmıştır.

- Bu iki veri üzerinde boyut indirme tekniğiyle denetimsiz makine öğrenimi uygulanarak örneklerin gruplandırılması araştırılmıştır.
- Bu analiz her iki veri çeşit bakımından da örneklerin rejenerasyon fazına göre gruplandığı gözlemlenmiştir. Böylece ileri istatistiksel metotlar kullanılarak aksotl uzuv rejenerasyonu sürecindeki değişimler incelenmiş. Bu analizlerin neticesinde istatistiksel olarak anlamlı olarak sayıları değişen bakteriler ve mRNA'lar tespit edilmiştir.
- Bu analiz her iki veri çeşit bakımından da örneklerin rejenerasyon fazına göre gruplandığı gözlemlenmiştir. Böylece ileri istatistiksel metotlar kullanılarak aksotl uzuv rejenerasyonu sürecindeki değişimler incelenmiş. Bu analizlerin neticesinde istatistiksel olarak anlamlı olarak sayıları değişen bakteriler ve mRNA'lar tespit edilmiştir.
- Bu aday biyobelirteçlerin validasyonu ve karakterizasyonu için ek deneysel ve biyoinformatik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.
- Bu tez çalışmasında aksotldaki bu genin (*TNXB*) ilk defa rejenerasyonla ilişkisi. Bu şekilde aynı genin hem aksotldaki rejenerasyonda, hem de insandaki yara iyileşmesiyle yakından alakalı bulunması bu çalışmada ki önemli bir sonuçtur.

5.2. Gelecekteki Çalışmalar

Bu tez çalışmasında aksotl mikrobiyota ve transkriptom verisi yeni aday biyobelirteçler keşfetmek için kullanıldı. Bu iki çeşit veri bu amaçla güncel biyoistatistiksel metotlar ve araçlarla analiz edildi. Önümüzdeki zamanda mikrobiyota verisiyle genomik ve proteomik veriler gibi çoklu omik veri türlerinin beraber kullanımı hızlanıp odak konusu olacaktır. Bu amaç için ise ileri istatistiksel metotlara, entegre araçlara ve uygun bilişim altyapısına ihtiyaç duyulacaktır. Bu doğrultuda yaklaşımların mikrobiyota çalışmalarına yeni ışık tutacağı ve uzun vadede yenilikçi tedavilerin yolunu açacağı öngörülmektedir. Bu tez çalışmasındaki yaklaşım ve elde edilen sonuçlar aksotl uzuv rejenerasyonu alanındaki gelecekte yapılması beklenen multiomik çalışmalar için önem taşımaktadır. Bu yöndeki çalışmaları daha etkin bir şekilde tasarlama ve uygulamak için bu tez çalışmasındaki metotlardan ve bulgulardan yararlanılabilir.

Hayvanlarda Rejenerasyondaki mikrobiyal değişimi sağlayan rejenerasyon mu yoksa bakterilerin kendileri mi? Yani bakterilerin sayısal değişmesi mi rejenerasyonu sağlıyor yoksa tam tersi mi? Bu sorularına ne kadar merak edilse de bugüne kadar tam anlamıyla

cevaplanamamıştır. Aslında her iki durumunda birbirinden etkilendiği varsayılmaktadır. Bu konu genel olarak rejenerasyon-mikrobiyota ilişkisinde güncel olduğu gibi yara iyileşmesinde güncelliğini korumaktadır. Aksolotl uzuv rejenerasyonunda da bu husus hala açıklığa gereken bir husustur. Bu bağlamda, her üç rejenerasyon fazını da kapsayacak şekilde daha ayrıntılı deneysel çalışmalara ve biyoinformatik çalışmalara ihtiyaç vardır. Diğer bir ifadeyle, varsayılan konakçı-mikrobiyota etkileşimlerinin (host-microbiota interactions) gelecekte ayrıntılı olarak araştırılması ve aydınlatılması aksolotl çalışmaları için önem arz etmektedir.

Bakterilerle ilgili taksonomik veri tabanlardaki bilgi boşluklarında dolayı yeni nesil sekanslama sonucunda ortaya çıkarılan mikrobiyal topluluklar hakkında veriyi şu an sadece sınırlı bir şekilde anlamlandırabilmekteyiz. Mikrobiyom analiziyle saptanan birçok sekans ve dolayısıyla mikrop çeşidi (ASV veya OTU) hiçbir zaman tanımlanmamış veya deneysel olarak kültürlenmemiş ve karakterize edilmemiştir. Diğer ifadeyle, biyoinformatik analiz sırasında sınıflandırılmayan (herhangi bir taksonomik gruba aidiyeti olmayan) birtakım taksonlar karşımıza çıkmaktadır. İnsan çalışmalarında bu tür sınıflandırılmayan ASV'ler (unassigned ASVs) azken, model organizmalarda daha fazladır. Üstelik bir organizma ne kadar az çalışılmışsa, bu tür sınıflandırılmayan ASV'ler o kadar çok saptanmaktadır. Bu durum mikrobiyoloji açısından az çalışılan bir canlı olan aksolotldan da karşımıza çıkmaktadır. Bu bağlamda taksonomik sınıflandırma mikrobiyom veri analizinde çok önemli bir aşamadır. Burada taksonomik veri tabanı seçimi kritik bir karardır. Bu çalışmada kullanılan mikrobiyota bolluk verisi en kapsamlı veritabanı olarak bilinen SILVA veri tabanına dayalı sınıflandırma sonucu elde edilmiştir. Buna rağmen mikrobiyom profileme sonucu tespit edilen bazı ASV'ler için taksonomik sınıflandırma ya komple yapılamadı ya da kısmen yapılabildi (taksonomik seviyelerin bazılarında bilgi eksik kaldı yani mesela genus ismi bilinirken tür ismi bilinmiyor). Böylece saptanan ASV'lerin bazıları için hiçbir şey bilinmezken, bazıları hakkında da çok az şey biliniyor. Bu durum mikrobiyoloji açısından hep bazı zorluklar çıkartmakta, hem de aynı zamanda bazı fırsatlar sunmaktadır. ASV'lerin bazıları taksonomik olarak bilinemediği için sonuçların yorumlanması sınırlı kalmaktadır. Öbür yandan bu sınıflandırılmayan ASV'ler arasında daha rejenerasyon açısından çok ilginç, önemli mikrop çeşitleri olabilir. Bu durum ise gelecekteki fonksiyonel rejenerasyon çalışmaları için geniş bir araştırma sahası sunmaktadır. Böylelikle aksolotl çalışmaları sonucu yeni mikrop çeşitleri keşfedilebilir ve bunların bazıları potansiyel olarak uzuv rejenerasyonunda önemli olabilir. Uzun vadede translasyonel açıdan böyle bakterilerin keşfi, validasyonu

ve fonksiyonu önemli bir hedef olarak düşünülmesi ve çalışılması gerekmektedir. Özetle, aksolotl model organizma üzerinde yapılan çalışmalar hem bilinen bakteri grupları hakkında yeni bilgiler sağlamakta, hem de yepyeni bakteri gruplarının keşfedilmesine imkân tanımaktadır. Her iki yönde de daha çok çabaya ihtiyaç duyulmaktadır.



KAYNAKÇA

- [1] K. H. Altın, “Aksolotl kol rejenerasyonunda fungus ve bakteri profillerinin boylamsal değişimlerinin incelenmesi,” Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul Medipol Üniversitesi, İstanbul, Türkiye, 2019.
- [2] T. Demircan, A. E. İlhan, G. Ovezmyradov, G. Öztürk, ve S. Yıldırım, “Longitudinal 16S rRNA data derived from limb regenerative tissue samples of axolotl *Ambystoma mexicanum*,” *Sci. Data*, s. 1–7, 2019, doi:10.1038/s41597-019-0077-7.
- [3] K. KÖKLÜ ve D. A. U. ÇANKAL, “Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler İçerisinde Beslenmenin Yeri,” *Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Derg.*, 2013.
- [4] S. Verbanic, Y. Shen, J. Lee, J. M. Deacon, ve I. A. Chen, “Microbial predictors of healing veshort-term effect of debridement on the microbiome of chronic wounds,” *npj Biofilms Microbiomes*, s. 1–11, 2020, doi:10.1038/s41522-020-0130-5.
- [5] R. A. F. Clark, K. Ghosh, ve M. G. Tonnesen, “Tissue engineering for cutaneous wounds,” *J. Invest. Dermatol.*, s. 1018–1029, 2007, doi:10.1038/sj.jid.5700715.
- [6] F. M. Leclère ve V. Casoli, “Use of bioartificial dermal regeneration template for skin restoration in combat casualty injuries,” *Regen. Med.*, s. 359–360, 2016, doi:10.2217/rme-2016-0044.
- [7] M. Rodrigues, N. Kosaric, C. A. Bonham, ve G. C. Gurtner, “Wound healing: A cellular perspective,” *Physiol. Rev.*, s. 665–706, 2019, doi:10.1152/physrev.00067.2017.
- [8] V. Falanga, “Wound healing ve its impairment in the diabetic foot,” *Lancet*, s. 1736–1743, 2005, doi:10.1016/S0140-6736(05)67700-8.
- [9] I. V. Yannas, D. Tzeranis, ve P. T. So, “Surface biology of collagen scaffold explains blocking of wound contraction and regeneration of skin and peripheral nerves,” doi:10.1088/1748-6041/11/1/014106.
- [10] N. Bhardwaj, D. Chouhan, ve B. B. Mandal, “Tissue Engineered Skin and Wound Healing: Current Strategies and Future Directions,” *Curr. Pharm. Des.*, s. 1–28, 2017, doi:10.2174/1381612823666170526094606.
- [11] L. Yildirimer, N. T. K. Thanh, ve A. M. Seifalian, “Skin regeneration scaffolds: A multimodal bottom-up approach,” *Trends Biotechnol.*, s. 638–648, 2012, doi:10.1016/j.tibtech.2012.08.004.
- [12] S. Med, S. Tez, E. C. E. C. Fes, L. U. Tibb, D. Dani, ve T. Dem, “Aksolotta omurilik hasari sonrası rejenerasyonu sağlayan moleküler mekanizmaların proteomiks yöntemleri ile tanımlanması,” 2018.
- [13] C. E. Dinsmore, “Urodele limb and tail regeneration in early biological thought: An essay on scientific controversy and social change,” *Int. J. Dev. Biol.*, s. 621–627, 1996, doi:10.1387/ijdb.8877433.
- [14] J. E. Carlson, “Preface,” *Lat. Am. Energy Polit.*, no. 1969, 2010, doi:10.2307/j.ctvp7d4z2.3.

- [15] C. McCusker ve D. M. Gardiner, “The axolotl model for regeneration and aging research: A mini-review,” *Gerontology*, s. 565–571, 2011, doi:10.1159/000323761.
- [16] C. Franco ve diğ. , “Understanding regeneration through proteomics,” *Proteomics*, s. 686–709, 2013, doi:10.1002/pmic.201200397.
- [17] C. Li, H. Zhao, Z. Liu, ve C. McMahon, “Deer antler - A novel model for studying organ regeneration in mammals,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, s. 111–122, 2014, doi:10.1016/j.biocel.2014.07.007.
- [18] B. M. Carlson, “Origins of Cells in Regenerating Systems,” *Princ. Regen. Biol.*, no. 1855, pp. 31–47, 2007, doi:10.1016/b978-012369439-3/50004-0.
- [19] A. Giangrande ve M. Licciano, “Regeneration and clonality in Metazoa. The price to pay for evolving complexity,” *Invertebr. Reprod. Dev.*, s. 1–8, 2014, doi:10.1080/07924259.2013.793622.
- [20] A. M. Misic, S. E. Gardner, ve E. A. Grice, “The Wound Microbiome: Modern Approaches to Examining the Role of Microorganisms in Impaired Chronic Wound Healing,” *Adv. Wound Care*, s. 502–510, 2014, doi:10.1089/wound.2012.0397.
- [21] S. Guo ve L. A. DiPietro, “Critical review in oral biology & medicine: Factors affecting wound healing,” *J. Dent. Res.*, s. 219–229, Mart 2010, doi:10.1177/0022034509359125.
- [22] B. S. Scales ve G. B. Huffnagle, “The microbiome in wound repair and tissue fibrosis,” *J. Pathol.*, s. 323–331, Ocak 2013, doi:10.1002/PATH.4118.
- [23] D. Neish, “Cluster Analysis Of Microbiome Data Via Mixtures Of Dirichlet-Multinomial Regression Models by,” 2015.
- [24] E. Z. Gomaa, “Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review,” *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, s. 2019–2040, 2020, doi:10.1007/s10482-020-01474-7.
- [25] J. Karczewski ve diğ., “Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier,” *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.*, Haz. 2010, doi:10.1152/AJPGI.00327.2009.
- [26] T. Demircan ve diğ., “Experimentally induced metamorphosis in highly regenerative axolotl (*Ambystoma mexicanum*) under constant diet restructures microbiota,” *Sci. Rep.*, s. 1–12, 2018, doi:10.1038/s41598-018-29373-y.
- [27] J. A. Dinsmore ve J. T. England, “A Study of multicultural counseling training at cacrep-accredited counselor education programs,” *Couns. Educ. Superv.*, s. 58–76, 1996, doi:10.1002/j.1556-6978.1996.tb00236.x.
- [28] M. Tanaka, T. Terui, S. Sasai, ve H. Tagami, “Basal cell carcinoma showing connections with epidermal cysts,” *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.*, s. 581–582, 2003, doi:10.1046/j.1468-3083.2003.00807.x.
- [29] Garrett Dunlap, “Regeneration: What the axolotl can teach us about regrowing human limbs - Science in the News,” 2018.

<https://sitn.hms.harvard.edu/flash/2018/regeneration-axolotl-can-teach-us-regrowing-human-limbs/> (Erişim Ağustos 18, 2022).

- [30] M. Torres, “Regeneration: Limb regrowth takes two,” *Nature*, s. 328–330, 2016, doi:10.1038/nature17889.
- [31] J. R. Monaghan *ve diğ.*, “Experimentally induced metamorphosis in axolotls reduces regenerative rate and fidelity,” *Regeneration*, s. 2–14, 2014, doi:10.1002/reg2.8.
- [32] P. A. Tsonis, “Regeneration in vertebrates,” *Dev. Biol.*, s. 273–284, Mayıs 2000, doi:10.1006/DBIO.2000.9667.
- [33] R. B. Page, S. R. Voss, A. K. Samuels, J. J. Smith, S. Putta, ve C. K. Beachy, “Effect of thyroid hormone concentration on the transcriptional response underlying induced metamorphosis in the Mexican axolotl (*Ambystoma*),” *BMC Genomics*, s. 1–17, 2008, doi:10.1186/1471-2164-9-78.
- [34] R. B. Page ve S. R. Voss, “Induction of metamorphosis in axolotls (*Ambystoma mexicanum*),” *Cold Spring Harb. Protoc.*, s. 9–11, 2009, doi:10.1101/pdb.prot5268.
- [35] N. L. Henry ve D. F. Hayes, “Cancer biomarkers,” *Mol. Oncol.*, s. 140–146, 2012, doi:10.1016/J.MOLONC.2012.01.010.
- [36] N. Goossens, S. Nakagawa, X. Sun, ve Y. Hoshida, “Cancer biomarker discovery and validation,” *Transl. Cancer Res.*, 2015, doi:10.21037/4536.
- [37] “KY Bülteni - Kalp Yetersizliğinde Biyobelirteçler (Doç.Dr.Mehmet Birhan YILMAZ).” <https://tkd.org.tr/KYBulteni/?makale=121> (Erişim Temmuz 01, 2022).
- [38] K. Strimbu ve J. A. Tavel, “What are Biomarkers?,” *Curr. Opin. HIV AIDS*, s. 463, Nov. 2010, doi:10.1097/COH.0B013E32833ED177.
- [39] T. R. Fleming, “Surrogate endpoints in clinical trials,” *Ther. Innov. Regul. Sci.*, s. 545–551, 1996, doi:10.1177/009286159603000230.
- [40] M. Dubinsky ve J. Braun, “Diagnostic and Prognostic Microbial Biomarkers in Inflammatory Bowel Diseases,” *Gastroenterology*, s. 1265-1274.e3, 2015, doi:10.1053/j.gastro.2015.08.006.
- [41] R. Villéger *ve diğ.*, “Microbial markers in colorectal cancer detection and/or prognosis,” *World J. Gastroenterol.*, s. 2327–2347, 2018, doi:10.3748/wjg.v24.i22.2327.
- [42] X. Kong *ve diğ.*, “New and Preliminary Evidence on Altered Oral and Disorder (ASD): Implications for ASD Diagnosis and Subtyping Based on Microbial Biomarkers,” *Nutrients*, s. 1–26, 2019.
- [43] R. A. Sunde, “mRNA transcripts as molecular biomarkers in medicine and nutrition,” *J. Nutr. Biochem.*, s. 665–670, Ağustos 2010, doi:10.1016/J.JNUTBIO.2009.11.012.
- [44] Y. C. T. Yang *ve diğ.*, “CLIPdb: a CLIP-seq database for protein-RNA interactions,” *BMC Genomics*, doi:10.1186/S12864-015-1273-2.

- [45] Y. Xiao, M. Bi, H. Guo, ve M. Li, “Multi-omics approaches for biomarker discovery in early ovarian cancer diagnosis,” *eBioMedicine*, doi:10.1016/J.EBIOM.2022.104001.
- [46] M. Krassowski, V. Das, S. K. Sahu, ve B. B. Misra, “State of the Field in Multi-Omics Research: From Computational Needs to Data Mining and Sharing,” *Front. Genet.*, s. 1598, Aralık 2020, doi:10.3389/FGENE.2020.610798/BIBTEX.
- [47] L. Chin, J. N. Andersen, ve P. A. Futreal, “Cancer genomics: From discovery science to personalized medicine,” *Nat. Med.*, s. 297–303, 2011, doi:10.1038/nm.2323.
- [48] L. Mjøset, “A Case Study of a Case Study,” *Int. Sociol.*, s. 735–766, 2006, doi:10.1177/0268580906067838.
- [49] M. Kim ve I. Tagkopoulos, “Data integration and predictive modeling methods for multi-omics datasets,” *Mol. Omi.*, s. 8–25, 2018, doi:10.1039/c7mo00051k.
- [50] R. Snyderman, “Personalized health care: From theory to practice,” *Biotechnol. J.*, s. 973–979, 2012, doi:10.1002/biot.201100297.
- [51] S. Huang, K. Chaudhary, ve L. X. Garmire, “More is better: Recent progress in multi-omics data integration methods,” *Front. Genet.*, doi:10.3389/FGENE.2017.00084.
- [52] P. S. Reel, S. Reel, E. Pearson, E. Trucco, ve E. Jefferson, “Using machine learning approaches for multi-omics data analysis: A review,” *Biotechnol. Adv.*, s. 107739, 2021, doi:10.1016/j.biotechadv.2021.107739.
- [53] B. B. Misra, C. Langefeld, M. Olivier, ve L. A. Cox, “Integrated omics: Tools, advances and future approaches,” *J. Mol. Endocrinol.*, s. R21–R45, Ocak 2019, doi:10.1530/JME-18-0055.
- [54] S. K. Shahi, K. Zarei, N. V. Guseva, ve A. K. Mangalam, “Microbiota analysis using two-step pcr and next-generation 16s rna gene sequencing,” *J. Vis. Exp.*, s. 1–12, 2019, doi:10.3791/59980.
- [55] B. J. Callahan *ve diğ.*, “High-throughput amplicon sequencing of the full-length 16S rRNA gene with single-nucleotide resolution,” *Nucleic Acids Res.*, s. e103–e103, Ekim 2019, doi:10.1093/NAR/GKZ569.
- [56] A. Amir *ve diğ.*, “Deblur Rapidly Resolves Single-Nucleotide Community Sequence Patterns,” *mSystems*, doi:10.1128/MSYSTEMS.00191-16.
- [57] R. C. Edgar, “UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing”, doi:10.1101/081257.
- [58] Y. Ma, Y. Luo, ve H. Jiang, “A novel normalization and differential abundance test framework for microbiome data,” *Bioinformatics*, s. 3959–3965, Temmuz 2020, doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTAA255.
- [59] G. Boussarie *ve diğ.*, “Environmental DNA illuminates the dark diversity of sharks,” *Sci. Adv.*, doi:10.1126/SCIADV.AAP9661.
- [60] “Rarefaction.” <https://www.drive5.com/usearch/manual/rare.html> (Erişim Haziran 04, 2022).

- [61] “Rarefaction Curve: A Measure of Species Richness and Diversity - CD Genomics.” <https://www.cd-genomics.com/microbioseq/rarefaction-curve-a-measure-of-species-richness-and-diversity.html> (Erişim Haziran 04, 2022).
- [62] A. Chao, C.-H. Chiu, ve L. Jost, “Phylogenetic Diversity Measures and Their Decomposition: A Framework Based on Hill Numbers,” s. 141–172, 2016, doi:10.1007/978-3-319-22461-9_8.
- [63] R. A. Scherson ve D. P. Faith, “Phylogenetic diversity: Applications and challenges in biodiversity science,” *Phylogenetic Divers. Appl. Challenges Biodivers. Sci.*, s. 1–210, Ağustos 2018, doi:10.1007/978-3-319-93145-6/COVER.
- [64] B. D. Wagner ve diğ., “On the use of diversity measures in longitudinal sequencing studies of microbial communities,” *Front. Microbiol.*, s. 1037, Mayıs 2018, doi:10.3389/FMICB.2018.01037/BIBTEX.
- [65] H. Abdi ve L. J. Williams, “Principal component analysis,” *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.*, s. 433–459, 2010, doi:10.1002/wics.101.
- [66] Y. Shi, L. Zhang, K. A. Do, C. B. Peterson, ve R. R. Jenq, “APCoA: Covariate adjusted principal coordinates analysis,” *Bioinformatics*, s. 4099–4101, 2020, doi:10.1093/bioinformatics/btaa276.
- [67] G. Fouché ve L. Langit, “Introduction to MDX,” *Found. SQL Serv. 2008 R2 Bus. Intell.*, s. 347–367, 2011, doi:10.1007/978-1-4302-3325-1_13.
- [68] “Non-metric multidimensional scaling (NMDS) Archetypal Ecology.” <https://archetypalecology.wordpress.com/2018/02/18/non-metric-multidimensional-scaling-nmnds-what-how/> (Erişim Mayıs 23, 2022).
- [69] “Non-metric multidimensional scaling - GUSTA ME.” <https://mb3is.megx.net/gustame/dissimilarity-based-methods/nmnds> (Erişim Mayıs 23, 2022).
- [70] “Multidimensional Scaling | Towards Data Science.” <https://towardsdatascience.com/multidimensional-scaling-d84c2a998f72> (Erişim Mayıs 23, 2022).
- [71] L. Van Der Maaten ve G. Hinton, “Visualizing data using t-SNE,” *J. Mach. Learn. Res.*, s. 2579–2625, 2008.
- [72] M. Allaoui, M. L. Kherfi, ve A. Cheriet, “Considerably improving clustering algorithms using umap dimensionality reduction technique: A comparative study,” *Lect. Notes Comput. Sci. (including Subser. Lect. Notes Artif. Intell. Lect. Notes Bioinformatics)*, s. 317–325, 2020, doi:10.1007/978-3-030-51935-3_34/TABLES/4.
- [73] M. W. Dorrity, L. M. Saunders, C. Queitsch, S. Fields, ve C. Trapnell, “Dimensionality reduction by UMAP to visualize physical and genetic interactions,” *Nat. Commun.*, doi:10.1038/S41467-020-15351-4.
- [74] K. R. CLARKE, “Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure,” *Aust. J. Ecol.*, s. 117–143, 1993, doi:10.1111/j.1442-9993.1993.tb00438.x.

- [75] “One-way ANOSIM.”
<https://www.nhm.uio.no/english/research/infrastructure/past/help/anosim.html>
 (Erişim Mayıs 23, 2022).
- [76] “ANOSIM Test in R.” <https://jkzorz.github.io/2019/06/11/ANOSIM-test.html>
 (Erişim Mayıs 23, 2022).
- [77] “Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA) in R – Archetypal Ecology.”
<https://archetypalecology.wordpress.com/2018/02/21/permutational-multivariate-analysis-of-variance-permanova-in-r-preliminary/> (Erişim Mayıs 23, 2022).
- [78] B. H. Mcardle, M. J. Anderson, S. Ecology, ve N. Jan, “Fitting Multivariate Models to Community Data : A Comment on Distance-Based Redundancy Analysis Fitting Multivariate Models To Community Data : A Comment On Distance-Based Redundancy Analysis,” *Ecol. Soc. Am.*, s. 290–297, 2014.
- [79] “Comparing Categories — Homepage.”
http://qiime.org/tutorials/category_comparison.html (Erişim Mayıs 25, 2022).
- [80] A. I. Mccord ve diğ., “Fecal microbiomes of non-human primates in Western Uganda reveal species-specific communities largely resistant to habitat perturbation,” *Am. J. Primatol.*, s. 347–354, 2014, doi:10.1002/ajp.22238.
- [81] C. Giatsis, D. Sipkema, H. Smidt, J. Verreth, ve M. Verdegem, “The Colonization Dynamics of the Gut Microbiota in Tilapia Larvae,” *PLoS One*, s. e103641, Temmuz 2014, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0103641.
- [82] A. T. Neu, E. E. Allen, ve K. Roy, “Defining and quantifying the core microbiome: Challenges and prospects”, doi:10.1073/pnas.2104429118/-/DCSupplemental.
- [83] M. Sheykhmousa, M. Mahdianpari, H. Ghanbari, F. Mohammadimanesh, P. Ghamisi, ve S. Homayouni, “Support Vector Machine Versus Random Forest for Remote Sensing Image Classification: A Meta-Analysis and Systematic Review,” *IEEE J. Sel. Top. Appl. Earth Obs. Remote Sens.*, s. 6308–6325, 2020, doi:10.1109/JSTARS.2020.3026724.
- [84] S. Janitza ve R. Hornung, “On the overestimation of random forest’s out-of-bag error,” *PLoS One*, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0201904.
- [85] S. R. Voss ve diğ., “Gene expression during the first 28 days of axolotl limb regeneration I: Experimental design and global analysis of gene expression,” *Regen. (Oxford, England)*, s. 120–136, Haziran 2015, doi:10.1002/REG2.37.
- [86] D. Knapp ve diğ., “Comparative Transcriptional Profiling of the Axolotl Limb Identifies a Tripartite Regeneration-Specific Gene Program,” *PLoS One*, s. e61352), Mayıs 2013, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0061352.
- [87] R. Stewart ve diğ., “Comparative RNA-seq analysis in the unsequenced axolotl: the oncogene burst highlights early gene expression in the blastema,” *PLoS Comput. Biol.*, doi:10.1371/JOURNAL.PCBI.1002936.
- [88] J. Chong, P. Liu, G. Zhou, ve J. Xia, “Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data,”

Nat. Protoc., s. 799–821, 2020, doi:10.1038/s41596-019-0264-1.

- [89] T. Barrett *ve diğ.*, “NCBI GEO: Archive for functional genomics data sets - Update,” *Nucleic Acids Res.*, s. 991–995, 2013, doi:10.1093/nar/gks1193.
- [90] N. Z. Rymen, Daisy, Marco Ritelli, “Clinical and Molecular Characterization of Classical-Like Ehlers-Danlos Syndrome Due to a Novel TNXB Variant. *Genes*, 10(11), 843 | 10.3390/genes10110843,” 2019.
- [91] U. Valcourt, L. B. Alcaraz, J. Y. Exposito, C. Lethias, ve L. Bartholin, “Tenascin-X: beyond the architectural function,” *Cell Adh. Migr.*, s. 154, 2015, doi:10.4161/19336918.2014.994893.
- [92] Y. S. Fan, H. M. Yang, ve C. C. Lin, “Assignment of the human muscle adenine nucleotide translocator gene (ANT1) to 4q35 by fluorescence in situ hybridization,” *Cytogenet. Genome Res.*, s. 29–30, 1992, doi:10.1159/000133288.
- [93] “SMPX small muscle protein X-linked [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI.” <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23676> (Erişim Ağustos 21, 2022).
- [94] N. Yoneda-Kato, S. Fukuhara, ve J. ya Kato, “Apoptosis induced by the myelodysplastic syndrome-associated NPM-MLF1 chimeric protein,” *Oncogene*, s. 3716–3724, Haziran 1999, doi:10.1038/sj.onc.1202711.
- [95] “MLF1 myeloid leukemia factor 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI.” <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4291> (Erişim Ağustos 21, 2022).
- [96] “DHRS7C dehydrogenase/reductase 7C [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI.” <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/201140> (Erişim Ağustos 21, 2022).
- [97] “COX7A1 cytochrome c oxidase subunit 7A1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI.” <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1346> (Erişim Ağustos 21, 2022).
- [98] “LDB3 LIM domain binding 3 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI.” <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11155> (Erişim Ağustos 21, 2022).
- [99] “PFKM phosphofructokinase, muscle [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI.” <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=5213> (Erişim Ağustos 21, 2022).
- [100] C. H. Wu, M. H. Tsai, C. C. Ho, C. Y. Chen, ve H. S. Lee, “De novo transcriptome sequencing of axolotl blastema for identification of differentially expressed genes during limb regeneration,” *BMC Genomics*, s. 1–12, Temmuz 2013, doi:10.1186/1471-2164-14-434/FIGURES/6.
- [101] J. R. Monaghan *ve diğ.*, “Gene expression patterns specific to the regenerating limb of the Mexican axolotl,” *Biol. Open*, s. 937–948, Ekim 2012, doi:10.1242/BIO.20121594.
- [102] R. B. Page, J. R. Monaghan, J. A. Walker, ve S. R. Voss, “A model of transcriptional and morphological changes during thyroid hormone-induced metamorphosis of the axolotl,” *Gen. Comp. Endocrinol.*, s. 219–232, 2009, doi:10.1016/J.YGCEN.2009.03.001.

ÖZ GEÇMİŞ

Adı Soyadı : Muhammed Mustafa ÖGDÜR

Doğum Yeri ve Tarihi :

E-Posta :

EĞİTİM BİLGİLERİ

Lisans : 2018, KTO KARATAY ÜNİVERSİTESİ, MÜHENDİSLİK
FAKÜLTESİ, BİLGİSAYAR MÜHENDİSLİĞİ



AKSOLOTL KOL REJENERASYONU ALANINDA MİKROBİYOTA VE TRANSKRİPTOM VERİSİNİN MADENCİLİĞİ VASITASIYLA YENİ ADAY BİYOBELİRTEÇLERİN KEŞFİ

ORIGINALITY REPORT

3%

SIMILARITY INDEX

3%

INTERNET SOURCES

1%

PUBLICATIONS

1%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	acikerisim.medipol.edu.tr Internet Source	1%
2	sens.medipol.edu.tr Internet Source	<1%
3	www.ncbi.nlm.nih.gov Internet Source	<1%
4	www.jove.com Internet Source	<1%
5	Submitted to Istanbul Medipol Üniversitesi Student Paper	<1%
6	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Student Paper	<1%
7	www.researchgate.net Internet Source	<1%
8	www.turkiyeklinikleri.com Internet Source	<1%