



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AKSOLOTL KOL REJENERASYONU SÜRECİNDE
MİKROBİYOTA ETKİSİNİN MİKROBİYOM VE
TRANSKRİPTOM DİNAMİĞİ AÇISINDAN ARAŞTIRILMASI**

SULTAN GÜL

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi NEŞE AYŞİT

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Turan DEMİRCAN

İSTANBUL- 2021

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Tez Sahibi : Sultan GÜL
Tez Başlığı : Aksolot Kol Rejenerasyonu Sürecinde Mikrobiyota Etkisinin
Mikrobiyom ve Transkriptom Dinamiği Açısından Araştırılması
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kuzey Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 05.11.2021

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

Danışman

Dr.Öğr. Üyesi Neşe AYŞİT

Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

İmza

Sınav Jüri Üyeleri

Dr.Öğr. Üyesi Berrak Çağlayan

İstanbul Medipol Üniversitesi

Dr.Öğr.Üyesi Kıvanç KÖK

İstanbul Medipol Üniversitesi

Doç.Dr. Turan DEMİRCAN

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi

Prof.Dr Reşat ÜNAL

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi

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

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

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



Tez Sahibinin
Adı ve Soyadı

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans hayatım boyunca değerli desteğini esirgemeyerek birçok tecrübe ve deneyim elde etmemi sağlayan, kendisi ile çalışmış olmaktan dolayı onur duyduğum kıymetli hocam Doç. Dr. Turan DEMİRCAN'a şükranlarımı sunarım.

Yaşadığımız zorluklarda yanımızda olup sosyal ve akademik olarak bizi destekleyen sevgili hocam Dr. Öğr. Üye. Neşe AYŞİT'e

Eğitim hayatım sürecinde çalışmalarımı kolaylaştırıp destekleyen ve yol gösteren yanımızda olan Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK ve Doç. Dr. Esra ÇAĞAVİ'ye

Verdiği imkanlardan ötürü SABİTA ailesine,

Demircan Lab ailesinden edindiğim kardeşlerim; Pelin TUĞLU, Ebru ALTUNTAŞ, Caner YATMAZ'a, ve dost ekipten sevgili Eda ÇEVİK ve Aylin BAKIRCI'ya

Kardeş labımız olarak gördüğüm, sevinç, heyecan, tecrübe ve imkan kardeşi olarak zorlukları beraber göğüslediğimiz Sadık BAY, Damla ULUDAĞ, Ozan TOPÇU, Oğuzhan KÖSE'ye

Uzak mesafelerden de olsa beni hiç yalnız bırakmayan, destekleyen ve yüreklendiren kıymetli dostlarım Büşra ÖZER ve Şeyma GENÇOĞLU'ya

Sevincimde üzüntümde her daim yanımda olan yorulduğumda güç veren Aziza ABLİATİPOVA'ya

Beraber hayaller kurduğumuz ve bir kısmını gerçekleştirdiğimiz; umut hayal ve ekip arkadaşlarım, MikroHobist atölye ekibim, Büşra YILMAZ, Tuğçe Nur ERÇETİN, Züleyha DEMİRCİ'ye

Eğitim hayatım boyunca her an beni destekleyen, varlığı ve sevgisinden güç alarak yoluma devam etmemde çok emeği olan, sevinç kaynağım sevgili annem Fatma GÜL ve babam Bayram GÜL'e

Sonsuz minnet ve teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU.....	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
RESİMLER LİSTESİ.....	xi
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1 Rejenerasyon.....	5
4.1.1 Memelilerde rejenerasyon yeteneği	5
4.2 Aksolotl.....	6
4.2.1 Aksolotl metamorfozu.....	7
4.2.2 Aksolotl rejenerasyon yeteneği	10
4.2.3 Aksolotl uzuv rejenerasyonu.....	12
4.2.4 Blastema Hücrelerinin Kökeni.....	17
4.3 Mikrobiyom	21
4.3.1 Farklı canlıların metamorfoz ve rejenerasyon süreçlerine mikrobiyomun etkisi	22
4.3.2. Aksolotl metamorfozu öncesi ve sonrasında mikrobiyota profili	24
4.3.3 Aksolotl kol rejenerasyonunda mikrobiyota profili	25
4.3.4. Mikrobiyal çeşitlilik analizlerinin gerçekleştirilmesi.....	26
4.4. Transkriptom.....	28

5. MATERYAL VE METOT	30
5.1. Aksotl Yaşam Ortamı Mikrobiyomu	31
5.1.2. Aksotlların Metamorfoza İndüklenmesi	32
5.2. Rejenerasyon boyunca değişen mikrobiyom	35
5.4 Rejenerasyon boyunca değişen gen ifadesi.....	40
5.3.4 RNA Kütüphanelerinin Hazırlanması ve Transkriptom Dizi Analizi	43
5.3.5. RNA dizilemesi sonuçlarının analiz edilmesi	44
6. BULGULAR	47
6.1. Aksotl yaşam ortamı mikrobiyomu.....	47
6.1.1. DNA izolasyon sonuçları	47
6.1.2 Biyoinformatik analiz sonuçları.....	47
6.1.3 Taksonomik Çeşitlilik	48
6.1.4 Beta çeşitlilik analizi.....	53
6.1.5. Alfa çeşitlilik analizi	54
6.2. Metamorfoz sonucu değişen aksotl mikrobiyomu ve akvaryum suyuna etkisi.....	55
6.2.1. Biyoinformatik analiz sonuçları.....	55
6.2.2. Alfa çeşitlilik analizi	58
6.2.3. Beta çeşitlilik analizi.....	58
6.3. Rejenerasyon boyunca değişen gen ifadesi.....	59
7. TARTIŞMA	61
8. SONUÇLAR	67
9. KAYNAKLAR	68
10. ETİK KURUL ONAYI	79
11. ÖZGEÇMİŞ	80

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

AEB	: Apikal epitelyal başlık
AGSC	: Ambystoma Genetic Stock Center
BMP	: Kemik morfogenezik protein
CSF	: Koloni uyarıcı faktör
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
HDM	: Hücre dışı matriks
IL-1	: İnterlökin 1
ITS	: İnternal ara bölgeleri
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
nM	: Nanomolar
ng	: nanogram
NGF	: Sinir büyüme faktörü
OTU	: Operasyonel taksonomik birim
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
T3	: Triiodotironin
T4	: Tetraiodotironin
TSH	: Tiroid uyarıcı hormon
TGF	: Transforming büyüme faktörü

tRNA : Taşıyıcı ribonükleik asit

μM : Mikromolar

μl : Mikrolitre

YE : Yara epiteli



TABLolar LİSTESİ

Tablo 4.2.3. 1 Rejenerasyonun evreleri.....	13
Tablo 5.1.5. 1 Polimeraz zincir reaksiyonu.....	34
Tablo 5.3.5. 1 Kullanılan sarflar.....	45
Tablo 5.3.5. 2 Kullanılan cihazlar.....	46
Tablo 6.1.1 1 Su örnekleri DNA konsantrasyonları tablosu.....	47



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.2.3. 1. Aksolotl uzuv amputasyonu sonrası blastema oluşum ve gelişim safhaları.....	15
Şekil 4.2.3. 2. Geriye farklılaşma ve rejenerasyon olaylarında hücre farklılaşmasının karşılaştırılması.....	16
Şekil 4.2.4. 1. Uzuv rejenerasyon süreci.....	18
Şekil 4.2.4. 2. Blastema oluşumu için sunulan teorilere genel bakış.....	19
Şekil 4.2.4. 3 Filogeni ile önerilen hücresel yollar	20
Şekil 4.3.3.1 Aksolotl rejenerasyonun farklı günlerinde alınan örneklerin filum düzeyinde taksonomik çeşitlilik.....	25
Şekil 4.3.4. 1 16S rRNA geninin korunmuş (mavi) değişken (gri) hiperdeğişken bölgeleri ve bu bölgeleri çoğaltmak için kullanılan primerler.....	27
Şekil 5.1 Deney basamaklarının şema ile açıklanması.....	30
Şekil 5.2 Deney basamaklarının şema ile açıklanması.....	31
Şekil 6.1.2. 1 Örneklerden elde edilen sekans sayısı tablosu.....	48
Şekil 6.1.3. 1 Neotenik ve metamorfik su örneklerinde bulunan mikroorganizmaların şube düzeyinde grafiği.....	49
Şekil 6.1.3. 2 Neotenik ve metamorfik su örneklerinde bulunan mikroorganizmaların şube düzeyinde ısı haritası.....	50
Şekil 6.1.3. 3 Neotenik ve metamorfik su örneklerinde bulunan mikroorganizmaların aile düzeyinde ısı haritası.....	51
Şekil 6.1.3. 4 Neotenik ve metamorfik su örneklerinde bulunan mikroorganizmaların cins düzeyinde ısı haritası.....	52

Şekil 6.1.3. 5 Neotenik ve metamorfik su örnekleri LEfSe analiz sonuçları.....	53
Şekil 6.1.4. 1 Neotenik ve metamorfik yaşam ortamı örnekleri mikrobiyotasının Bray-Curtis indeksine göre benzerliklerinin temel koordinat analizi (PCoA) grafiği.....	54
Şekil 6.1.5. 1 Neotenik ve metamorfik yaşam ortamı örneklerinin alfa çeşitlilik analiz sonuçları.....	55
Şekil 6.2.1. 1 a) Neotenik ve metamorfik aksolotl deri, mide bağırsak ve dışkı mikrobiyomu b)Neotenik ve metamorfik aksolotl akvaryum su mikrobiyomu...56	
6.2.1. 2 a) Neotenik ve metamorfik aksolotl organlarının cins düzeyinde ısı haritası b)Neotenik ve metamorfik aksolotl akvaryum su mikrobiyomunun cins düzeyinde ısı haritası.....	57
Şekil 6.2.2. 1 a) Neotenik ve metamorfik aksolotl organlarının alfa çeşitlilik grafiği (Demircan et al. 2018) b)Neotenik ve metamorfik aksolotl akvaryum suyu alfa çeşitlilik analizi grafiği.....	58
Şekil 6.2.3. 1 a) Neotenik ve metamorfik aksolotl organlarının alfa çeşitlilik grafiği (Demircan et al. 2018) b)Neotenik ve metamorfik aksolotl akvaryum suyu alfa çeşitlilik analizi grafiği.....	59

RESİMLER LİSTESİ

- Resim 4.2.1. 1** Metamorfoz ile birlikte aksolotun geçirdiği değişimler.....8
- Resim 5.2.2. 1** Aksolotl kol ampütasyon modelinin oluşturulması.....36



1. ÖZET

AKSOLOTL KOL REJENERASYONU SÜRECİNDE MİKROBİYOTA ETKİSİNİN MİKROBİYOM VE TRANSKRİPTOM DİNAMİĞİ AÇISINDAN ARAŞTIRILMASI

Aksolotl; omurgalı sınıfından, iki yaşamlı, rejenerasyon yeteneği yüksek bir hayvandır. Aksolotl normal şartlar altında metamorfoz geçirmeyip dışarıdan tiroid hormonu uygulaması ile metamorfoza uğratılabilmektedir. Fakat canlı metamorfoz geçirdikten sonra rejenerasyon yeteneğinde, özellikle de kol rejenerasyonunda önemli bir azalma olmaktadır. Canlının sahip olduğu rejenerasyon yeteneğini anlamak için çeşitli açılardan araştırmalar yapılmıştır. Canlı mikrobiyomunun bu sürece katkısı ise merak edilen ve araştırılan bir konudur. Aksolotl organlarının mikrobiyomu metamorfoz sonrasında yeniden şekillendiği bilinmektedir. Metamorfoz ile birlikte azalan rejenerasyon yeteneğinin, mikrobiyal değişim ile ilişkisi bu tez çalışmasının konusudur. Bu kapsamda metamorfoz öncesi ve sonrasında aksolot yaşam ortamı mikrobiyom değişimi ile, rejenerasyon sırasında değişen mikrobiyota profili ve gen ifadesi araştırılmıştır. Böylece hem yaşam ortamındaki hem de rejenerasyon sırasındaki mikrobiyal değişim ele alınarak bütünsel bir bakış açısı ile rejenerasyon yeteneği incelendi. Bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlara göre, metamorfoz ile birlikte hem canlı organlarında hem de canlı yaşam ortamında mikrobiyota değişmektedir.

Anahtar kelimeler: Aksolotl, Metamorfoz, Mikrobiyom, Rejenerasyon

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF MICROBIOTA IN THE PROCESS OF AXOLOTL ARM REGENERATION IN TERMS OF MICROBIOME AND TRANSCRIPTOM DYNAMICS

Axolotl; It is an animal of the vertebrate class, amphibian, with a high regeneration ability. Axolotl does not undergo metamorphosis under normal conditions and can be metamorphosed by external application of thyroid hormone. However, regeneration ability -especially in arm regeneration- is significantly reduced after metamorphosis. In order to understand the regeneration ability of axolotl, research has been done from various perspectives. The contribution of the living microbiome to this process is a curious and researched subject. The microbiome of axolotl organs is known to remodel after metamorphosis. The relationship between regeneration ability, which decreases with metamorphosis, and microbial change is the subject of this thesis. In this context, microbiome changes in the axolotl habitat before and after metamorphosis, and the changing microbiota profile and gene expression during regeneration were investigated. Thus, the microbial change in both the living environment and during regeneration was handled and the regeneration ability was examined with a holistic perspective. According to the results obtained within the scope of this study, the microbiota changes both in living organs and in the living environment with metamorphosis.

Keywords: Axolotl, Metamorphosis, Microbiome, Regeneration

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Canlılar aleminde bir kısım canlının kaybolan uzuv ve organlarını yenileme yeteneği yüksek iken, bir kısım canlılar ise bu özelliği kaybederek başka yetenekler kazanmıştır. Bilim insanları halen rejenerasyon yeteneğine sahip olan bu organizmaları inceleyerek, bu özelliklerini yüksek organizmalara uyarlamının yollarını aramak için çalışmalarını sürdürmektedir (Maden 2018). Bu tez çalışmasında kullanılan model organizma da rejenerasyon ustası olarak bilinen aksolotldur.

Aksolotl, iki yaşamlı ve rejenerasyon yeteneği yüksek bir hayvandır. Bu özelliğinin yanında izsiz yara iyileşmesi (Denis et al. 2013) ve düşük kanser insidansına (Oviedo and Beane 2009) sahip olması dolayısı ile çok özel bir model organizmadır. Omurgalı organizma olması dolayısı ile, rejenerasyon yeteneği yüksek hayvanlardan biyolojik olarak insanlara en yakın olan türlerden biridir. Bu nedenle de rejeneratif biyoloji çalışmalarında model organizma olarak kullanılabilir. İki yaşamlı canlı olmasına rağmen dışarıdan bir müdahale olmadan metamorfoz geçiremez ve doğada hayatının tümünü suda, çocuk karakterde geçirir. Diğer bir deyişle erişkin dönemdeki bir aksolotl larval özellikler göstermeye devam eder (Groef, Grommen, and Darras 2018). Yaşam ortamına tiroid hormonu verilerek metamorfoza uğratıldığında ise kol rejenerasyon yeteneğinin azaldığı gözlenmiştir (Demircan et al. 2018). Kara yaşamına adaptasyon ile birlikte rejenerasyon yeteneğinin azalması ilginç bir durum olup halen farklı yönlerden araştırılmaktadır.

Bu organizmalarda yaşayan konakçıların hepsine birden mikrobiyota denmektedir (Sommer and Bäckhed 2013). Mikrobiyotanın konak canlılar ile kurduğu etkileşimlerin, canlının metabolik fizyolojik ve davranış süreçleri üzerindeki rollerinin anlaşılması ile birlikte mikrobiyom çalışmaları daha da önem kazanıp yaygınlaşmıştır. Konak canlı mikrobiyal topluluğunu seçebilmekte, mikrobiyota ise konak canlının hastalık veya sağlık süreçlerini etkileyebilmektedir. Konak canlı farklı koşullar altında farklı mikrobiyal popülasyona sahiptir. Örneğin canlı hayatının farklı evrelerinde farklı mikrobiyoma sahiptir. Bazı kompleks olaylar sırasında da mikrobiyomun değiştiği bilinmektedir

Sekanslama teknolojilerinin gelişmesi ile birlikte bir örnekte bulunan mikrobiyal topluluk kolaylıkla tespit edilebilmektedir. Farklı genomların evrimsel akrabalıklarını tespit edebilmek için hepsinde ortak fonksiyona sahip bir makromolekül olan rRNA sekans dizisi karşılaştırılmaktadır (Grayl et al. 1984). Filogenetik marker genlerden biri olan 16S rDNA sekans bilgisi ile örnek mikrobiyotası tayin edilmektedir.

Kara yaşamı ile birlikte aksolotlda değişen olgulardan biri de mikrobiyotadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalardan birinde metamorfoz sonrası aksolotl mikrobiyotasının yeniden şekillendiği gösterilmiştir. Metamorfoz sonunda en keskin değişimin gözlemlendiği organ deri olmakla birlikte, mide, bağırsaklar ve dışkı mikrobiyomunun da değişime uğradığı bildirilmiştir. (Demircan et al. 2018). Bu değişimin rejenerasyon sürecine olumlu/olumsuz etkisi merak edilmektedir.

Bu tez çalışmasının amacı, metamorfoz öncesi ve sonrası aksolotl yaşam ortamı mikrobiyom değişimini araştırarak rejenerasyona yaşam ortamı değişiminin etkisini anlayabilmektir. Ayrıca rejenerasyon sürecinde değişen mikrobiyal gen ifadesi değişiminin araştırılması ile gen ifade farklılıklarını bu iki durum arasında kıyaslayarak rejenerasyon ile mikrobiyal gen ifadesinin ilişkisini kurmak amaçlanmıştır. Böylece mikrobiyomun rejenerasyon sürecine etkisini bütünsel olarak ele alarak yorumlamıştır. Bu amaçlar doğrultusunda neotenik ve metamorfik aksolotl yaşam ortamı örneklerindeki mikrobiyal değişim incelenmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 Rejenerasyon

Rejenerasyon, kaybolan veya hasar alan doku veya organların fonksiyonel olarak yeniden oluşturulma sürecine verilen isimdir (Alvarado ve Tsonis 2006) . Aksolotl, planarya, hidra, zebra balığı gibi bazı omurgasız ve omurgalı organizmalar, kaybolan veya hasar almış uzuvlarını rejenere edebilmektedirler (Ghosh 2016).

Evrimsel süreçte bazı omurgalı canlıların rejenerasyon yeteneği düşüp dokular bazında sınırlanırken (örneğin kuşlar ve memeliler gibi) bazılarında ise (örneğin amfibiler) halen geniş bir rejenerasyon yeteneği görülmektedir (Maden 2018). Bazı organizmaların yüksek rejenerasyon yeteneğine sahip iken bazılarının bu yeteneği kaybetmiş olması ilgi çeken bir konu olup, halen araştırılmaktadır.

4.1.1 Memelilerde rejenerasyon yeteneği

Canlı organizmalar, yaşamını sürdürebilmek için doku hasarı ve hasarın onarılması arasındaki dengeyi korumak zorundadır (McCusker ve Gardiner 2011). Bu bağlamda doku ve organ yenilenmesi tüm organizmalar için önemli bir fonksiyondur. Yetişkin insanların rejenerasyon yeteneği sınırlı olup, yalnızca kemik iliği bağırsak mukozası ve derinin bazı katmanlarını yenileyebilmektedirler (Epstein ve Maibach 1965) (Chan, Rebecca J. 2004) (Oates and West 2006).

Memeliler sınıfında bulunan hayvanların kaybettikleri veya hasara uğrayan dokularını rejenere etme ve izsiz yara iyileşmesi gerçekleştirme yetenekleri çok sınırlıdır. Dokuların yapı ve işlevini korumak ise çoğunlukla kaybolan hücrelerin yerini alan kök hücreler ile sağlanmaktadır (McCusker and Gardiner 2011).

Memelilerde rejenere edilebilen dokular kas, kemik ve epitel dokularıdır. Kas rejenerasyonunda hasarlı kas lifleri satellit (kas doku kök hücresi) hücreleri aracılığı ile rejenere edilmektedir. Epidermis dokusu etkin bir şekilde rejenere edilebilirken, dermis rejenerasyonu skar (yara izi) oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Grefte et al.

2007) (Harty et al. 2003). Son olarak kemik doku sürekli olarak yenilenebilme yeteneğine sahiptir. Bu nedenle kemik dokuda meydana gelen kırıklar, eğer kemik ekstremiteleeri arasında bir boşluk yoksa hasar onarılabilmektedir (Hietaniemi, Peltonen, and Paavolainen 1995). Bununla beraber memeli canlılar daha karmaşık yapılarını rejenere edememektedir.

Bahsedilen karmaşık doku ve organların yenilenmesi doku veya organ rejenerasyonundan ziyade, hasarlı veya yaşlanmış dokunun dönüşümünü sağlayan fizyolojik bir değişim olayıdır. Memelilerin rejenerasyon yeteneği kaybolan dokuların yerini alabilen hücreler ile sınırlı olup, kaybolan organın tamamını üretecek bir seviyede değildir. Kimi dokuların hücreleri hasar aldığında veya yaşlandığında dokuda yerleşik bulunan öncül hücreler çoğalır, sonuçta fizyolojik ve hatta sabit bir şekilde devam eden bir rejenerasyon gerçekleşir. Bu rejenerasyon fizyolojik rejenerasyon olarak adlandırılır (Ghosh 2016). Örneğin rejenere olduğu bilinen dokulardan karaciğerin yenilenmesi de, rejenerasyondan ziyade kayıp dokunun telafisi olarak, karaciğerin kütle olarak genişlemesidir (Trautwein 2006).

Rejeneratif biyolojide model organizma olarak kullanılan denizyıldızı, hidra, planarya ve aksolotl gibi canlılar ise doku ve organ rejenerasyonu gerçekleştirebilmektedir.

Tetrapodlar grubunun bir üyesi olan urodül amfibileri ise diğer omurgalıların sahip olmadığı geniş bir rejenerasyon yeteneğine sahiptir (McCusker and Gardiner 2011). Omurgalılar arasında yalnızca urodül amfibilerinin bazıları ve iribaş halindeki kurbağalar iç ve dış organlarını yenileyebilir (Sugiura et al. 2016)

4.2 Aksolotl

Aksolotl (*Ambystoma mexicanum*) omurgalıların, kaplan semenderleri grubuna ait *Ambystoma* ailesinde yer alan amfibik (2 yaşamlı- yaşamlarının bir bölümünü suda bir bölümünü karada yaşayan) bir canlıdır. Amfibiler üç gruba ayrılır: anuranlar (örneğin kurbağalar), ürodeller (örneğin semenderler) ve gymnophiona (ayaksız iki yaşamlılar). Ürodeller grubundan olan semenderlere örnek aksolot yüksek

rejenerasyon yeteneğine sahip, doğal yaşam alanı Meksika olan (Brandon RA. 1989) ve nesli tükenmekte olan ender türlerdendir (Voss, Epperlein, and Tanaka 2009). Urodeller hücreleri farklılaştıktan sonra, farklılaşmamış ortamı yeniden sağlayarak rejenerere olabilen tek tetrapod omurgalı grubudur (Roy and Lévesque 2006).

Amfibilerde metamorfozun tamamlanmasından tiroid hormonları sorumludur (Allen 1925) (Tile 1912). Amfibik canlılarda larval evrede tiroid hormonu düşük iken metamorfoz sırasında en üst düzeylerine ulaşır (Mondolj 1979). Tiroid hormonu çeşitli yollarda gen ifade programlarını aktive ederek; canlıda morfolojik ve fizyolojik değişimlere neden olur (Brown and Cai 2007).

Birçok semender türü normal yaşam döngüsünde metamorfoza uğrarken aksolotl, yaşamının tamamını suda geçirmektedir. Ve normal yaşam döngüsünde metamorfoz geçirmemektedir (Groef et al. 2018). Ancak dışarıdan tiroid hormon uygulaması ile metamorfoza uğratılabilmektedir (Huxley, 1920). Aksolotl, hayatının yetişkinlik evresinde bile juvenile (yavru) karakterlerini korumaktadır. Bu özelliklerinden dolayı pödomorfik canlılar olarak adlandırılmaktadırlar (Groef et al. 2018). Gelişimi boyunca, tiroid hormon seviyesi metamorfoz gerçekleşmesini destekleyecek kadar yükselmediğinden, dışarıdan tiroid hormonuna maruz kalmadığı müddetçe metamorfoza uğramamaktadır (Crownor vd. 2019). Örneğin amfibi grubu hariç diğer amniot gruplarında, yetişkin organizma ile embriyo, doku kuruluğu ve hiyaluronat miktarı açısından %20 daha farklı iken amfibiler yetişkinlik dönemlerinde de hiyaluronat içeriği zengin dokularını korurlar.

Aksolotl ömür boyu süren yüksek rejenerasyon yeteneğine sahiptir. Bu nedenle rejeneratif biyolojide model organizma olarak kullanılmaktadır.

4.2.1 Aksolotl metamorfozu

Amfibilerde metamorfozun tamamlanmasından tiroid hormonları sorumludur (Allen 1925) (Tile 1912). Tiroid hormonunun iki formu vardır: triiodotironin (T3) ve tetraiodotironin (T4). T4 formu tiroid bezinin ana ürünü olup, salgılandıktan sonra

periferal organlarda, reseptöre bağlanma etkinliği daha fazla olan, yani daha aktif olan T3 formuna dönüştürülmektedir (Nussey S, 2001) Dolaşımdaki tiroid hormonu hücrelere geçince reseptörüne bağlanarak biyolojik yolları aktive etmektedir (Manuscript 2013).

Aksolotl tiroid bezinin T4 hormonu salgılayabildiği ve TSH (Tiroid uyarıcı hormon) hormonunun var olduğu tespit edilmiştir. Buna rağmen doğal olarak metamorfoza uğrayamamasının birincil nedeni dolaşımdaki tiroid hormon seviyesinin az olması ikinci nedeni ise TSH hormonunun salgılanma düzeyinin az olması olarak bildirilmiştir (March and Mexican 1992).

Bununla birlikte aksolotl yaşam ortamına tiroid hormonu (T₃ veya daha az aktif olan T₄) verilerek metamorfoza uğraması sağlanabilmektedir (Page and Voss 2017) (Nussey S, 2001).



Resim 4.2.1. 1 Metamorfoz ile birlikte aksolotlun geçirdiği değişimler

Tiroid hormonu, farklı hücre tiplerinde farklı biyolojik sinyal yollarını tetiklediği için birçok gelişimsel olayı kontrol etmektedir. Örneğin tiroid hormon maruziyeti kuyruk kasının ölümüne neden olurken (Nakajima 1997) kol kasının farklılaşp büyümesini uyarmaktadır (Brown and Cai 2007).

Aksolotl metamorfozu sırasında bazı organlar kaybolurken bazı doku ve organlar yeniden şekillenmektedir (**Resim 4.2.1. 1**). Örneğin canlı neotenik evrede solungaç solunumu gerçekleştirirken, metamorfoz sonunda solungaçlar kaybolur ve akciğer solunumu yapmaya başlamaktadır. Neotenik aksolotl ile karşılaştırıldığında metamorfik aksolotlun deri, kuyruk, dalak ve safra kesesinde yapısal değişimler gerçekleştiği gösterilmiştir (Aytürk, Yıldırım, and Elif 2016).

Daha önce yapılan çalışmalarda metamorfoz geçirmiş aksolotda yenilenme yeteneğinin neotenik aksolota kıyasla azaldığı gösterilmiştir (Demircan et al. 2018) (Monaghan et al. 2014). Metamorfoz sonrası rejenerasyon yeteneğindeki azalmanın nedeni bilinmemektedir ve araştırılmaktadır.

Bahsedilen bağlamda mikrobiyomun rejenerasyon üzerindeki etkisi de önemlidir. Daha önce yapılmış bir çalışmada (Demircan et al. 2018) neotenik ve metamorfik aksolotlun deri bağırsak mide ve dışkı örneklerinin mikrobiyomu karşılaştırılmıştır. Neotenik aksolotl mikrobiyomunda baskın olan türler; *Bacteroidetes Firmicutes Proteobacteria Actinobacteria* ve *Verrucomicrobia* iken metamorfik örneklerde *Proteobacteria* türü mikropların artışı görülmüştür. *Proteobacteria* şubesine ait bakteriler memelilerde patojen özelliği ile bilinmesi bakımından sonuçlar ilginç görünmektedir.

Konak canlı ve mikrobiyomu arasındaki ilişkinin, konak canlının birçok işlevine etki ettiği bilinmektedir. Metamorfoz sonrası değişen mikrobiyomun, canlının rejenerasyon yeteneğine etkisi bu çalışmanın temel konusudur. Neotenik ve metamorfik organ örneklerinin mikrop toplulukları değişimini incelemek sonucunda elde edilen bulgular şu soruyu sormamıza neden olmaktadır: metamorfoz ile birlikte değişen mikrobiyom, metamorfoz ile birlikte azalan rejenerasyon yeteneği ile ilişkili olabilir mi?

4.2.2 Aksolotl rejenerasyon yeteneği

Birçok omurgalı, embriyonik dönemde hücreleri henüz farklılaşmadığı için uzuvlarını rejenere edebilmektedir (Bryant, Endo, and Gardiner 2002). Yetişkinlik dönemindeki omurgalı canlılar ise bu yeteneğini kaybetmişlerdir. Omurgalı amfibi türlerinden biri olan aksolotl ise, yaşamının yetişkin evresinde bile kol, merkezi sinir sistemi, kalp, retina gibi kompleks yapılarını fonksiyonel olarak rejenere edebilmektedir (Voss et al. 2009). Aksolotlu farklı ve ilgi çekici kılan bu özelliği rejeneratif tıp araştırmalarının bir konusunu oluşturmaktadır.

Aksolotlun sahip olduğu rejenerasyon yeteneğini açıklayabilmek için iki hipotez önerilmektedir.

Birinci hipotez aksolotlun eşeyssel olgunluğa eriştikten sonra bile juvenile (çocuk) özelliklerini koruması, yani ‘pödomorfik’ olmasını temel almaktadır. Bu özelliği nedeni ile metamorfoza uğramamakta ve hücreleri embriyonik özellikler taşımaya devam etmektedir. Böylece rejenerasyon yeteneğini koruduğu düşünölmektedir. Bu hipotez, kurbağalarda metamorfoza uğramadan hemen önce ve metamorfoz sonrasında rejenerasyonun kademeli olarak azalması ile tutarlı görünmektedir (Mescher and Neff 2005).

İkinci hipotez ise urodel grubu canlıların basit bir kazanılmış bağışıklık sistemine sahip olması ve rejenerasyonun zayıf bağışıklık yanıtı ile ilişkilendirilmiş olması temeline dayanmaktadır. Memeli organizmaların rejenerasyon yeteneğinin sınırlı olduğu bilinmektedir. Memeli sınıfındaki canlılar da gelişmiş bir kazanılmış bağışıklık sistemine ve zayıf rejenerasyon yeteneğine sahiptir. Aksolotl ise; yakın akrabası *Xenopus* (zenopus)’a kıyasla zayıf bağışıklık sistemine sahip olup, zenopustan daha yüksek rejenerasyon yeteneğine sahiptir (Godwin and Brockes 2006). Bununla birlikte, memelilerde embriyonik gelişim evresinde, bazı bağışıklık hücreleri henüz gelişmemişken, yara izsiz iyileşme gerçekleşmektedir. Bu da gelişmiş bir bağışıklık sisteminin rejenerasyon yeteneğini sınırlandırdığını düşündürmektedir. Yetişkin canlıda bağışıklık sisteminin fibrozis, yara izi ve inflamasyon oluşumuna neden olduğu önerilmektedir (Street and House 1997).

Gerçekten de tetrapodlarda bağışıklık sisteminin baskılanması rejenerasyon yeteneğini arttırmaktadır. Ayrıca makrofaj ve antijen sunan hücreleri bulunmayan farelerin yara izsiz iyileşme gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Martin et al. 2003). Filogenetik olarak kazanılmış bağışıklık sisteminin gelişmişliğine bağlantılı olarak rejenerasyon yeteneğinde azalma olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Flajnik MF, 2003)

Bazı çalışmalar, daha karmaşık bağışıklık sisteme sahip omurgalı türlerde sinir rejenerasyonunun azaldığını kanıtlamaktadır (Aurora and Olson 2015). Bununla birlikte rejenerasyon için bağışıklık sistemi aktivitesinin gerekli olduğu bilinmektedir (Mescher and Neff 2005).

Başarılı yara iyileşmesi ve rejenerasyon için bağışıklık sisteminin bir düzeyde aktivasyonu gerekmektedir. Rejenerasyonun erken evrelerinde bağışıklık sistemi hücreleri yara bölgesine göç etmekte ve önemli bazı roller üstlenmektedirler (Mescher and Neff 2006). Örneğin nötrofiller yara iyileşmesi sırasında hücre enkazını temizleyerek, ve ayrıca çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler salgılayarak rejenerasyona katkıda bulunmaktadır (Wang 2018). Sitokinlerin salgılanması; lökosit göçü, hücre çoğalması, damarlanma, kollajen yeniden modellenmesi gibi olayları doğrudan etkilemektedir (Godwin and Brockes 2006) (Mescher and Neff 2006). Ayrıca yine başka bir çalışmada bağışıklık sisteminin uyarılmasının sinir rejenerasyonunu artırdığı gösterilmiştir (Bosak et al. 2018). Memelilerde periferik sinir sistemi hasarlarında, makrofajlar hasarlı bölgeye göç ederek miyelin fagositozu yapmakta ayrıca rejenerasyonu uyarıcı moleküller (IL-1:sinir hücrelerinden NGF üretimini uyarır.) salgılamaktadırlar. Aksolotl ve newt gibi türlerde rejenerasyon sırasında hızlı bir makrofaj yanıtı gerçekleşmektedir (Press et al. 1993).

Yetişkin newtlerde amputasyon sonrası dolaşımdaki lenfosit ve monosit miktarının yarıya düştüğü ve rejenerasyon tamamlanana dek normale dönmediği bildirilmiştir. Bu durum rejenerasyon sırasında bağışıklık yanıtı gerekliliğinin kritik bir örneğini temsil etmektedir (Sicard 1985).

Aksolotl kol rejenerasyonunun erken evresinde, (yara iyileşmesi sırasında) blastema öncül hücreleri bağışıklık sistemi düzenleyici rol üstlenmektedir. Yapılan çalışmalar

yara iyileşmesi evresinde blastema öncül hücrelerinin çeşitli inflamatuvar sitokinler salgılayarak bağışıklık sistemini düzenlediğini göstermiştir (Tsai, Baselga-garriga, and Melton 2019).

4.2.3 Aksolotl uzuv rejenerasyonu

Aksolotl uzuv rejenerasyonu; ampute edilen koldan proksimal distal eksen boyunca yeniden işlevsel bir uzuv oluşumu sürecidir.

Uzuv rejenerasyonunun birkaç aşamadan oluşmaktadır. En erken aşamada, amputasyon bölgesinin etrafı yara epiteli ile örtülür. Sonrasında, farklılaşmamış ve proliferasyon olan mezankimal hücrelerin bir kümesi olan blastema dokusu oluşumu gözlenmektedir. Daha geç aşamalarda ise blastema dokusu hücreleri yeniden farklılaşarak kayıp uzvu yeniden oluşturulmaktadır (Wallace, Watson, and Egar 1981).

Uzuv rejenerasyonun temelinde hazırlık ve yeniden gelişim olmak üzere iki fazı vardır (Stocum 2011). Birinci fazda yara epitelinin oluşumu, bağışıklık cevabı, hücrelerin geriye farklılaşması (dediferansiasyon), hücre çoğalması (proliferasyon), ve hücre göçü (migrasyon) olayları meydana gelmektedir. Sinir uyarımı, hücrelerin geriye farklılaşması ve göçü için önem arz etmektedir. İkinci faz ise yeniden gelişim fazı olup, bu aşamada pattern oluşumu ve morfogenez (organ gelişimi) olayları meydana gelmektedir. Bu aşamada sinir iletimi engellense bile rejenerasyon devam edebilir (Roy and Lévesque 2006) (Mullen et al. 1996). Rejenerasyona hazırlık evresi olan ilk aşama rejenerasyona özgü bir durum sergiler iken yeniden gelişim evresi embriyonik gelişimine benzemektedir (**Tablo 4.2.3. 1**) (Knapp et al. 2013) (Simkin J, Han M, Yu L, Yan M 2013).

Tablo 4.2.3. 1 Rejenerasyonun evreleri (Bryant et al. 2002)

REJENERASYONUN EVRELERİ	
FAZ 1: YARA İYİLEŞMESİ	
Yara epitelinin oluşumu	Yara etrafındaki epitelyum kaynaklı keratinositler göç eder ve su alıp şişerek yara yüzeyini kapatır.
Gen ifadesinin uyarılması	Yara iyileşmesi ve uzuv rejenerasyonunda görevli genler ifade olur.
Sinir uyarımı	Bu aşamada sinirsel uyarım zorunlu değildir.
FAZ 2: GERİYE FARKLILAŞMA	
Geriye farklılaşma	Kök dokudaki hücreler, özelleşmiş karakterlerini kaybeder ve blastemayı oluşturmak üzere göç ederler.
Blastema oluşumu	Göç eden hücreler blastemayı oluşturur ve çoğalırlar
Gen ifadesinin uyarılması	Geriye farklılaşma için gerekli genler ifade olur, rejenerasyona özgü bir gen ifade profili vardır.
Sinir uyarımı	Bu aşamada sinir uyarımı kesintiye uğrar ise rejenerasyon gerçekleşmez.
FAZ 3: YENİDEN GELİŞİM	
Büyüme ve pattern (desen) oluşumu	Embriyonik gelişime benzer.
Gen ifadesinin uyarılması	Embriyonik gelişme sırasında gerçekleşen gen ifadesine benzer bir profil vardır.
Sinir uyarımı	Büyüme sinirsel uyarılara bağlıdır, fakat hücre farklılaşması sinir uyarılarından bağımsızdır.
Pozisyon bilgisi	Blastemayı oluşturan hücrelerin kökenine farklılaşması için pozisyon bilgisi gereklidir.

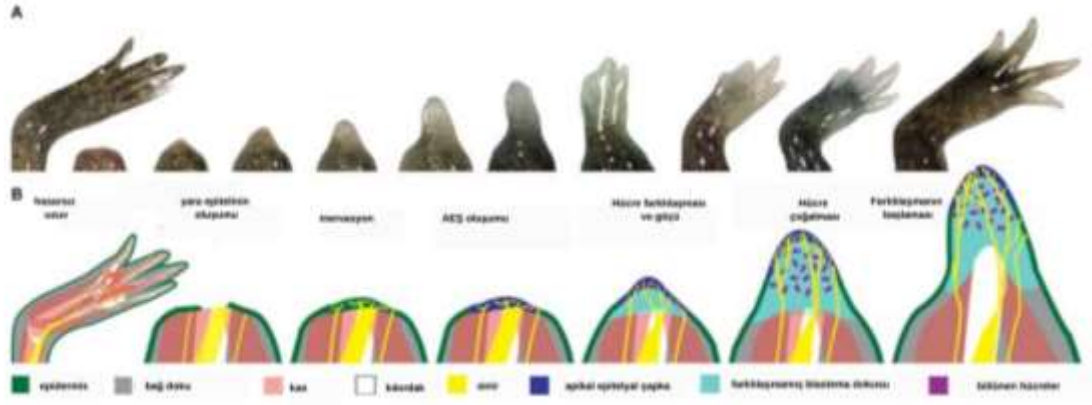
Başarılı bir rejenerasyon için şu aşamaların sırayla gerçekleşmesi gerekmektedir: yara iyileşmesi, blastema oluşumu, uzvun yeniden gelişmesi. (Şekil 4.2.3. 1)

a-) Yara İyileşmesi: Hasardan sonraki birkaç saatte, yara etrafındaki epitelyum kaynaklı keratinositler göç eder ve su alıp şişerek yara yüzeyini kapatır. Bu aşama yara iyileşmesi olarak adlandırılmaktadır (Bryant et al. 2002) (Ferris et al. 2010).

Yara iyileşmesi evresinde gerçekleşen dört önemli olay vardır: kan pıhtısının oluşması (fibrozis), bağışıklık sistemi hücrelerin yara bölgesine göçü (infiltrasyon), hücre dışı matriks (HDM) yıkımı ve yara epidermisinin oluşumu.

Yara epiteli 4-12 saat arasında oluşmaktadır. Yara bölgesi kan pıhtısı oluşturularak kapatılır. Kan pıhtısı oluştuktan sonra kan damarları daralır, çevre dokulardan epidermal hücreler yara bölgesine göç eder ve sonunda yara epiteli oluşturulur. Aynı zamanda, doğal bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil ve makrofajlar, yara bölgesine göç ederek çeşitli büyüme faktörleri (TGF, FGF, CSF, HGF, ILGF) salgılayarak endotel ve fibroblast hücrelerini aktive ederek yara bölgesine çekerler. Böylece bağışıklık sistemi hücreleri hücresel proliferasyonu kontrol etmektedir. Yara iyileşmesi evresinde gerçekleşen önemli olaylardan biri de HDM yıkımıdır. Matriks metalloproteinaz (MMP) 'lar doku yıkımını sağlamaktadır. MMP ler; makrofajlar, osteoklastlar ve kondrositler tarafından salınan proteazlar (protein parçalayan enzimler)'dir. Stump (kök) dokudan hücre proliferasyonunu ve penetrasyonunu kolaylaştırmak için dokuda bulunan kollajen liflerin yıkımını sağlarlar. Böylelikle dokuyu yeniden şekillendirmektedir. Yara epiteli bu olayların sonunda morfolojik olarak ve gen ifadesi bakımından değişimlere uğrar ve kalınlaşarak apikal epitelyal baklığı (AEB)yı oluşturur (Han et al. 2005).

Rejenerasyonun erken aşamalarında gerçekleşen sinyalleşmeler önemlidir. Örneğin yara epitelinden salınan Aksolotl MARCKS-like protein hasarsız uzuvda hücre proliferasyonunu indükler (Sugiura et al. 2016). FGF Wnt gibi sinyal yollarının aktivasyonu da uzuv rejenerasyonu için gereklidir (Mccusker, Bryant, and Gardiner 2015).



Şekil 4.2.3. 1 (A) Aksolotl uzuv ampütasyonu sonrası blastema oluşum ve gelişim safhaları. (B) Soldan sağa doğru ampütasyon sonrası 1. gün, 7. gün, 9. gün, 11. gün, 13. gün, 15. gün, 17. gün, 21. gün, 25. gün ve 31. günlerde görülen blastema gelişimi (Ferris et al. 2010).

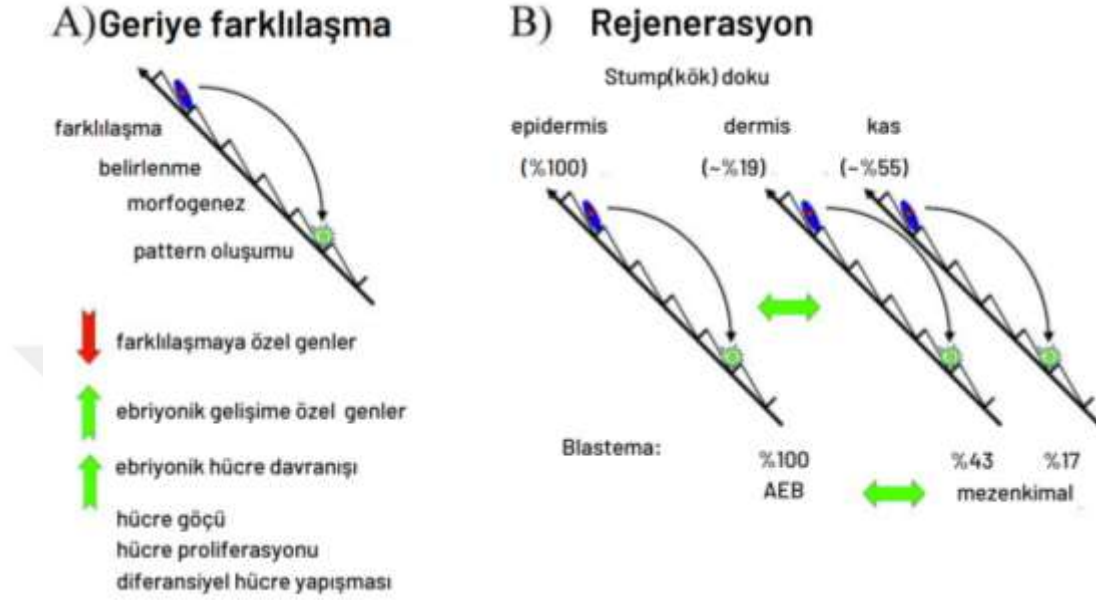
b-) Blastema Oluşumu: Başarılı bir rejenerasyon için blastema oluşumu önemli ve gereklidir.

Blastema dokusu rejenerasyona özgü şeffaf bir doku olup uzvu oluşturacak olan öncül hücreleri barındırmaktadır. Blastema dokusu farklılaşmamış ve prolifer olabilen (çoğalabilen) mezenkimal hücrelerden oluşmaktadır (Ferris et al. 2010) (Knapp et al. 2013).

Kayıp uzvun yeniden oluşması için öncelikle embriyonik gelişime benzer bir durum yaratılır. Bunun için farklı konum bilgisine ve farklı kökene sahip hücreler önce geriye farklılaşıp prolifer olurlar, daha sonra uzuv yapısını oluşturmak için, yeniden farklılaşırlar. Prolifere olan blastema hücreleri yeniden farklılaşırken yine atasal kökenlerine farklılaşır (Autoradiographic 1961) (Anon 2012).

Stump (kök) dokuda bulunan hücreler farklılaşarak blastemayı oluşturan mezenkimal karakterde hücrelere dönüşürler. Blastema dokusu (Tweedell 2010) ampütasyon bölgesindeki hücrelerin geriye farklılaşması ile oluşur. Bu hücreler embriyonik özellikler gösterirler ve memeli embriyonik gelişiminde de eksprese olan bazı genleri eksprese ederler (Han et al. 2005). Kıkırdak, bağ doku ve kas hücreleri farklılaşmış özelliklerini kaybederek, hasar gören uzvu onaracak öncül hücreleri

oluştururlar. Bu hücreler blastemayı oluşturmak için çoğalırlar daha sonra farklılaşarak kayıp uzuv yapısını oluştururlar (Kragl et al. 2009).



Şekil 4.2.3. 2 Geriye farklılaşma ve rejenerasyon olaylarında hücre farklılaşmasının karşılaştırılması (Han et al. 2005).

Blastema oluşumu için; yeterli sinir desteği (Singer 1974), yara epiteli oluşumu (Wallace et al. 1981), farklı konum kimliklerine sahip bağ doku orjinli hücreler gereklidir (Bryant, French, and Bryant 1981). Yara epiteli ile sinir hücreleri arasındaki sinyalleşme, rejenerasyon boyunca gerçekleşir ve rejenerasyonu gerçekleştirecek hücrelerin göçü için önemlidir. Farklı pozisyon bilgisine sahip hücreler ise pattern oluşumunun doğru gerçekleşmesini sağlar.

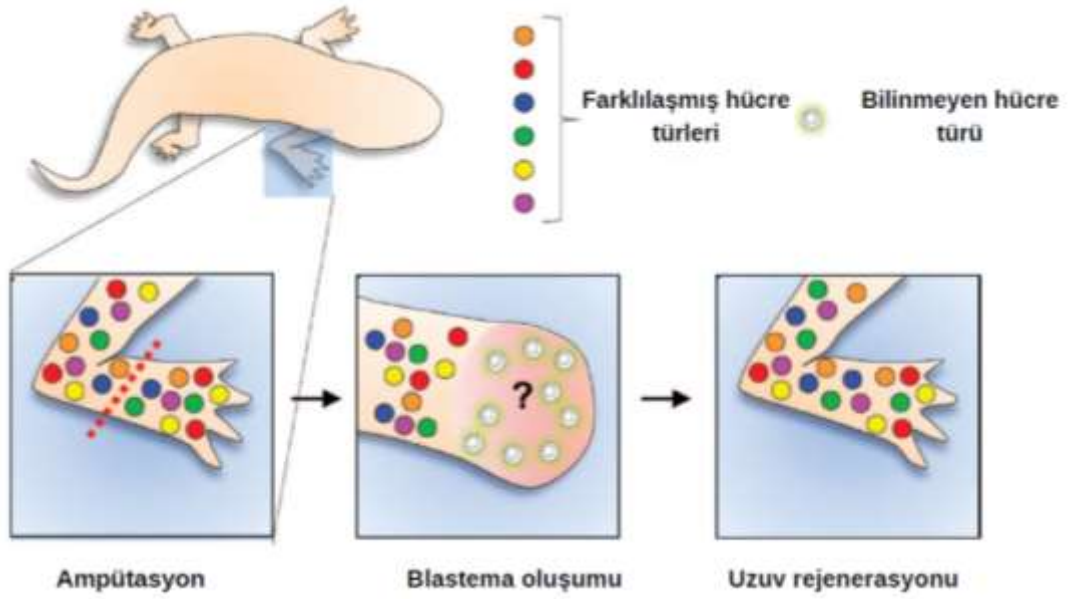
Yara kapandıktan sonra yara epitelinin morfolojisinde ve gen ifadesinde (Christensen, Weinstein, and Tassava 2001) apikal epitelyal başlığı (AEB) oluşturmak için bazı değişiklikler olur (Han et al. 2005). Takip eden günlerde sinir sinyalleri yara epitelini uyarır ve apikal epitelyal başlığı oluşturur (Singer and Inoue 1964). AEB, uzuv mezankimal hücrelerin morfogenezini yönlendirir. Böylece erken blastema oluşumu için bağ doku fibroblast hücrelerinin göç etmesini sağlayacak

sinyaller üretilmiş olur. Bu hücreler yara epiteli altına göç ederler ve geriye farklılaşırlar. Daha sonra amputasyon bölgesinin distalinde birikerek blastema dokusunu oluştururlar (Namenwirth 1974). Ayrıca stump (kök) dokudaki hücrelerin gen ekspresyonları da değişir, yaraya göç ederler blastemayı oluştururlar (Singer and Inoue 1964).

4.2.4 Blastema Hücrelerinin Kökeni

Yetişkin aksolotl ön veya arka ayakları sinir doku (nöral), kas doku (miyojenik), bağ doku ve epidermal kökenli farklı hücre tipleri barındırır. Amputasyondan sonra, amputasyon bölgesinin yakınındaki hücreler blastema dokusunu oluşturmak üzere yara bölgesinde toplanırlar. Bağ doku hücreleri; kemik, kıkırdak, tendon, iskelet zarı ve fibroblastlar olup, blastemaya en çok katkıda bulunan hücrelerdir. Ayrıca rejenerasyon için gerekli faktörleri de bu hücreler sentezleyebilirler.

Bağ doku hücreleri, erişkin karakterlerini kaybederek blastemanın multipotent karakterde öncül hücrelerine dönüşürler (**Şekil 4.2.4. 1**). 2009 yılında yapılan bir çalışmada blastemaya katkıda bulunan hücrelerin sınırlı potansiyele sahip öncül hücrelere dönüştüğü bulunmuş, blastema için de sınırlı öncül hücrelerin bir havuzu tanımlanmıştır (Kragl et al. 2009). Erişkin bağ doku hücreleri, blastemaya en az %20 oranında katkıda bulunurlar. Bağ doku hücreleri yeniden farklılaşırken yine bağ doku kökeninden olan hücrelere farklılaşırlar yani multipotent bağ doku öncül hücreleri karakterlidirler (Gerber et al. 2019).

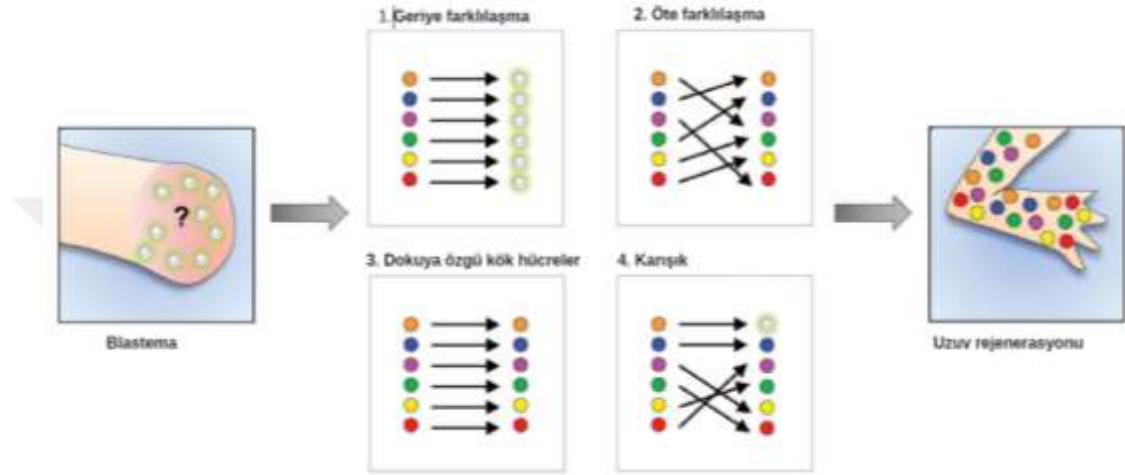


Şekil 4.2.4. 1 Uzun rejenerasyon süreci. Ampütasyonun ardından, uzvun yenilenmesini sağlayan, çoğalan hücrelerden meydana gelen blastema yapısının oluşumu gerçekleşir. Blastemaya katkı sağlayan hücreler uzun süredir tartışılmaktadır (Montoro and Longaker n.d.).

Blastema hücrelerinin kökeni üç ana kaynak olabilir: stump (kök) dokuda bulunan hücrelerin kök/öncül hücrelere geri farklılaşması (dediferansiyasyon), stump hücrelerinin köken kısıtlı olarak proliferasyonu ve farklılaşması (transdiferansiyasyon), dokuya özgü kök hücreler (Şekil 4.2.4. 2). Farklı canlılarda rejenerasyon sürecinde bu kök hücre kaynaklarından yalnızca birinin varlığından ziyade bu kök hücre kaynaklarının bir birleşiminin gerçekleştiği düşünülmektedir (Montoro and Longaker n.d.). Newt ile yapılan bir çalışmada kol dokusunda bulunan kas sinir ve bağ doku hücrelerinin geri farklılaşması ile blastema dokusunun oluştuğu gösterilmiştir (Autoradiographic 1961).

Blastemayı oluşturan hücrelerin çoğunluğu deri fibroblastlarıdır, bunlar sinir ve kas rejenerasyonuna katkıda bulunmazlar. Aksine nöral kök hücreler kas kıkırdak sinir rejenerasyonuna katkıda bulunurlar (Fox 1986). Sandoval-Guzman ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre (2014) newt kol rejenerasyonunda miyofiberler geri farklılaşırken, aksotl rejenerasyonunda miyofiberler değil, Pax7+ satellit hücreler limb rejenerasyonun katkıda bulunur (Wang et al. 2014). Amputasyon sonrasında

koldan kemikler çıkarılarak oluşturulan bir deney düzeneğinde kolun tam rejenerasyonunun gerçekleştiği, iskelet elemanları dışındaki hücrelerin kemik dokuyu oluşturabildikleri gösterilmiştir. Kıkırdak hücrelerinin kası oluşturmadığı, kas hücrelerinin kıkırdak ve epidermisi oluşturmadığı da gösterilmiştir. Özetle, rejenerasyon sırasında hücrelerin sahip olduğu pozisyon bilgisi dokuya özgüdür (Kragl et al. 2009).



Şekil 4.2.4. 2 Blastema oluşumu için sunulan teorilere genel bakış. Blastemayı oluşturan hücreler, geriye farklılaşma, öte farklılaşma, dokuya özgü kök hücreler veya bu üçünün bir kombinasyonundan oluşabilir (Montoro and Longaker n.d.).

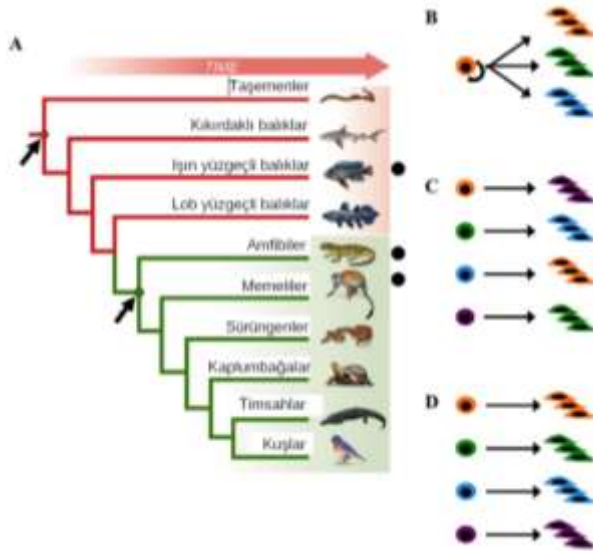
Blastema oluşumu, büyümesi ve gelişmesi için sinir sinyalleri gereklidir. Sinir ile Yara Epiteli / Apikal Epitelyal Başlık (YE/AEB) arasındaki ilişki belirli yollarda gen ifade değişimlerine neden olur (FGF (fibroblast growth factor), BMP (Bone Morphogenic Protein), Wnt Sinyal yolu.). Yara epiteli ile apikal epitelyal başlık arasındaki sinyalleşme sonucunda bazı olaylar gerçekleşir. Apikal epitelyal başlıktaki keratinositler dediferansiye olurlar. Bağ dokunun fibroblast hücreleri de mezenkimal hücreleri oluşturmak üzere farklılaşırlar. Blastema oluşumu için sinirler tarafından üretilen nörotrofik faktörler (nöropeptidler, organik moleküller, siklik nükleotidler, büyüme faktörleri biyoelektrik sinyaller) de gereklidir (Satoh et al. 2008).

Erken blastema oluşumu için, yara etrafındaki dermis hücreleri ve stump (kök) dokudan bağ doku hücrelerinin göç etmesi gerekir. Bu hücrelerin etrafındaki hücre

dışı matriks yıkıma uğrar. Bu hücre göçünü YE/AEB etkileşimi ile oluşan sinyaller kontrol eder. Göç eden bağ doku hücreleri ve dermisten gelen hücreler apikal epitelyal başlık altında birikir. Bu hücreler ve onların öncülleri farklı pozisyon bilgilerine sahiptir, böylece kaybolan uzuv yapısındaki farklı hücrelerin yerini alırlar (Endo, Bryant, and Gardiner 2004). Blastemayı oluşturmak için göç eden hücreler kök dokunun 1 mm gerisinden gelir. Bu nedenle 0. gün dokusu yara dokusunun 1 mm gerisinden toplanır. Bu farklılaşmamış hücreler amputasyon bölgesinin distalinde birikerek blastema dokusunu oluştururlar (Wallace et al. 1981).

3-)Yeniden Büyüme: Kaybolan dokuların rejenerasyonu blastema hücrelerinin distal eksen boyunca çoğalması ile gerçekleşir. Blastema hücresi çeşitli pozisyon bilgilerine sahiptir. Rejenere olmakta olan uzvun pozisyon bilgisine sahip hücreleri, uzvun farklı hücre türlerinin yerini alarak tamir uzuv oluşmasını sağlarlar (Taghiyar et al. n.d.).

Erken blastema hücreleri pozisyon bilgisine henüz ulaşmamışken geç blastema hücrelerinde bu bilgi artık sabittir (Gardiner et al. 1995). Rejenerasyonun geç aşamalarında gerçekleşen olaylar, memelilerdeki embriyonik gelişime yüksek oranda benzerlik gösterir (Anon n.d.).



Şekil 4.2.4. 3 Filogeni ile önerilen hücresel yolaklar

4.3 Mikrobiyom

Hayvanlar ve bitkiler; çeşitli türde bakteri, arke, virüs gibi mikrop toplulukları için konak canlılardır. Bu ortak yaşam hayvanların evrim sahnesine ilk çıktıkları andan itibaren başlamıştır (Mcfall-ngai et al. 2013). Bu organizmalarda yaşayan konakçıların hepsine birden mikrobiyota denmektedir. Bu mikroplar ile konak canlı arasında, konak canlının metabolizma, fizyoloji ve bağışıklık sistemini etkileyen simbiyotik (ikili yaşam) ilişkiler vardır (Sommer and Bäckhed 2013) (The et al. 2013).

İnsan bağırsak mikrobiyotası farklı mikroorganizma türlerinden oluşmuş olup bu mikro canlılar hem birbirleri hem de konak canlı ile etkileşim halindedirler. İnsan bağırsak mikrobiyotasının sahip olduğu gen sayısı insan genomundan yüz kat fazladır. Mikrobiyomun konak canlıdan farklı olarak gerçekleştirdiği gen ifadesi konak canlının birçok hayati işlevin gerçekleştirilmesinde aracılık eder (Ley et al. 2005).

Mikroplar salgıladıkları metabolitler aracılığı ile konak canlının çeşitli fonksiyonlarını etkilerler. Örneğin *D. melanogaster* bağırsağında yaşayan bakteriler farklı koşullar altında farklı metabolitler üreterek canlı gelişimini olumlu veya olumsuz etkiler (Sannino, Dobson, and Edwards 2018).

Mikroplar konak canlının yaşamını birçok biyolojik işlev yönünden etkileyebilir. İnsan bağırsağında yaşayan bazı bakteriler bazı polisakkaritleri metabolize ederek asetat, bütirat, propiyonat gibi kısa zincirli yağ asitleri üretirler. Bu ürünler dolaşıma geçerek birçok sisteme etki gösterir. Bu yolla ise; konağa karbon kaynağı ve enerji sağlarlar, sinir sistemini etkilerler, dolaşıma katılarak hormon benzeri işlevler sergilerler, vücutta üretilmeyen esansiyel vitaminleri ve aminoasitleri üretirler (Ley et al. 2005). Ayrıca bağırsak mikrobiyomundaki bakteriler konak bağırsak epitelinin ve bağışıklık sisteminin farklılaşımını sağlayarak fırsatçı patojenler için bir koruma sağlar. Böylelikle doku iç dengesinin (homeostaz) korunmasını sağlarlar (Sommer and Bäckhed 2013) (Mcfall-ngai et al. 2013).

Bağırsak mikrobiyotası bağırsağın yerli mikroplarını tolere eden ve patojen bakterilerden koruyan aktif bir bariyer olarak iş görür. Sağlıklı bağırsak mikrobiyotası konak için yararlıdır. Patojen bakteriler yerli bağırsak mikrobiyotası ile yarışarak ve sağlıklı dengeyi değiştirerek inflamatuvar hastalıklara neden olurlar (Hardt 2008). Ayrıca bağırsak mikrobiyotası bağırsak kök hücre aktivitesini düzenleyerek bağırsak epitel hücrelerinin yenilenmesini kontrol eder (Mcfall-ngai et al. 2013) (Rakoff-nahoum et al. 2004). Bağırsak epitel hücrelerinin yenilenmesinde, bağırsak mikrobiyotasının ürettiği metabolitlerin önemli katkıları vardır. Bağırsak mikroorganizmaları, kompleks karbonhidratları parçalayarak kısa zincirli yağ asitlerini üretirler. Bu metabolitlerden laktik asit, bağırsak kök hücre çoğalmasını ve bağırsak rejenerasyonunu destekler, bütirat ise bağırsak epitel hücreleri için enerji kaynağıdır.

Konak üzerindeki çeşitli etkilerinin anlaşılmasından sonra mikrobiyotaya mikrobiyal organ, ikinci beyin gibi isimler verilmiştir (Ley et al. 2005).

4.3.1 Farklı canlıların metamorfoz ve rejenerasyon süreçlerine mikrobiyomun etkisi

Birçok hayvanın gelişimi veya davranışı, çevresel sinyallerden, özellikle de bakteri kaynaklı sinyallerden etkilenir (Mcfall-ngai et al. 2013). İki yaşamlı canlıların vücudunun metamorfoz sırasında uğradığı değişimler için de mikroorganizmaların rolü önemlidir.

Deniz omurgasız canlılarının larvaları, bakteri kaynaklı sinyaller ile beslenme metamorfoz ve büyümeleri için uygun bir ortama yerleşirler. Örneğin *Hydroides elegans* metamorfozunun belirli bir yüzeyden gelen bakteri kaynaklı sinyallere bağımlı olduğu bulunmuştur (Vijayan et al. 2019).

Yapılan çalışmalar, mikrobiyomun konak canlı metamorfozunun tamamlanmasını etkileyebildiğini göstermiştir. Holometabolik böcek türlerinde metamorfoz sırasında mikrobiyom değişir. Bu türlerde, simbiyotik bakteriler devre dışı kalırsa bağırsak

mikrobiyomu patojen türler tarafından kolonize edilir ve konakçının ölümüne neden olur (Johnston and Rolff 2015).

Yara iyileşmesinde de benzer bir durum vardır. Diyabet, romatoid artrit gibi hastalıkların sonucunda bakteriyel invazyon riski artar ve sonuçta kronik yaralar gelişebilir. Bu yaralar bakteriler tarafından kolonize edilmiştir. Burada kolonize olan türler önemlidir. Bazı bakteri türleri yara iyileşmesine olumlu katkı sağlayabilir veya inflamasyonu artırarak yara iyileşmesini geciktirebilirler (Edwards and Harding 2004).

Kompleks bir işlem olan rejenerasyon sırasında gerçekleşen biyolojik yollara mikropların etkisi son yıllarda merak edilen bir konu olmuştur. Bakteriler ve onların ürettiği metabolitler, konak canlı fonksiyonlarını destekleyen veya engelleyen etkilere sahiptir. Bir yassı solucan türü olan, ver rejenerasyon yeteneğine sahip, *Dugesia japonica* üzerinde yapılan bir mikrobiyom çalışmasında, *Betaproteobacteria* sınıfında bulunan *Aquitalea* türü bakterilerin ürettiği bir metabolit olan indolün, *D. Japonica* rejenerasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Lee et al. 2018).

Mikrobiyota ve bağışıklık sistemi arasında sürekli bir etkileşim vardır. İmmün sistemin üyeleri patojen ve simbiyont mikroorganizmaları ayırt ederek patojenleri yok etmek zorundadır. Yakın tarihli bir çalışma, yassı solucanlarda enfeksiyon varlığında ve yokluğunda rejenerasyon başarısının farklı sonuçlandığını bildirmiştir. Memelilerde korunmuş bir yolak olan TAK1/MKK/p38 yolağı, *Pseudomonas* enfeksiyon varlığında apoptozu ve tetikler, sonuçta rejenerasyon baskılanır. Aynı biyolojik yolak normal rejenerasyon durumunda ise apoptozu engeller (Arnold et al. 2016).

Enfeksiyon ile tetiklenen apoptoz *C. elegans* organizmasında da gözlenmiştir. *Salmonella typhimurium* türü bakterilerin *C. elegans* bağırsağında kolonizasyonu sonucu üreme hücrelerinde hücre ölümü artmıştır (Aballay and Ausubel 2001).

4.3.2. Aksolotl metamorfozu öncesi ve sonrasında mikrobiyota profili

Yapılan çalışmalar, mikrobiyotanın rejenerasyon sürecine olumlu veya olumsuz etki edebileceğini göstermiştir.

Aksolotl mikrobiyota profili semenderlerin mikrobiyota profiline benzerlik göstermekte olup, beş temel sınıfın türlerini baskın olarak içerir: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* *Actinobacteria*. Metamorfoz sonrası aksolotlda *Proteobacteria* sınıfı bakteriler artış göstermiştir. Bu şubeye ait bakteriler genellikle patojen özellikleri ile bilinmektedir.

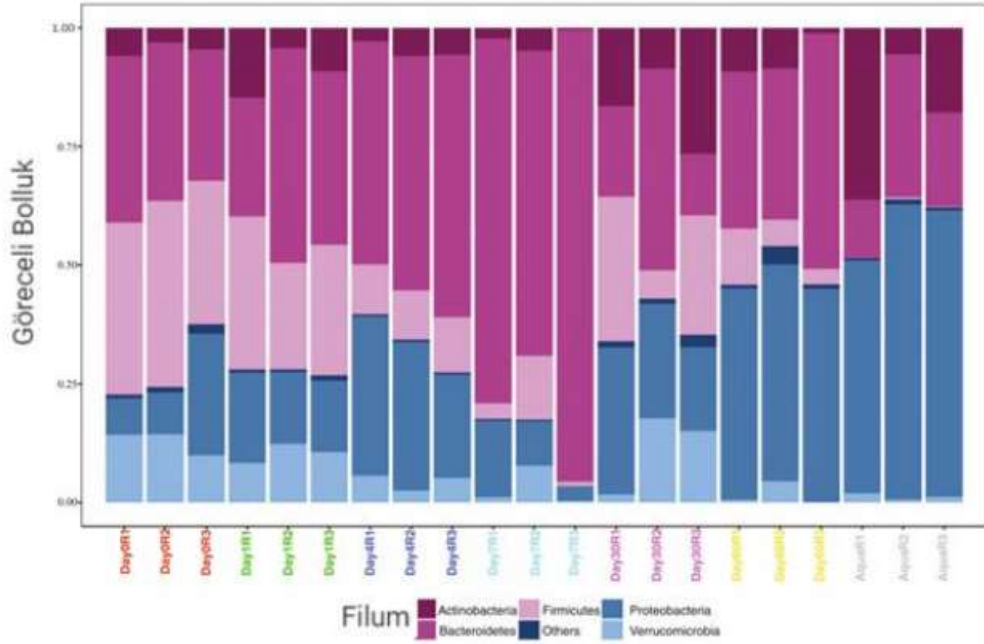
Aksolotl mikrobiyomu, metamorfoz ile birlikte değişir. Metamorfoz sonrası aksolotl bağırsağında goblet hücreleri artar ve daha kalın bir mukus tabakasının oluşur. *Akkermansia Munciphila* türü mikroorganizmalar müsin parçalayıcı özelliği ile bilinen simbiyotik bir türdür. Bu türün bolluğu neotenik bağırsak dokusunda %9 iken metamorfik bağırsak dokularında %16 oranlarına yükselmiştir. Bu da daha kalın bir mukus tabakası gözlemi ile tutarlıdır. Aksolotl bağırsağı gerçekleşen bu yapısal değişiklikler ile beraber mikrobiyota profili açısından da değişime uğrar. Metamorfik aksolotl bağırsağında tür çeşitliliği azalırken metamorfoz öncesi duruma benzerlik gösterir. Metamorfoz geçirmiş ve geçirmemiş aksolotlun deri mide bağırsak ve dışkı örnekleri karşılaştırıldığında; mikrobiyota bileşimi ve yapısında en fazla değişimin tespit edildiği organlar deri ve sindirim sistemi organlarıdır (Demircan et al. 2018).

Metamorfoz ile birlikte karasal yaşama adapte olacak olan canlıların mikrop topluluklarının da bu yaşama uyum sağlayacak şekilde değişmesi beklenen bir durumdur. Örneğin metamorfoz sonrası aksolotl derisinde *Pseudonocardia* türü bakterilerin çoğaldığı gözlemlenmiştir. Bu tür mikroorganizmalar antifungal özelliği ile bilinmekte olup, karasal hayatta patojenik mantarlara karşı konak canlıyı koruyarak simbiyotik bir birliktelik sağladığı düşünülmektedir (Demircan et al. 2018).

Aksolotlda metamorfoz sonrası değişen mikrobiyomun canlıların rejenerasyon yeteneğindeki azalma ile ilişkili olup olmadığı konusu merak edilen sorulardandır.

4.3.3 Aksolotl kol rejenerasyonunda mikrobiyota profili

Aksolotl kol rejenerasyonu sürecinde mikrobiyota büyük oranda değişime uğrar. Yapılan bir çalışmada kol rejenerasyonunun üç temel evresini temsil eden zaman noktalarında; yara iyileşmesi(1. gün), erken-geç blastema oluşumu (4. ve 7. günler), yeniden gelişim evresi (30. ve 60. günler), rejeneren olan kol dokusundan alınan örneklerin mikrobiyomu karşılaştırılmıştır. Bu zaman noktalarında alınan örnekler, 0. gün dokusu ile karşılaştırılarak mikrobiyom değişimi analiz edilmiştir. Yaşam ortamının bu değişime katkısını anlamak için de 0, 30 ve 60. günlerde su örnekleri toplanarak analize dahil edilmiştir (Şekil 4.3.3. 1)



Şekil 4.3.3. 1 Aksolotl rejenerasyonun farklı günlerinde alınan örneklerin filum düzeyinde taksonomik çeşitlilik (De et al. 2019)

Biyoinformatik analiz sonuçları, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* ve *Verrucomicrobia* şubelerinin alınan örneklerde baskın olarak bulunduğunu ortaya çıkarmıştır. Su örneklerinde ve rejenerasyonun farklı evrelerinde, baskın şubeler değişmiştir. Rejenerasyonun üç ana evresi de kendine has bir mikrobiyom profili sergilemektedir. Ayrıca su örnekleri deney gruplarından tamamen ayrılarak bağımsız bir mikrobiyal çeşitlilik göstermiştir. Bu da doku

örneklerinin gösterdiği değişimin yaşam ortamından kaynaklanmadığını, rejenerasyona özgü bir değişim sergilediği hipotezini güçlendirmektedir.

Deney gruplarında her zaman noktasında bulunan replikalar kendi içerisinde kümelenerek anlamlı bir ayrım göstermiştir. 0. günde ve yara iyileşmesi evresinde *Firmicutes* şubesinin zenginleştiği *Proteobacteria* şubesinin azaldığı gözlenirken; Blastema oluşumu ve yeniden gelişim evresinde *Firmicutes* şubesinin azalmış, *Proteobacteria* şubesinin zenginleşmiştir. *Actinobacteria* şubesi yeniden gelişim evresinde zenginleşmiştir (De et al. 2019).

4.3.4. Mikrobiyal çeşitlilik analizlerinin gerçekleştirilmesi

Farklı koşullar altında değiştiği düşünülen mikrop toplulukları, örnekteki bakteriyel 16S rRNA geni çoğaltılarak ve sonrasında sekanslayarak tespit edilebilmektedir (Caporaso et al. 2010).

Bir örnekteki mikroorganizmalar birkaç yöntem ile tespit ve tayin edilebilir. Mikroorganizmaların kültür şartlarında çoğaltılması bu yöntemlerden biridir. Bu yöntemde, örnekte bulunan türlerin tespiti için bakteri kültürü yapılır. Sonuçta çoğalan mikroorganizmalar morfolojik ve fenotipik yöntemlerle tanımlanabilir (Iii 2004). Bu yöntemin en büyük dezavantajı örnekte bulunan tüm mikroorganizmaların büyütülmesi için uygun ortam şartlarının oluşturulamaması ve çoğu türlerin gözden kaçmasıdır (Baker, Smith, and Cowan 2003) (Sttger 1989).

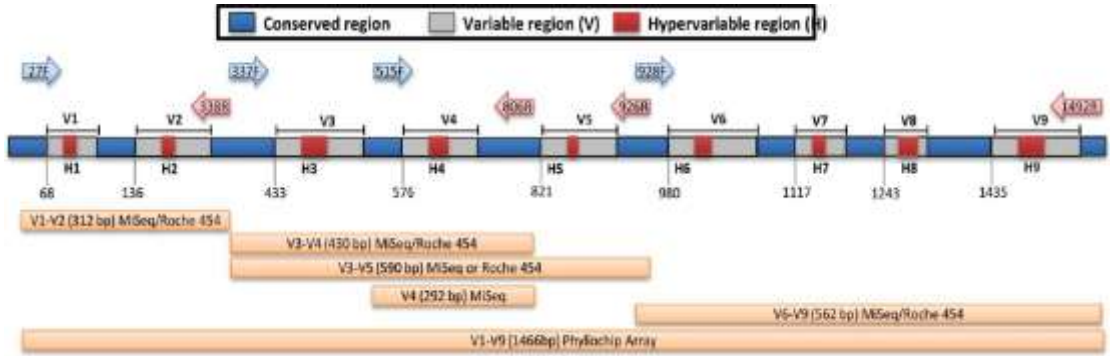
1980'lerde bakterileri tanımlamak için yeni bir standart geliştirilmiştir. Bu yöntem, farklı genomların evrimsel akrabalıklarını tespit edebilmek için hepsinde ortak fonksiyona sahip bir makromolekülün sekans dizisinin karşılaştırılması temeline dayanır. Bunun için en uygun adaylar tRNA ve rRNA gen dizileridir (Grayl et al. 1984).

Filogenetik marker genlerin çoğaltılıp sekanslanması yöntemi ile bir örnekte az miktarda bulunan türler bile tayin edilebilmektedir. Bu filogenetik marker genler;

16S rDNA(ribozomal ribonükleik asit) (prokaryotik canlıların tespiti için) ile 18S rDNA ve ITS (ökaryotik canlıların tespiti için) sekanslarıdır. Bu genler farklı türler arasında korunmuş diziler içerdiğinden, sekans benzerliği karşılaştırılarak akrabalık seviyeleri belirlenebilir. Bahsedilen marker gen bölgeleri temelde iki ana bölgeye sahiptir: korunmuş bölgeler ve hiper değişken bölgeler. Korunmuş bölgelere uygun evrensel oligonükleotidler tasarlanıp çoğaltılır (Lu et al. 2000). Hiper değişken bölgeler ise yakın akraba türlerin evrimsel yakınlığını belirlemek için kullanılır (Peer et al. 1996).

Tüm yaşam formlarında ortak olarak bulunan ribozomal alt birimleri kodlayan gen parçalarının karşılaştırılması ile filogenetik akrabalıklar gösterilebilir. Bakteriler için bu yöntemde hedeflenen gen bölgeleri; 5S, 16S ve 23S rDNA sekanslarıdır. En sık kullanılan marker gen ise 16S rDNA'dır (Iii 2004).

16S rDNA bakteri ribozomunun küçük alt birimini kodlayan gen bölgesidir. Bakteri 16S rDNA gen bölgesi dokuz adet (V1-V9) hiper değişken bölge içerir (Şekil 4.3.5. 1) (Peer et al. 1996). Bu gen bölgesi farklı bakteri türleri arasında sekans çeşitliliği gösterir ve sekans benzerliği/benzemezliği karşılaştırılarak tür tanımlaması için kullanılır (Chakravorty et al. 2008).



Şekil 4.3.4. 1 16S rRNA geninin korunmuş (mavi) değişken (gri) hiperdeğişken bölgeleri ve bu bölgeleri çoğaltmak için kullanılan primerler (Shahi, Freedman, and Mangalam 2017)

16S rDNA gen bölgesi korunmuş, yarı-korunmuş ve değişken bölgeler içerir. Korunmuş bölgeler bitişik olmayan dokuz bölgeden oluşur (Grayl et al. 1984) (Sttger 1989). Bu gen bölgeleri filogenetik marker genler olarak adlandırılır. Türe özgü veya evrensel primerler ile bu gen bölgeleri çoğaltılır (Sttger 1989). Korunmuş bölgelerin etrafında hiper değişken bölgeler vardır. Korunmuş bölgeler PCR primerleri ile hedeflenerek, filogenetik sınıflandırma için kullanılacak değişken bölgeler çoğaltılır (Chakravorty et al. 2008) (Baker et al. 2003). Yeni nesil sekanslama teknolojilerinin geliştirilmesinden sonra mikrobiyom çalışmalarını büyük bir ivme kazanmıştır. Diğer dizileme teknolojilerine göre daha ucuz ve hızlı olması bu teknolojinin avantajlarından. Yeni nesil sekanslama işleminin üç temel adımı vardır: kütüphane hazırlığı, kütüphane sekanslanması, verilerin analiz edilmesi.

Ayrıca marker gen dizilemesi dışında metagenomiks adı verilen bu yöntem ile bir örnekteki tüm mikrop genomlarının sekanslanması da mümkündür (Knight et al. 2018).

4.4. Transkriptom

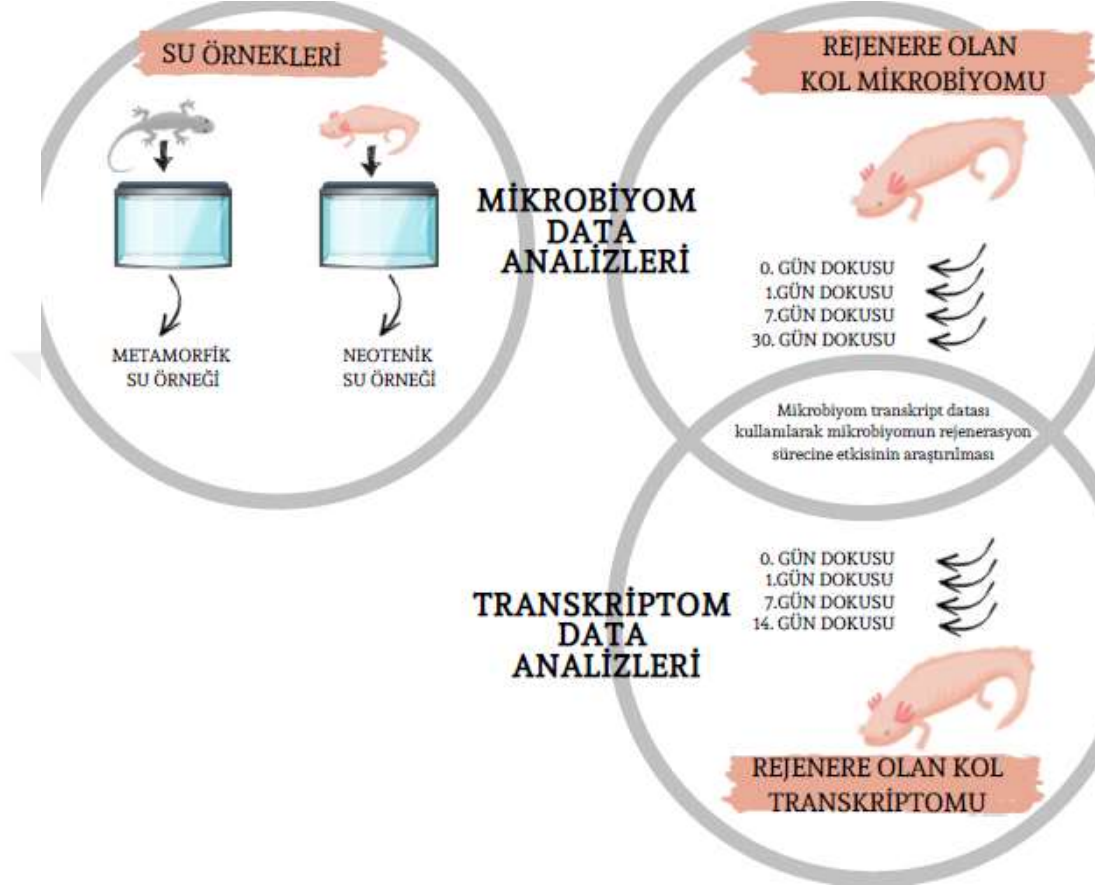
Mikrobiyota profillerinin daha iyi anlaşılması ve fonksiyonel yollarla daha doğrudan ilişkilendirilmesi için tamamlayıcı bazı yaklaşımlar önerilmiştir (Bryant et al. 2017). Bu metotlar mikrobiyotaya ek olarak bazı diğer omik analizlerin uygulanmasına dayanmaktadır (Gerber et al. 2019). Aksolotl rejenerasyonu karmaşık bir biyolojik süreç olduğundan, altında yatan genetik, moleküler ve hücresel mekanizmaların daha iyi anlaşılması için bütüncül yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. RNA sekanslama yöntemi, mikrobiyomun gen ifadesi ve fonksiyonel transkripsiyonel aktivitesi hakkında bilgi edinmek amacıyla için kullanılan bir yöntemdir (Knight et al. 2018). Konakçının (bu tezde aksolotl'un) genomuna dayalı gen ifadesi yani aksolotl transkriptomu da oldukça önemli bir bilgi kaynağıdır. Daha önce bu alanda mikrobiyotadan bağımsız olarak sadece gen ifade profilini hedefleyen bazı çalışmalar yapılmıştır (Bryant et al. 2017; Gerber et al. 2019; Voss et al. 2015). Bunun yanında aksolotlda ne rejenerasyon, ne metamorfoz bağlamında

mikrobiyota ile konakçı transkriptomunun beraber araştırılması daha önce yapılmamıştır. Bu yönden bu tezdeki yaklaşım yenilikçi bir yol izlemektedir.

RNA sekanslanma yöntemi, mikrobiyomun gen ifadesi ve fonksiyonel transkripsiyonel aktivitesi hakkında bilgi edinmek amacı için kullanılan bir yöntemdir (Knight et al. 2018). Transkriptom analizinde genelde şöyle bir iş akışı izlenir: ilgilenilen dokudan total RNA izolasyonu yapılır, mRNA molekülleri toplam RNA'dan ayrılır. mRNA parçalara ayrılır, cDNA sentezlenir, uçlarına adaptör diziler eklenerek çoğaltılır ve kütüphane oluşturulur. Daha sonra kütüphane sekanslanır. Okumalar referans genomla eşlenir, eksprese edilen genler, eşlenen sekans okumalarına göre tanımlanmış olur (Giannoukos et al. 2012). Bu çalışmada da hedeflenen veri setine ulaşmak için benzer bir yol izlenmiştir.

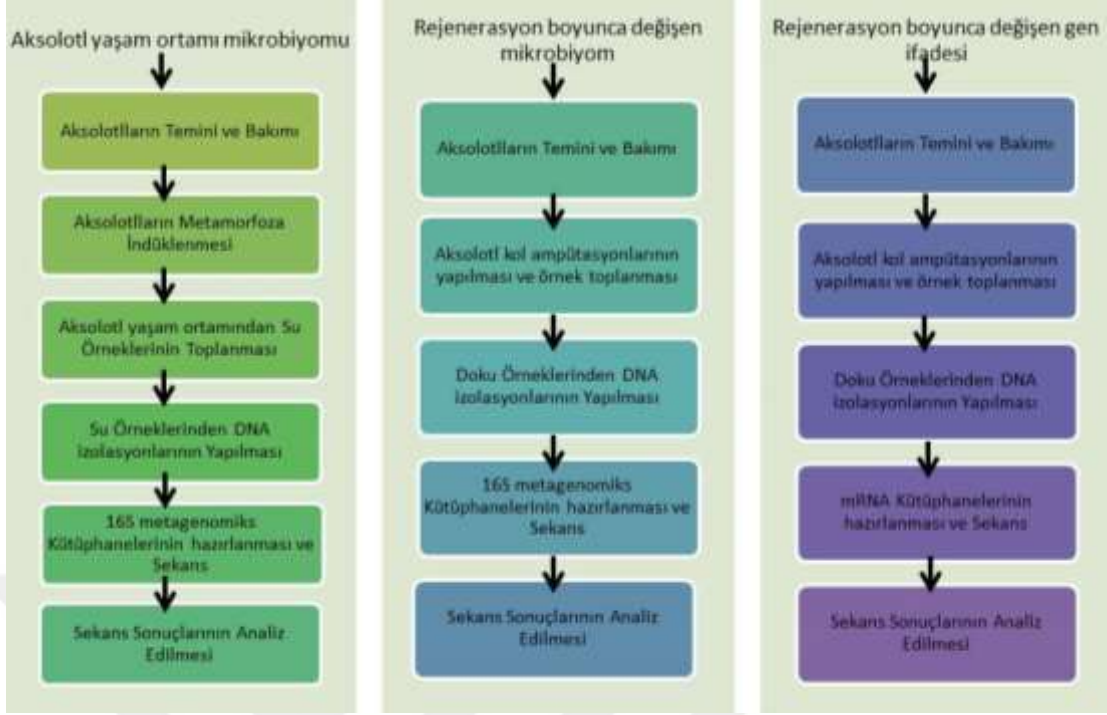
5. MATERYAL VE METOT

Bu tez çalışması boyunca izlenen deney planı Şekil 5.1’de özetlenmiştir.



Şekil 5. 1 Deney dizaynının şema ile özeti

Çalışmada kullanılan yöntem üç ana başlıkta toplanabilir; aksotl yaşam ortamı mikrobiyomu, rejenerasyon boyunca değişen mikrobiyom ve rejenerasyon boyunca değişen gen ifadesi (Şekil 5.2)



Şekil 5. 2 Deney basamaklarının şema ile açıklanması

5.1. Aksolotl Yaşam Ortamı Mikrobiyomu

5.1.1 Aksolotlların Temini Ve Bakımı

Bu çalışma İstanbul Medipol Üniversitesi Sağlık Bilim ve Teknolojileri Araştırma Enstitüsü (SABITA)'de gerçekleştirildi. Yapılan deneysel çalışma için 38828770-604.01.01-E.6808 sayı ile İstanbul Medipol Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan onay alındı.

Çalışma kapsamında toplamda 18 adet vahşi tip aksolotl kullanıldı. 18 hayvandan 9'u metamorfoza indüklenirken 9'u neotenik halde bırakıldı. Deneylerde kullanılan aksolotllar Ambystoma Genetic Stock Center (AGSC)'den getirilmiş olup İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Merkezi'nde çoğaltıldı. Deneylerde kullanılan hayvan grubu, herhangi bir uzvu daha önceden hasar görmemiş olan 8 aylık kardeşlerden oluşturuldu.

18 aksolotl, bir akvaryumda bir hayvan olacak şekilde Holtfreter's solüsyonunda, yaklaşık 20 °C oda sıcaklığında muhafaza edildi. Aksolotllar 12 saatlik karanlık aydınlık döngüsü sağlanarak muhafaza edildi. Holtfreter's solüsyonu haftada bir defa değiştirildi. Hayvanlar üç günde bir JBL novolotl marka pellet yem kullanılarak beslendi. Çalışma başlangıcından sonuna dek, hayvanların mikrobiyotasını değiştirecek tüm etkenlerden (antibiyotik uygulaması vs.) kaçınıldı.

Holtfreter's solüsyonu; 3.46 gram NaCl, 0.05 gram KCl, 0.1 gram CaCl, 0.2 gram NaHCO³ tuzlarının bir litre distile su içinde çözündürülmesi ile hazırlandı (Mead 2005).

5.1.2. Aksolotlların Metamorfoza İndüklenmesi

Deneylede kullanılacak 9 neotenik aksolotl rastgele seçildi. Metamorfoza indüklemek için Sigma- T2376 marka Tetraiodo-L-thyronine(T4) ile 100 uM'lık bir stok çözelti hazırlandı (Page et al. 2007). Hayvanların suyu totalde 50 nM hormon içerecek şekilde haftada 3 kez değiştirildi. Deri değişiminin başlaması, deri kalınlaşması, kilo kaybı, solungaç kaybı ve kuyruk incilmesi parametreleri gözlemlendiğinde metamorfoza indükleme işlemi sonlandırıldı. Hormon verme işlemi tamamlandıktan sonra deneylede kullanılacak olan su örnekleri toplandı.

5.1.3. Neotenik ve metamorfik hayvanların yaşam ortamlarından su örneklerinin toplanması

Neotenik ve metamorfik aksolotlların yaşam ortamı olan akvaryum suları haftada üç kez değiştirildi. Deneylede kullanılan su örnekleri su değişiminden üç gün sonra toplandı. 9 farklı neotenik aksolotl akvaryum suyundan 50'şer ml su örneği toplandı. 9 farklı metamorfik aksolotl akvaryum suyundan da yine 50'şer ml su örneği toplandı. Örnekler toplanırken hayvan kaynaklı deri dışkı gibi materyallerin

alınmamasına özen gösterildi. Su örnekleri filtre kâğıdı yardımı ile süzüldü, DNA izolasyonu yapılmaya kadar +4 °C’de muhafaza edildi.

5.1.4. Su Örneklerinden DNA ve RNA İzolasyonlarının Yapılması

9 adet neotenik aksotl su örneği +4 °C’de 6000 g’de santrifüj edildi. Üst faz 1 ml sıvı kalana kadar atıldı. Alta çöken pellet bırakılan 1 ml su ile çözüldü. Üç adet su örneği birleştirildi ve bir replika oluşturuldu. Bu şekilde toplamda üç adet neotenik su örneği oluşturuldu.

9 adet metamorfik aksotl su örneği +4 °C’de 6000 g’de santrifüj edildi. Üst faz 1 ml sıvı kalana kadar atıldı, alta çöken pellet bırakılan 1 ml su ile çözüldü. Üç adet su örneği birleştirildi ve bir replika oluşturuldu. Bu şekilde toplamda üç adet metamorfik su örneği oluşturuldu.

Sonraki aşamalarda OIAGEN kan ve doku kiti kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

DNA İzolasyonu: OIAGEN DNeasy kiti kullanılarak üreticinin verdiği aşağıdaki protokol uygulandı, özetle:

Su örneği üzerine 180 µL ATL solüsyonu ve 20 µL proteinaz K solüsyonu eklendi. Tüpler 56 °C ’de ara ara vorteks yaparak tamamen çözülene kadar inkübe edildi. Doku tamamen çözününce 200 µL AL solüsyonu eklendi ve tekrar vortekslendi. 200 µL %96’lık etanol eklendi ve tekrar vortekslendi ve solüsyon kolonun takılı olduğu yeni tüpe aktarıldı. 8000x g’de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü değiştirildi. Kolona 500 µL AW1 solüsyonu eklendi. 8000x g’de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü değiştirildi. Kolona 500 µL AW2 solüsyonu eklendi. 20000x g’de 3 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü değiştirildi. Kolona 200 µL AE solüsyonu eklendi, 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 14000x g’de 1 dakika santrifüj edildi. DNA konsantrasyon ve saflık ölçümleri NanoDrop cihazında yapıldı.

5.1.5. 16S Metagenomics Kütüphanelerinin Hazırlanması ve Dizi Analizi

16S geninin V3-V4 bölgesini çoğaltmak amacıyla aşağıdaki primerler kullanıldı:

16S_F: 341 F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3')

16S_R: 805 R (5'- GACTACHVGGGTATCTAATCC -3')

Forward ve reverse primerlerin ucuna Miseq dizileme adaptör dizileri de eklendi.

İzole edilen DNA örneklerinden 16S primerleri kullanılarak metagenomik kütüphaneleri oluşturuldu. Bioline marka MyTaq DNA polimeraz enzimi üretici firmanın protokolü takip edilerek kullanıldı. Bu çoğaltma işlemi için aşağıdaki karışım hazırlandı (Tablo 5.1.15. 1):

Tablo 5.1.5 1 Polimeraz zincir reaksiyonu

Reaksiyon içeriği	Miktar
gDNA	Reaksiyon hacminde 100 ng
5X MyTaq Buffer	5 ul
Forward primer	1 ul
Reverse primer	1 ul
Enzim	1 ul
NFW	Reaksiyon hacmi toplamda 15 ul olacak şekilde

Polimeraz zincir reaksiyonu(PZR) döngü düzeni şu şekilde yapıldı:

95 C'de 3 dakika

95 C'de 30 saniye

55 C'de 30 saniye

72 C'de 30 saniye

72 C'de 5 dakika



Elde edilen PZR ürünlerinin büyüklüğü %1'lik agaroz jel elektroforezine yüklenerek kontrol edildi. 400-500 bp arası bantlar jelden kesilerek, Agencourt AMPure XP Saflaştırma Sistemi (Beckman Coulter) ile saflaştırıldı.

Kütüphane hazırlığının bir sonraki adımı olarak çoğaltılan 16S rDNA dizilerine barkod dizileri eklendi. Bu amaçla ikinci bir PZR gerçekleştirildi. Örneğe özgü barkod primerler ile her örnekte bulunan ampliconlar işaretlendi. İkinci PZR sonrasında da reaksiyon sonrası çoğaltılmış PZR ürünleri, %1'lik agaroz jelle yüklenerek agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. 400-500 bp arası bantlar jelden kesilerek, Agencourt AMPure XP Safıaştırma Sistemi (Beckman Coulter) ile safıaştırıldı. Temizlenen ampliconlar Illumina Miseq platformuna yüklenerek Miseq 300 siklus reaktif kiti(V3) kullanılarak dizileme yapıldı.

5.1.6. Sekans Sonuçlarının Analiz Edilmesi

Miseq paired end ham dizileme sonuçları analiz edildi. Ham okumalar öncelikle kalite kontrolden geçirildi. Nephela platformuna entegre QIIME yazılımı kullanıldı. FASTQ paired end pipeline yazılımı ile FASTQ kullanılıp kalite skoru 30'u geçen okumalar sonraki adımlarda kullanıldı. Bu kalite skorunu geçen okumalar QIIME açık referans analizi yöntemi ile birleştirildi. Bu veriler SILVA referans veri tabanında bulunan 16S sekansları ile karşılaştırılarak %97 benzerlik gösteren okumalar tanımlandı ve OTU'lar içine atandı. OTU seçilmesi ve sınıflandırılması için uCLUST algoritması ve PYNAST taksonomisi atandı. İleriki analizler için microbiome analyst programı kullanıldı ve alfa ve beta çeşitlilik analizleri gerçekleştirildi.

5.2. Rejenerasyon boyunca değişen mikrobiyom

5.2.1 Aksolotların Temini Ve Bakımı

Çalışma kapsamında toplamda 27 adet vahşi tip aksolotl kullanıldı. Deneylerde kullanılan aksolotllar Ambystoma Genetic Stock Center (AGSC)'den getirildi ve İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Merkezi'nde çoğaltıldı. Deneylerde kullanılan hayvan grubu, herhangi bir uzvu daha önceden hasar görmemiş olan 8 aylık kardeşlerden oluşturuldu.

27 aksolotl, bir akvaryumda bir hayvan olacak şekilde Holtfreter's solüsyonunda, yaklaşık 20 °C oda sıcaklığında muhafaza edildi. Aksolotllar 12 saatlik karanlık aydınlık döngüsü sağlanarak muhafaza edildi. Holtfreter's solüsyonu haftada bir defa değiştirildi. Hayvanlar üç günde bir JBL novolotl marka pellet yem kullanılarak beslendi. Çalışma başlangıcından sonuna dek, hayvanların mikrobiyotasını değiştirecek tüm etkenlerden (antibiyotik uygulaması vs.) kaçınıldı.

Holtfreter's solüsyonu; 3.46 gram NaCl, 0.05 gram KCl, 0.1 gram CaCl, 0.2 gram NaHCO³ tuzlarının bir litre distile su içinde çözündürülmesi ile hazırlandı (Mead 2005).

5.2.2. Aksolotlların Kol Ampütasyonlarının Yapılması ve Hayvanlardan Doku Örneklerin Toplanması

Deneyde kullanılacak hayvanlardan; kontrol grubunu temsil etmek üzere sıfırıncı gün dokusu, rejenerasyonun yara iyileşmesi aşamasını temsil etmek üzere 1. gün dokusu, rejenerasyonun erken blastema aşamasını temsil etmek üzere 7. gün dokusu, rejenerasyonun geç blastema dokusunu temsil etmek üzere 30. gün dokusu toplanmıştır.

Bu amaçla 27 neotenik aksolotl 1, 7 ve 14. gün doku örneklerini toplamak üzere üç gruba ayrıldı. Her grupta bulunan 9 hayvan üç biyolojik replika grubuna ayrılıp etiketlendi.

Hayvanlar deney gruplarına %1'lik benzokain çözeltisi içinde anesteziye alındı. Hayvanlara sağ ön kolun zeugopod bölgesinin orta kısmından ampütasyon yapıldı. Ampütasyon sonrasında hayvanlar rejenere olmaları için tekrar kendi ortamlarına bırakılıp aynı şartlarda büyümeye devam edildi.



Resim 5.2.2. 1 Aksolotl kol ampütasyon modelinin oluşturulması

0. Gün Örneklerinin Toplanması: Kol ampütasyonlarının yapılmasından hemen sonra sıfıncı gün örneklerini temsil etmek üzere, 9 neotenik ve hayvandan, ampütasyon bölgesinin yaklaşık 1 mm proksimalinden 0. gün örnekleri toplandı. Sıfıncı gün örnekleri ampütasyon öncesi durumu temsil etmekte olup, kontrol grubu olarak sonraki aşamalar için saklanmıştır. Replikaları oluşturan hayvanların doku örnekleri steril kabinde, steril bisturi ucu kullanılarak toplandı ve hemen sıvı azotta donduruldu. Örneklerden DNA izolasyonu yapılana kadar örnekler $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ de saklandı

1. Gün Örneklerinin Toplanması: Ampütasyondan 24 saat sonra 9 neotenik aksolotldan ampütasyon bölgesinin 1 mm proksimalinden dokular toplandı. Replikaları oluşturan hayvanların doku örnekleri steril kabinde, steril bisturi ucu kullanılarak toplandı ve hemen sıvı azotta donduruldu. DNA izolasyonları yapılana kadar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Ampütasyondan 24 saat sonra alınan dokular yara iyileşmesi sırasındaki dokuyu temsil etmektedir.

30. Gün Örneklerinin Toplanması: Amputasyondan 30 gün sonra 9 neotenik aksolotldan, yara bölgesinin distalinde belirgin olarak tespit edilebilen şeffaf bir doku olan blastema dokusu toplandı. Replikaları oluşturan hayvanların doku örnekleri steril kabinde, steril bisturi ucu kullanılarak toplandı ve hemen sıvı azotta donduruldu. DNA izolasyonlarına kadar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Alınan bu dokular blastema dokusu mikrobiyal profili temsil etmektedir.

5.2.3. Doku Örneklerinden DNA İzolasyonlarının Yapılması

Doku Homojenizasyonu:

Neotenik ve metamorfik 0, 1, 7, ve 30. gün dokularından DNA izolasyonu yapıldı. Her zaman noktasında bulunan replikaları oluşturan 3 doku sıvı azot ile havanda ezilerek bir doku havuzu oluşturuldu.

Sonraki aşamalarda OIAGEN kan ve doku kiti kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

DNA İzolasyonu: OIAGEN DNeasy kiti kullanılarak üreticinin verdiği aşağıdaki protokol uygulandı, özetle:

Toz halindeki doku 1,5 luk ependorf tüpüne alındı. Dokuların üzerine 180 µL ATL solüsyonu ve 20 µL proteinaz K solüsyonu eklendi. Tüpler 56 °C 'de ara ara vorteks ederek tamamen çözülene kadar inkübe edildi. Doku tamamen çözününce 200 µL AL solüsyonu eklendi ve tekrar vortekslendi. 200 µL %96'lık etanol eklendi ve tekrar vortekslendi ve solüsyon kolonun takılı olduğu yeni tüpe aktarıldı. 8000x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü değiştirildi. Kolona 500 µL AW1 solüsyonu eklendi. 8000x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü değiştirildi. Kolona 500 µL AW2 solüsyonu eklendi. 20000x g'de 3 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü değiştirildi. Kolona 200 µL AE solüsyonu eklendi, 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 14000x g'de 1 dakika santrifüj edildi. DNA konsantrasyon ve saflık ölçümleri NanoDrop cihazında yapıldı.

5.2.4. 16S Metagenomics Kütüphanelerinin Hazırlanması ve Dizi Analizi

16S geninin V3-V4 bölgesini çoğaltmak amacıyla aşağıdaki primerler kullanıldı:

16S_F: 341 F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3')

16S_R: 805 R (5'- GACTACHVGGGTATCTAATCC -3')

Forward ve reverse primerlerin ucuna Miseq dizileme adaptör dizileri de eklendi.

İzole edilen DNA örneklerinden 16S primerleri kullanılarak metagenomiks kütüphaneleri oluşturuldu. Bioline marka MyTaq DNA polimeraz enzimi üretici firmanın protokolü takip edilerek kullanıldı.

Bu çoğaltma işlemi için aşağıdaki karışım hazırlanmıştır (**Tablo 5.2.4.1**):

Tablo 5.2.4. 1 Polimeraz zincir reaksiyonu

Reaksiyon içeriği	Miktar
gDNA	Reaksiyon hacminde 100 ng
5X MyTaq Buffer	5 ul
Forward primer	1 ul
Reverse primer	1 ul
Enzim	1 ul
NFW	Reaksiyon hacmi toplamda 15 ul olacak şekilde

PZR döngü düzeni şu şekilde yapılmıştır:

95 C’de 3 dakika

95 C’de 30 saniye

55 C’de 30 saniye

72 C’de 30 saniye

72 C’de 5 dakika



Elde edilen PZR ürünlerinin büyüklüğü %1’lik agaroz jel elektroforezine yüklenerek kontrol edildi. 400-500 bp arası bantlar jelden kesilerek, Agencourt AMPure XP Saflaştırma Sistemi (Beckman Coulter) ile saflaştırıldı.

Kütüphane hazırlığının bir sonraki adımı olarak çoğaltılan 16S rDNA dizilerine barkod dizileri eklendi. Bu amaçla ikinci bir PZR gerçekleştirildi. Örneğe özgü barkod primerler ile her örnekte bulunan ampliconlar işaretlendi. İkinci PZR sonrasında da reaksiyon sonrası çoğaltılmış PZR ürünleri, %1’lik agaroz jelle yüklenerek agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. 400-500 bp arası bantlar jelden kesilerek, Agencourt AMPure XP Saflaştırma Sistemi (Beckman Coulter) ile saflaştırıldı. Temizlenen ampliconlar Illumina Miseq platformuna yüklenerek Miseq 300 siklus reaktif kiti(V3) kullanılarak dizileme yapıldı.

5.2.5. Sekans Sonuçlarının Analiz Edilmesi

Miseq paired end ham dizileme sonuçları analiz edildi. Ham okumalar öncelikle kalite kontrolden geçirildi. Nephela platformuna entegre QIIME yazılımı kullanıldı. FASTQ paired end pipeline yazılımı ile FASTQ kullanılıp kalite skoru 30'u geçen okumalar sonraki adımlarda kullanıldı. Bu kalite skorunu geçen okumalar QIIME açık referans analizi yöntemi ile birleştirildi. Bu veriler SILVA referans veri tabanında bulunan 16S sekansları ile karşılaştırılarak %97 benzerlik gösteren okumalar tanımlandı ve OTU lar içine atandı. OTU seçilmesi ve sınıflandırılması için uCLUST algoritması ve PYNAST taksonomisi atandı. İleriki analizler için microbiome analyst programı kullanıldı ve alfa ve beta çeşitlilik analizleri gerçekleştirildi.

5.3. Rejenerasyon boyunca değişen gen ifadesi

5.3.1. Aksolotların Temini Ve Bakımı

Çalışma kapsamında toplamda 27 adet vahşi tip aksolotl kullanıldı. Deneylerde kullanılan aksolotllar Ambystoma Genetic Stock Center (AGSC)'den getirilmiş olup İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Merkezi'nde çoğaltıldı. Deneylerde kullanılan hayvan grubu, herhangi bir uzvu daha önceden hasar görmemiş olan 8 aylık kardeşlerden oluşturuldu.

27 aksolotl, bir akvaryumda bir hayvan olacak şekilde Holtfreter's solüsyonunda, yaklaşık 20 °C oda sıcaklığında muhafaza edildi. Aksolotllar 12 saatlik karanlık aydınlık döngüsü sağlanarak muhafaza edildi. Holtfreter's solüsyonu haftada bir defa değiştirildi. Hayvanlar üç günde bir JBL novolotl marka pellet yem kullanılarak beslendi. Çalışma başlangıcından sonuna dek, hayvanların mikrobiyotasını değiştirecek tüm etkenlerden (antibiyotik uygulaması vs.) kaçınıldı.

5.3.2 Aksolotların Kol Ampütasyonlarının Yapılması ve Hayvanlardan Doku Örneklerin Toplanması

Deneyde kullanılacak hayvanlardan; kontrol grubunu temsil etmek üzere sıfırıncı gün dokusu, rejenerasyonun yara iyileşmesi aşamasını temsil etmek üzere 1. gün dokusu, rejenerasyonun erken blastema aşamasını temsil etmek üzere 7. gün dokusu, rejenerasyonun geç blastema dokusunu temsil etmek üzere 14. gün dokusu toplanmıştır.

Bu amaçla 27 neotenik aksolotl 1, 7 ve 14. gün doku örneklerini toplamak üzere üç gruba ayrıldı. Her grupta bulunan 9 hayvan üç biyolojik replika grubuna ayrılıp etiketlendi.

Hayvanlar deney gruplarına ayrıldıktan sonra %1'lik benzokain çözeltisi içinde anesteziye alındı. Hayvanlara sağ ön kolun zeugopod bölgesinin orta kısmından amputasyon yapıldı. Amputasyon sonrasında hayvanlar rejenere olmaları için tekrar kendi ortamlarına bırakılıp aynı şartlarda büyümeye devam edildi.

0. Gün Örneklerinin Toplanması: Kol ampütasyonlarının yapılmasından hemen sonra sıfırıncı gün örneklerini temsil etmek üzere, 9 neotenik ve hayvandan, ampütasyon bölgesinin yaklaşık 1 mm proksimalinden 0. gün örnekleri toplandı. Sıfırıncı gün örnekleri ampütasyon öncesi durumu temsil etmekte olup, kontrol grubu olarak sonraki aşamalar için saklanmıştır. Replikaları oluşturan hayvanların doku örnekleri steril kabinde, steril bistüri ucu kullanılarak toplandı ve hemen sıvı azotta donduruldu. Örnekler RNA izolasyonları yapılana kadar -80 °C de saklandı.

1. Gün Örneklerinin Toplanması: Amputasyondan 24 saat sonra 9 neotenik aksolotldan amputasyon bölgesinin 1 mm proksimalinden dokular toplandı. Replikaları oluşturan hayvanların doku örnekleri steril kabinde, steril bistüri ucu kullanılarak toplandı ve hemen sıvı azotta donduruldu. RNA izolasyonları yapılana kadar -80 °C'de saklandı. Ampütasyondan 24 saat sonra alınan dokular yara iyileşmesi sırasındaki dokuyu temsil etmektedir.

14. Gün Örneklerinin Toplanması: Ampütasyondan 14 gün sonra 9 neotenik aksolotldan, yara bölgesinin distalinde belirgin olarak tespit edilebilen şeffaf bir doku olan blastema dokusu toplandı. Replikaları oluşturan hayvanların doku örnekleri steril kabinde, steril bistüri ucu kullanılarak toplandı ve hemen sıvı azotta donduruldu. RNA izolasyonları yapılamaya kadar -80 °C’de saklandı. Alınan bu dokular blastema dokusu mikrobiyom profilini temsil etmektedir.

5.3.3 Doku Örneklerinden RNA İzolasyonlarının Yapılması

Doku Homojenizasyonu:

Toplanan 0, 1, 7, ve 14. gün dokularından RNA izolasyonu yapıldı. Her zaman noktasında bulunan replikaları oluşturan 3 doku sıvı azot ile havanda ezilerek bir doku havuzu oluşturuldu. Toz halindeki dokuların yarısı DNA yarısı RNA izolasyonunda kullanıldı.

RNA İzolasyonu:

Toz haline getirilen 50/100 mg dokuya 1 ml TRIzol eklendi. Toz halindeki doku örneği vortekslenerek homojen hale getirildi. Homojenize olduktan sonra iki dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. TRIzol miktarının beşte biri kadar kloroform eklendi, alt üst ederek karıştırıldı. 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. +4 °C ’de 14000xg’de 15 dakika santrifüj edildi. Bu aşamada RNA, protein ve DNA üç ayrı fazda ayrılmış şekilde bulunur. Üst faz eğim yapılarak yeni tüpe alındı ve TRIzol miktarının yarısı kadar izopropanol eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi (pipetaj, alt-üst) +4 °C ’de 14000 g’de 10 dk santrifüj edildi. Bu aşamada tüp duvarında pellet görüldü. Süpernatant atıldı ve TRIzol miktarı kadar %75’lik etanol eklendi. +4 C’de 8000 g’de 5 dk santrifüj edildi. Pellet işaretlendi ve tüpte kalan alkolün uzaklaşması için oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Alkol uzaklaştıktan sonra pellet RNaz içermeyen su ile çözüldü, 60°C ’de 10 dakika inkübe edildi. RNA konsantrasyon ve saflık ölçümleri NanoDrop cihazında yapıldı.

5.3.4 RNA Kütüphanelerinin Hazırlanması ve Transkriptom Dizi Analizi

Kütüphane hazırlığına başlamadan önce izole edilen total RNA dan poliA seleksiyonu ile mRNA lar aşağıdaki protokole uygun olarak seçildi:

Örnekler 50 ug total RNA olacak şekilde 50 ul RNase free su ile çözüldü. 50 ul 2x Poly(A) seleksiyon tamponu eklendi. 65°C de 10 dakika inkübe edildi. Tüpler buza alınarak ve soğutuldu. Turbo DNase (life Technologies) veya RQ1 DNase (Promega) ile genomik safsızlık giderildi. 720 ug Dynabeads MyOne streptavidin C1, 1.5 ml mikrosantrifüj tüpe alındı. Magnet portüpe aktarıldı. Manyetik boncuklara değmemeye özen göstererek süpernatant atıldı. Tüplere 300 ul TE eklenerek karıştırıldı. 30 saniye inkübe edildi. Magnet portüpe alındı. Manyetik boncuklara değmemeye özen göstererek süpernatant atıldı. Bu işlem dört kere tekrarlandı. 100 ul TE içinde 200 pmol biyotinlenmiş oligo(T) boncuklar karıştırıldı. 10 dakika 37 C de çalkalandı. 37 C de önce 30 saniye TE ile sonra iki kere Poly(A) seleksiyon tamponu ile yıkandı. 100 µl RNA eklendi ve 10 dakika 37 °C'de çalkalandı. Tüp, magnet portüpe konuldu, boncuklar 3 kere 50 µl 2× Poly(A)+ seleksiyon tamponu ile yıkandı. Elüsyon için boncuklar 50 ul ultra saf su ile resüspanse edildi. Sonrasında 65 C de 10 dakika inkübe edildi. Tüp magnet portüpe alındı ve sıvı kısım yeni bir tüpe alındı. Sonrasında 12.000x g de oda sıcaklığında santrifüj yapıldı.

PoliA seleksiyonu sonrası elde kalan RNA fragmente edildi. 1 ug/ul final konsantrasyonda RNA RNase free suda çözüldü. Thermal cycler cihazında 94 °C de 5 dakika inkübe edildi. Her örneğe 2 ul 0.5 M EDTA eklendi, vortekslenerek buza alındı. Tüplere 1:10 oranında 3 M sodyum asetat (pH 5.2), glikojen (100 µg/ml) ve hacmin 2.5 katı kadar 100% etanol eklenerek karıştırıldı. Gece boyu -80 °C de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası örnekler +4 °C'de 15.000x g'de 25 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet kurutuldu. Rnase free suda örnekler çözüldü.

Fragmente edilen RNA örneklerinin saflıkları ölçüldü. Agoroz jel elektroforezi ile bant boyutları kontrol edildi.

Sonraki adımda RNA'nın 5' ve 3' uçlarına adaptörlerin bağlandı. Bu adaptörler sekans ve index dizilerini içerir. Bağlanan bu adaptörler sayesinde RNA fragmentlerini cDNA'ya çevirmek mümkündür. SuperScript II reverse transcriptase kullanılarak RNA örnekleri cDNA'ya çevrildi. Illumina'nın protokolü izlenerek cDNA'nın ikinci kalıbı sentezlendi.

Hazırlanan kütüphanelerin dizilenmesi, NextSeq Series High-Output Kit'i kullanılarak Illumina'nın Next-SEQ cihazında gerçekleştirildi.

5.3.5. RNA dizilemesi sonuçlarının analiz edilmesi

NextSeq cihazından elde edilen veriler kalite skorlamasına tabi tutuldu ve kalite skoru 30 sınırını geçen okumalar ile analizlere başlandı. FastQC nitelik raporu ile yoğunluğu belirlenen düşük nitelikteki bazı dizileri ve adaptör dizileri Trimmomatic 0.36v aracı kullanılarak kırıldı. Diziler daha sonra Trinity (Grabherr vd. 2011) yazılımı kullanılarak 'de-novo' birleştirildi ve contigler oluşturulup bu contigler arasından gerçek transkriptler belirlendi. Tekrar eden transkriptlerin elimine edilmesi sonrasında listelenen RNA'ların aksotl ve diğer organizmalardaki adlandırılmasının yapılması için "The National Center for Biotechnology Information" (NCBI) veritabanı kullanıldı ve bulunan RNA'lar tanımlandı. Böylelikle transkriptom-seviyesindeki araştırmanın ham veri (FASTQ dosyalarının) analizi tamamlandı ve bu çalışmanın devamı niteliğinde (follow-up) çalışmalar için yeni bir veri kaynağı elde edilmiş oldu. Bundan sonra bu verinin detaylı aşağı akış (downstream) analizi yapılabilir veya başka bir omik verisiyle (transkriptom, mikrobiyom vb. verileriyle) birleştirilip meta-analiz yapılabilir. Bu tezin konusu olan aksotl ve mikrobiyota ilişkisi bağlamında ise oluşturulan bu transkriptom verisi yakın gelecekte mikrobiyota sonuçlarını daha iyi anlamlandırmak ve daha kapsayıcı sonuçlara ulaşmak için tamamlayıcı bir öneme sahiptir.

Tablo 5.3. 1 Kullanılan sarflar

Sarf Malzeme Adı	Üretici Firma	Katolog Numarası
%0.1 Trikain Mesilat	Sigma	E10521
Tetraiodo-L-thyronine(T4)	Sigma	T2376 marka
DNeasy kan ve doku kiti	Qiagen	69504
TRIZol Reagent	By Life Technologies	15596018
MyTaq DNA polimeraz	Bioline	BIO-21107
Agencourt AMPure XP Kiti	Beckman	A63881
MiSeq V2 500 döngü kit	Illumina	MS-102-2003
Nextera	Illumina	20018705
Agarose	GeneOn	
10X blue juice gel loading buffer	Invitrogen	
Quick Load 1 Kb Purple Plus DNA Ladder	Invitrogen	N0550S
SYBR Safe DNA Gel Stain	Thermo Fisher	S33102
6XPurple Gel Loading Dye	İnvitrogen	
Glikojen	Thermo Fisher	R0551
2X SYBR Green	Bio Rad	1725141
SuperScript revers transkriptaz enzimi	Thermo Fisher	11752250
EZ RNA methylation Kit	Zymo	R5001
ScriptSeq V2 RNA Sample Preparation Kit	Cambio	FSE51100
NextSeq Series High-Output Kit	Illumina	
Bioanalyzer RNA 6000 Pico kit		
SQK-RNA001 Kiti	Oxford Nanopore Technologies	

Tablo 5.3. 2 Kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka	Model
Thermal Shaker		
Mikrosantrifüj cihazı	Thermo	Scientific MicroCL 17R
Nanodrop		
Thermal Cyclcer	BIO-RAD	Thermal Cyclcer
Nextseq	Illumina	
ChemiDoc	BIO-RAD	
Elektroforez sistemi		
Spectramax cihazı	SpectraMax-Paradigm	Multi-Mode Microplate Detection Platform from Molecular Devices LLC
qRT-PCR cihazı	BIO-RAD	CFX Connect Real-TimeSystem
MinION R9.4	Oxford Nanopore Technologies	

6. BULGULAR

6.1. Aksolotl yaşam ortamı mikrobiyomu

6.1.1. DNA izolasyon sonuçları

Neotenik ve metamorfik aksolotl yaşam ortamından toplanan su örneklerinin DNA izolasyon sonuçları tablodaki gibidir (**Tablo 6.1.1. 1**)

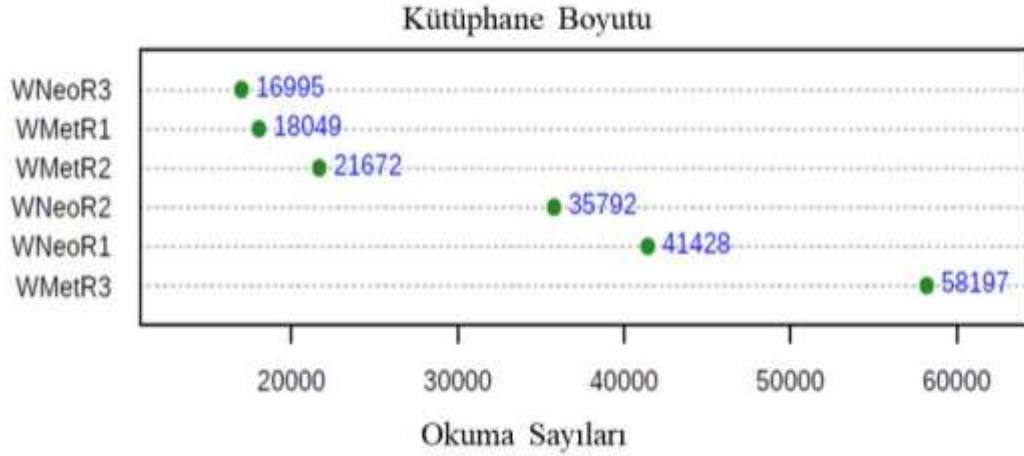
Tablo 6.2.1 1 Su örnekleri DNA konsantrasyonları tablosu

<u>DOKU ÖRNEĞİ</u>	<u>Konsantrasyon(ng/μl)</u>	<u>A260/280</u>	<u>A260/230</u>
<u>Neotenik su R1</u> <u>DNA</u>	30 ng/μl	<u>1.87</u>	<u>1.78</u>
<u>Neotenik su R2</u> <u>DNA</u>	31ng/μl	<u>1.87</u>	<u>1.81</u>
<u>Metamorfik su R1</u> <u>DNA</u>	<u>31.1</u> ng/μl	<u>2.1</u>	<u>0.49</u>
<u>Metamorfik su R2</u> <u>DNA</u>	<u>16.2</u> ng/μl	<u>1.1</u>	<u>0.32</u>
<u>Metamorfik su R3</u> <u>DNA</u>	<u>16.5</u> ng/μl	<u>0.9</u>	<u>1.16</u>

6.1.2 Biyoinformatik analiz sonuçları

Neotenik ve metamorfik aksolotl yaşam ortamından alınan örneklerin mikrobiyom yoğunluk ve değişiminin araştırılması için, 16S rRNA geninin V3-V4 bölgesi arası hedeflendi ve örneklerdeki mikrobiyom profili tespit edildi. Örnekler yeni nesil dizileme yöntemi kullanılarak sekanslandı. 9 neotenik 9 metamorfik aksolotl akvaryumundan alınıp üçer replika halinde birleştirilen 6 adet su örneğinden toplamda 16995 ile 58197 arasında okuma sayısı elde edildi. DNA dizileri

Operasyonel Taksonomik Birimi (OTU) ne atandıktan sonra 319 tane OTU elde edildi (Şekil 6.1.2. 1) Bu dizilerde toplamda 7 filum, 31 aile, 50 cins gözlemlendi.

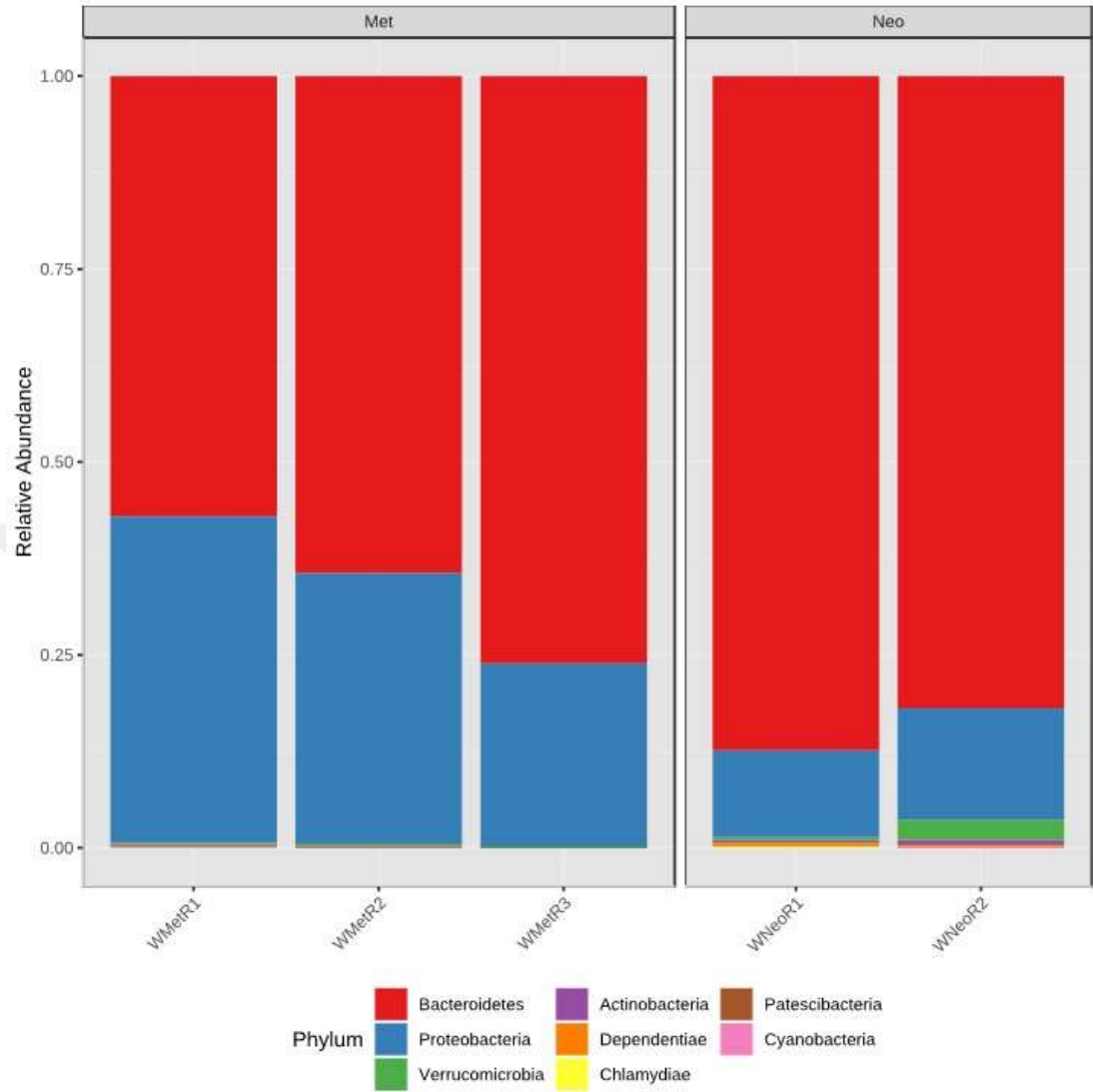


Şekil 6.1.2. 1 Örneklerden elde edilen sekans sayısı tablosu

Aynı deney grubunda bulunan farklı örneklerin farklı okuma sayısı verdiği tespit edildi.

6.1.3 Taksonomik Çeşitlilik

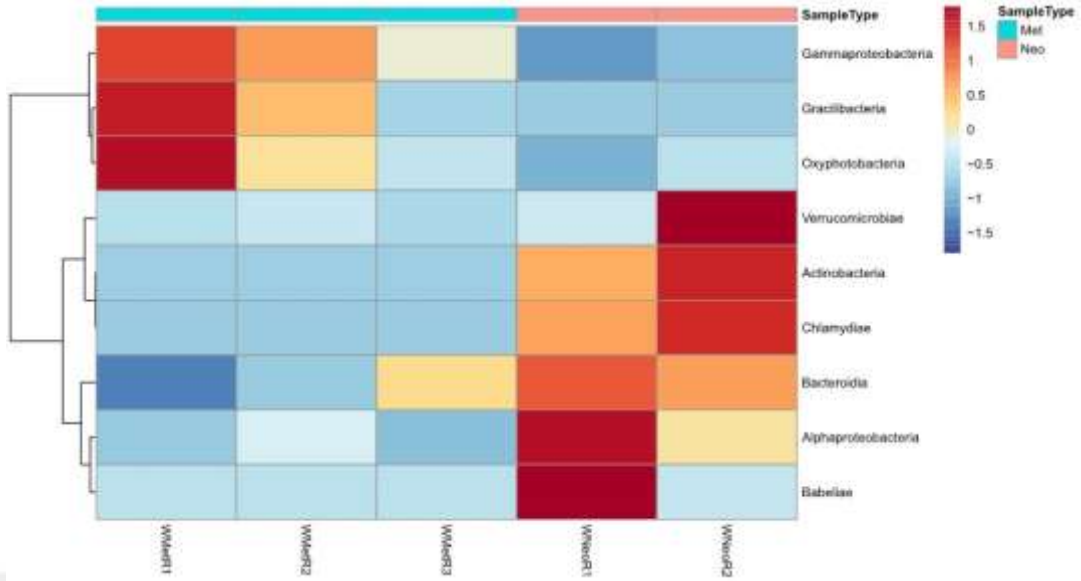
Neotek ve metamorfik aksolotl yaşam ortamında görülen mikroorganizmaların şube düzeyinde gösterildiği grafik aşağıda bulunmaktadır. Aynı örnek grubu içindeki farklı replikalarda bakteri şubelerinin göreceli bolluğu değişkendir. Metamorfoz sonrasında *Bacteroidetes* ve *Proteobacteria* şubesi göreceli bolluğu azalmıştır. Ayrıca metamorfik örneklerde şube düzeyinde çeşitlilik azalmıştır (Şekil 6.1.3. 1).



Şekil 6.1.3. 1 Neotenic ve metamorfik su örneklerinde bulunan mikroorganizmaların şube düzeyinde grafiği

Neotenic ve metamorfik aksotl yaşam ortamında görülen mikroorganizmaların şube düzeyinde gösterildiği ısı haritası aşağıda bulunmaktadır (**Şekil 6.1.3. 2**)

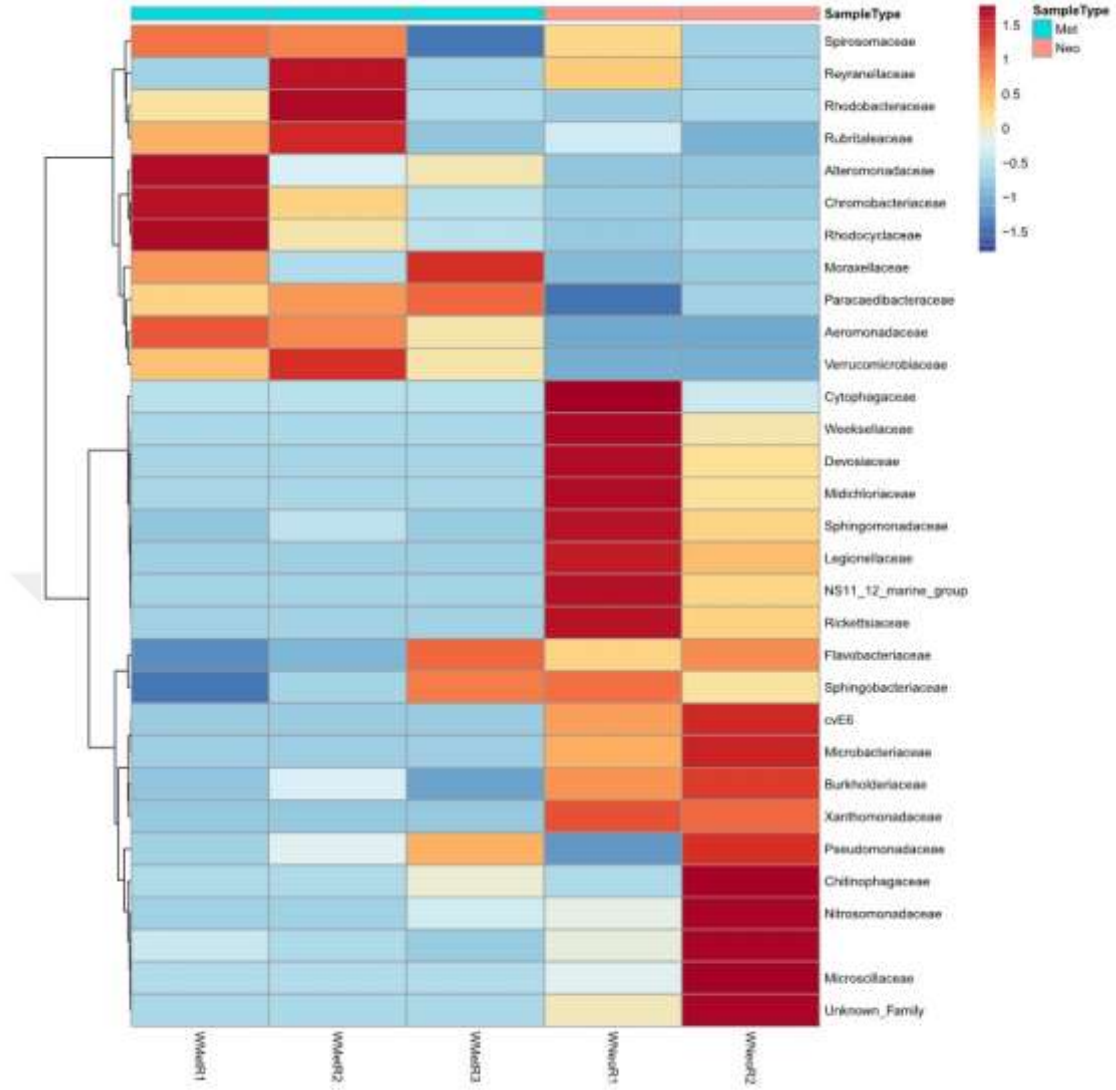
Bacteroidetes, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Chlamydiae*, *Cyanobacteria* şubesi üyelerinin bolluğu metamorfik örneklerde azalırken; *Patescibacteria* ve *Proteobacteria* şubeleri üyelerinin bolluğu artmıştır.



Şekil 6.1.3. 2 Neotenik ve metamorfik su örneklerinde bulunan mikroorganizmaların şube düzeyinde ısı haritası

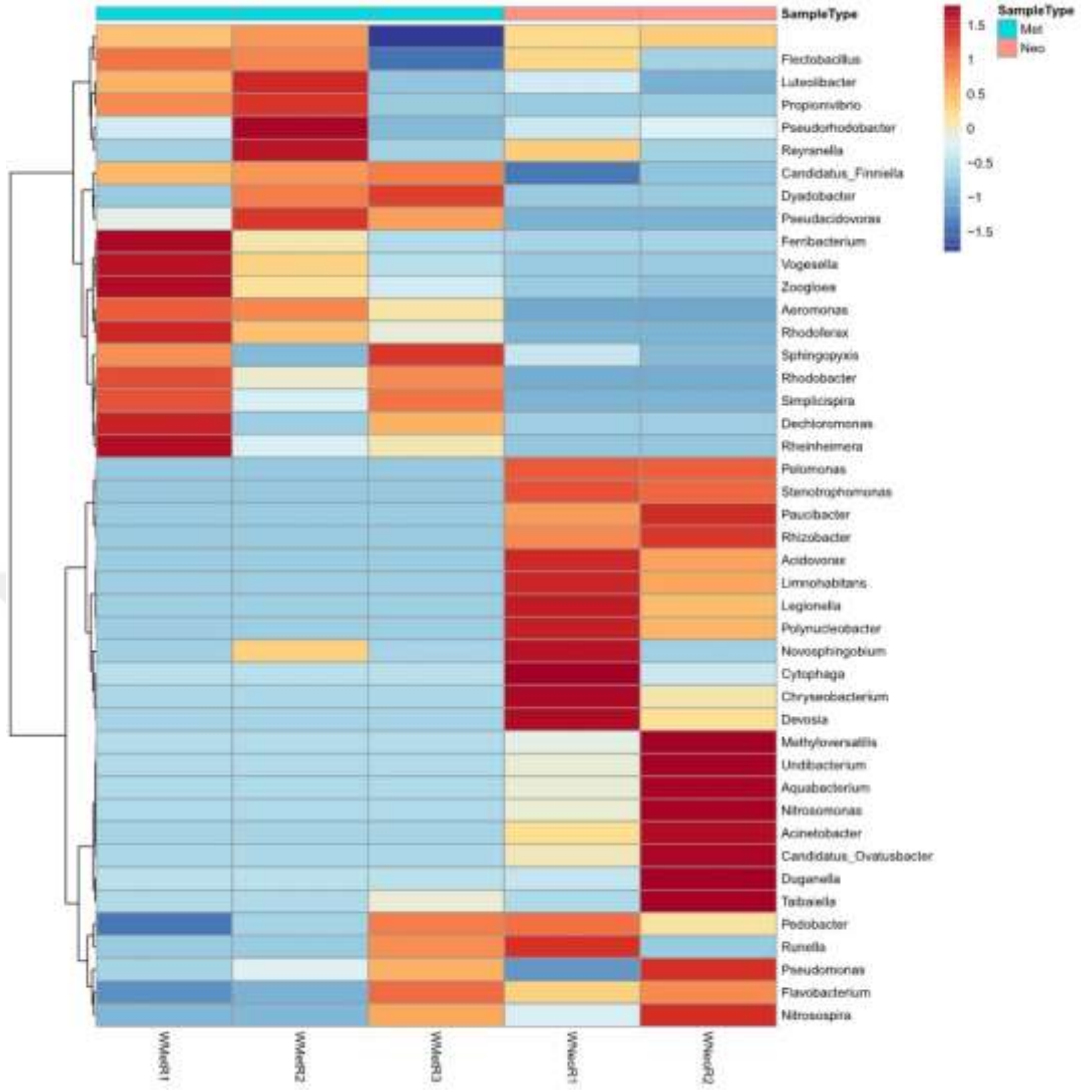
Neotenik ve metamorfik aksotl yaşam ortamında görülen mikroorganizmaların aile ve cins düzeyinde gösterildiği ısı haritası aşağıda bulunmaktadır (**Şekil 6.1.3. 3**) (**Şekil 6.1.3. 4**)

Metamorfik örneklerin en az iki replikasında neotenik örneklere kıyasla artış gösteren bakteri aileleri *Moraxellaceae*, *Alteromonadaceae*, *Chromobacteriaceae*, *Rhodocyclaceae*, *Aeromonadaceae*, *Rubritaleaceae*'dir. Neotenik örneklerde ise *Burkholderiaceae*, *Nitrosomonadaceae*, *Weeksellaceae*, *Rickettsiaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Microbacteriaceae*, *Flavobacteriaceae*'dir. Metamorfik örneklere kıyasla neotenik örneklerde daha fazla bakteri ailesi artış göstermiştir (**Şekil 6.1.3. 4**)



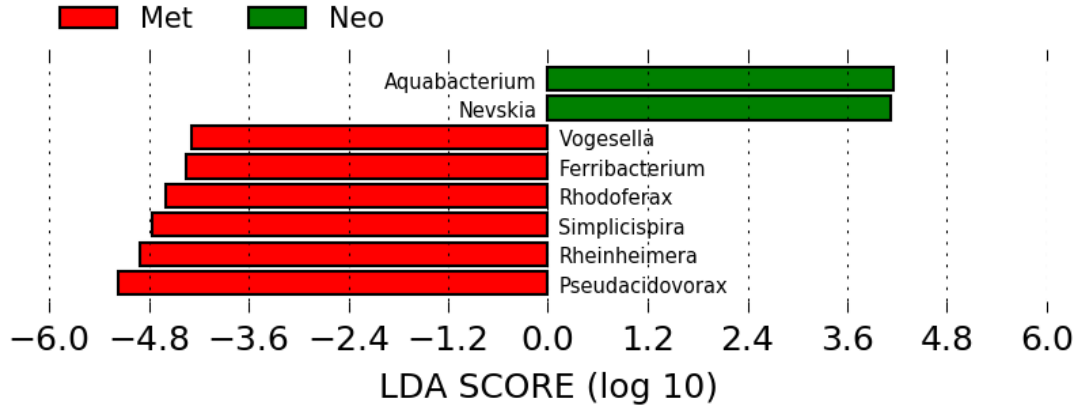
Şekil 6.1.3. 3 Neotenik ve metamorfik su örneklerinde bulunan mikroorganizmaların aile düzeyinde ısı haritası

Metamorfik örneklerin en az iki replikasında neotenik örneklere kıyasla artış gösteren bakteri cinsleri *Dyadobacter*, *Psoudacidovorax*, *Rhodobacter*, *Simplicispira*, *Dechloromonas*, *Rhodoferax*, *Ferribacterium*, *Vogesella*, *Flectobacillus*, *Aeromonas*, *Luteolibacter*, *Propionivibrio*'dur. Neotenik örneklerde ise *Rhizobacter*, *Paucibacter*, *Stenotrophomonas*, *Pelomonas*, *Limnohabitans*, *Acidovorax*, *Polynucleobacter*, *Flavobacterium*, *Novosphingobium*'dur. Metamorfik örneklere kıyasla neotenik örneklerde daha fazla bakteri cinsleri en az iki kat artış göstermiştir. Ayrıca aynı tür örneğin farklı replikalarında farklı türlerin çoğaldığı gözlenmiştir.



Şekil 6.1.3. 4 Neotenic ve metamorfik su örneklerinde bulunan mikroorganizmaların cins düzeyinde ısı haritası

LEfSe analizi sonuçlarına göre neotenic ve metamorfik su örneklerinde farklılığa neden olan baskın bakteri aileleri Şekil 6.1.3. 5’de gösterilmiştir. Neotenic örneklerde baskın olarak bulunan bakteri aileleri *Aquabacterium* ve *Nevskia* iken; metamorfik örneklerde baskın bulunan aileler *Vogesella*, *Ferribacterium*, *Rhodoferrax*, *Simplicispira*, *Rheinheimera*, *Pseudacidovorax* olarak değişim göstermiştir.



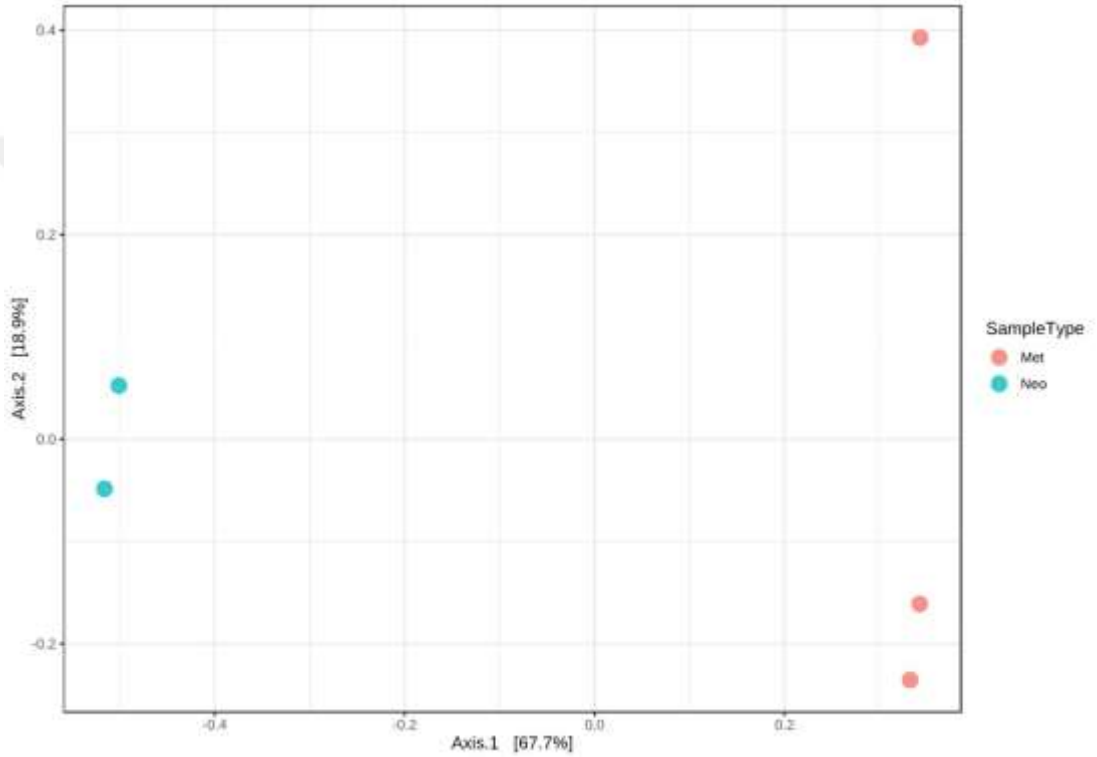
Şekil 6.1.3. 5 Neotenik ve metamorfik su örnekleri LEfSe analiz sonuçları

6.1.4 Beta çeşitlilik analizi

Beta çeşitlilik analizi, örnek sekans sonuçlarının analizi sonrası elde edilen OTU tablosu kullanılarak yapıldı. Deney grupları arasındaki mikrobiyal zenginlik beta çeşitlilik analizi ile tespit edilir. Deney gruplarının mikrobiyota çeşitliliği Bray-Curtis indeksi kullanılarak analiz edildi. Örnekler arası ayrışmalar temel koordinatlar analizi (PCoA) ile iki boyutlu grafik ile gösterildi. Gruplardan alınan örneklerin kendi içindeki ve diğer gruplara kıyasla farklılıkları PERMANOVA testi kullanılarak karşılaştırıldı. Grupları oluşturan örneklerin grup içi mesafe farklılıkları gruplar arası mesafelerden oldukça farklı olduğu bulundu ($R^2=0,67747$; $p < 0,1$). Gruplar arası güçlü ve bariz bir ayrışma gözlemlendi, R^2 değeri de bu sonucu desteklemektedir. Neotenik ve metamorfik örnekler birbirinden ayrı olarak kümelenme gösterdi. Metamorfik örneklerin birbirine yakın kümelendiği gözlenirken; metamorfik örneklerden bir tanesinin ayrı olarak kümelendiği gözlemlendi. Neotenik ve metamorfik örnekler birbirinden ayrı olarak kümelenme gösterdi. Neotenik örneğin iki replikası da birbirine yakın kümelenirken; metamorfik örneklerin üç replikısından biri diğer ikisinden ayrı olarak konumlanmıştır (Şekil 6.1.4. 1). Anlamlılık bakımından p

değerinin yetersiz (anlamsız) kalmasının sebebi büyük ihtimal nispeten küçük örnek sayısıdır. Daha büyük bir örnek seti ile aynı deneyin tekrarlanması halinde muhtemelen anlamlı bir sonuç alınacaktır.

[PERMANOVA] F-value: 6.3014; R-squared: 0.67747; p-value < 0.1

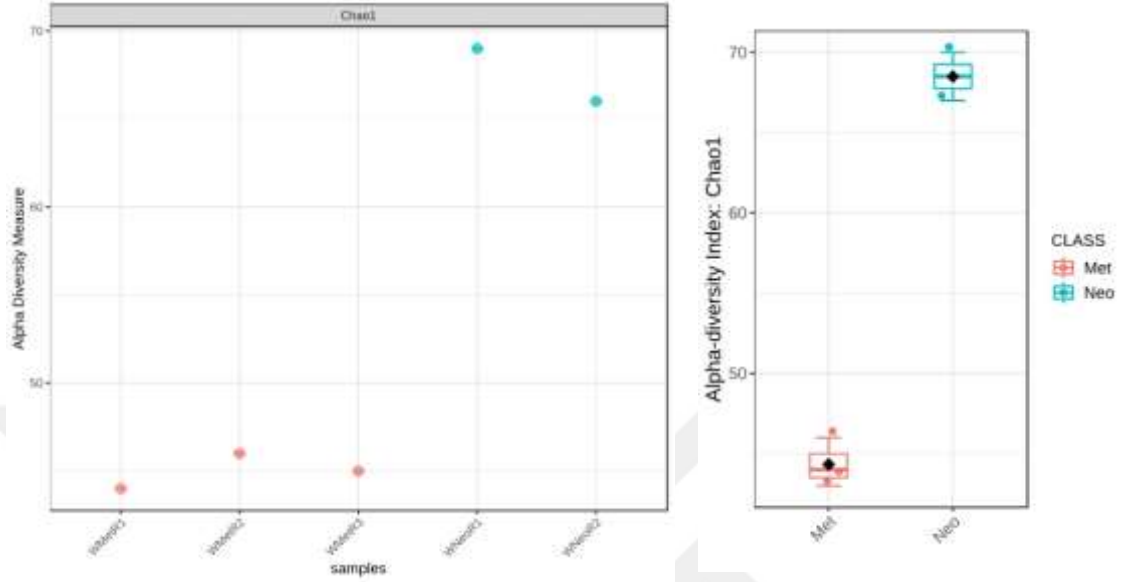


Şekil 6.1.4. 1 Neotenik ve metamorfik yaşam ortamı örnekleri mikrobiyotasının Bray-Curtis indeksine göre benzerliklerinin Temel Koordinat Analizi (PCoA) grafiği

6.1.5. Alfa çeşitlilik analizi

Neotenik ve metamorfik su örneklerinin örnek içi çeşitliliğini tespit edebilmek için alfa çeşitlilik analizi gerçekleştirildi. Bu analiz neotenik ve metamorfik örneklerin OTU tablolarının karşılaştırılmasını sağlamaktadır. Alfa çeşitlilik analizleri Chao1 çeşitlilik indeksi kullanılarak hesaplandı ve **Şekil 6.1.5. 1**'de gösterildi (p-value:

0.022181). Alfa çeşitlilik analizine göre metamorfik örneklerde, neotenik örneklerle kıyasla tür çeşitliliğinin azaldığı gözlemlendi.

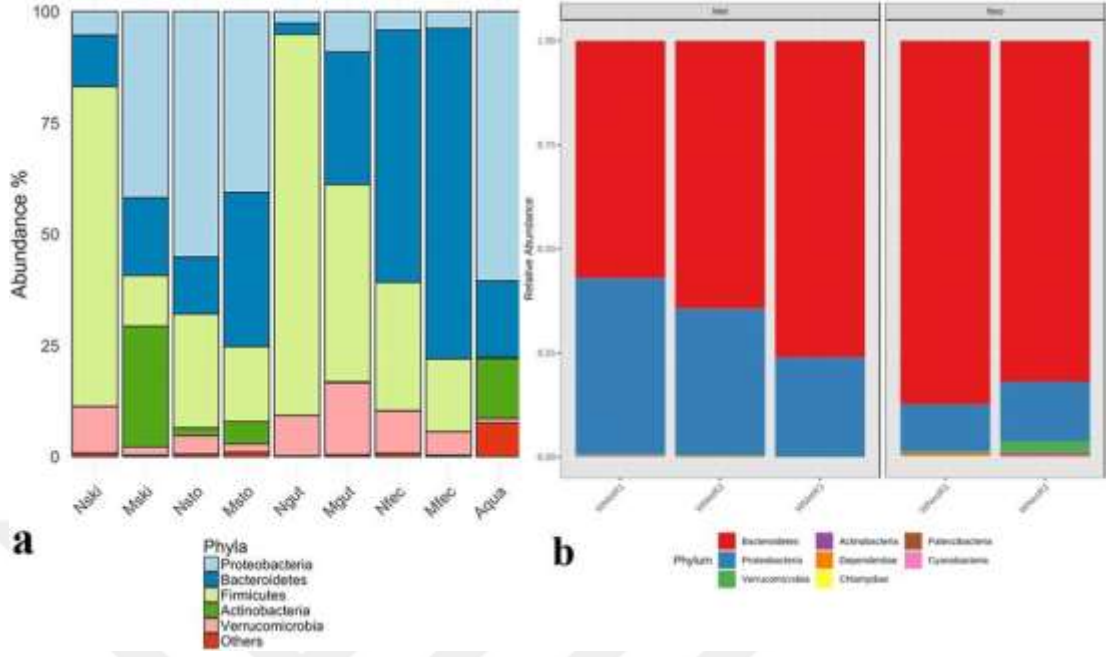


Şekil 6.1.5. 1 Neotenik ve metamorfik yaşam ortamı örneklerinin alfa çeşitlilik analiz sonuçları

6.2. Metamorfoz sonucu değişen aksolotl mikrobiyomu ve akvaryum suyuna etkisi

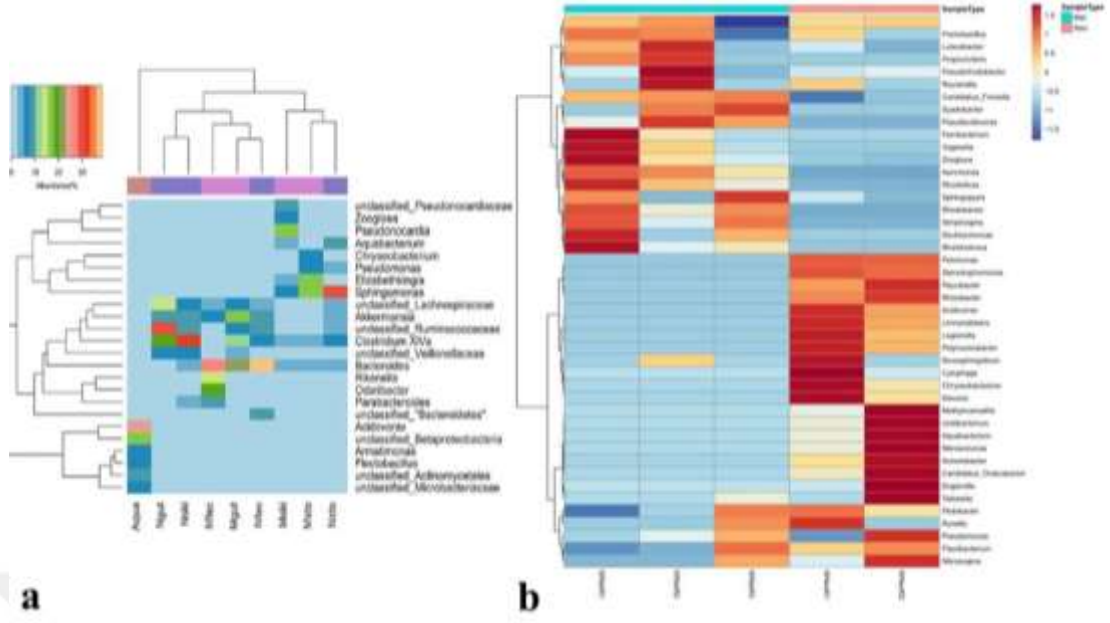
6.2.1. Biyoinformatik analiz sonuçları

Aksolotl metamorfozu sonrasında değişen akvaryum su çeşitliliğine, aksolotl organlarındaki mikrobiyom değişiminin katkısını anlamak için daha önce Demircan Lab tarafından yapılan bir deney sonuçları ile karşılaştırma yapılmıştır.



Şekil 6.2.1. 1 a) Neotenik ve metamorfik aksolotl deri, mide bağırsak ve dışkı mikrobiyomu (Demircan et al. 2018) b)Neotenik ve metamorfik aksolotl akvaryum su mikrobiyomu

Akvaryum suyu ve hayvan organlarının mikrobiyal çeşitliliği şube düzeyinde karşılaştırılmıştır (Şekil 6.2.2. 1). Buna göre örnek gruplarında baskın olan ortak bakteri şubeleri; *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*'dır. *Proteobacteria* şubesi metamorfik su örneğinde artarken; metamorfoz geçirmiş hayvanın deri ve bağırsağında artmış midesinde azalmıştır. *Bacteroidetes* şubesi metamorfik su örneğinde azalırken; metamorfik aksolotl deri, bağırsak, dışkı ve mide organlarında artış göstermiştir. *Verrucomicrobia* şubesi metamorfik suda azalırken; metamorfik aksolotl deri, mide ve dışkı örneğinde azalırken bağırsakta artmıştır. *Actinobacteria* şubesi metamorfik su örneğinde azalırken; metamorfik aksolotl deri ve midesinde artarken, bağırsak ve dışkısında azalmıştır.

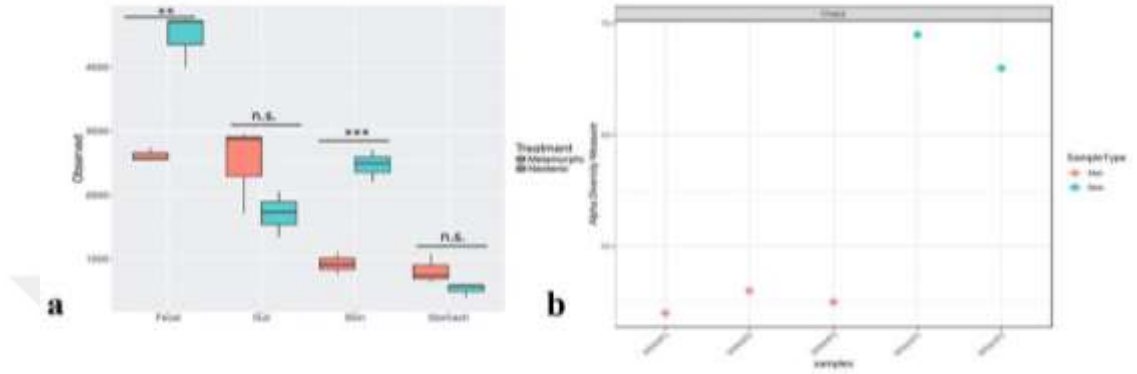


Şekil 6.2.1. 2 a) Neotenik ve metamorfik aksolotl organlarının cins düzeyinde ısı haritası (Demircan et al. 2018) b) Neotenik ve metamorfik aksolotl akvaryum su mikrobiyomunun cins düzeyinde ısı haritası

Ayrıca akvaryum suyu ve hayvan organlarının mikrobiyal çeşitliliği cins düzeyinde karşılaştırılmıştır (Şekil 6.2.2. 2). *Aquabacterium* cinsi neotenik su örneğinde bol miktarda bulunurken; metamorfoz geçirmiş hayvan dokularında tespit edilemedi, yalnızca neotenik deride tespit edilmiştir. *Chryseobacterium* cinsi metamorfik ile kıyaslandığında neotenik akvaryum suyunda bol miktarda bulunurken; metamorfik aksolotl dokularından yalnızca midede artış göstermiştir.

6.2.2. Alfa çeşitlilik analizi

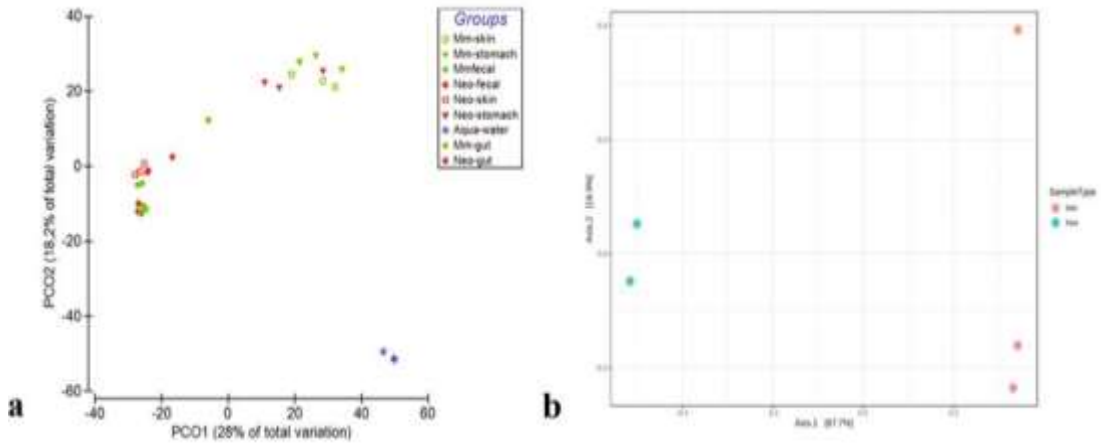
Alfa çeşitlilik analizine göre metamorfoz sonrası hem aksotl organlarında, hem de akvaryum suyunda örnek içi çeşitliliğinin azaldığı gözlemlendi.



Şekil 6.2.2. 1 a) Neotenik ve metamorfik aksotl organlarının alfa çeşitlilik grafiği (Demircan et al. 2018) b) Neotenik ve metamorfik aksotl akvaryum suyu alfa çeşitlilik analizi grafiği

6.2.3. Beta çeşitlilik analizi

Beta çeşitlilik analizine göre metamorfoz sonrası hem aksotl organlarında, hem de akvaryum suyunda tür çeşitliliğinin azaldığı gözlemlendi.



Şekil 6.2.3. 1 a) Neotenik ve metamorfik aksotl organlarının alfa çeşitlilik grafiği (Demircan et al. 2018) b)Neotenik ve metamorfik aksotl akvaryum suyu alfa çeşitlilik analizi grafiği

6.3. Rejenerasyon boyunca değişen gen ifadesi

Gerçekleştirilen bu analiz ile aksotl uzuv rejenerasyonu sırasında aksotl transkriptom değişimini anlamak için bir kaynak oluşturuldu. Bu kaynak özellikle zamanlı mikrobiyota değişimini yorumlamak üzere yapılacak ileri çalışmalar için faydalı olacaktır. Bundan sonraki çalışmaların ana amacı; ileri detaylı analizlerle çeşitli faktörler sonucunda değişen mikrobiyomun bütünsel olarak transkriptom değişimine katkısını anlamak olacaktır. Ayrıca konak canlı mikrobiyomundaki değişen profilin, hangi işlevleri gerçekleştirdiğini anlamak ve özelde konak canlıının hangi biyolojik süreçlerine katkı sağladığını anlamlandırmak için kaynak veri oluşturuldu.

Transkriptom analizi iki asamadan oluşmaktaydı: deneysel aşama ve biyoinformatik analiz aşaması. Deneysel aşama kısmı tamamen tamamlandı. Biyoinformatik analizlerin ise önemli bir bölümü tamamlandı. NextSeq cihazından elde edilen ham veriler ((FASTQ dosyaları) kalite skorlamasına tabi tutularak kalite skoru 30'u geçen okumalar ile analizlere devam edildi. Ayrıca okumalar birleştirilerek ortaya çıkan kontigler üzerinden gerçek transkriptler belirlendi. Sonuçta RNA çeşitlerine ulaşıldı

ve gerekli tanımlamalar yapıldı. Böylelikle bu transkriptom seviyesindeki araştırma sonucunda kaliteli ve kapsamlı bir veri seti elde edildi. Böylece bu tez çalışmasının devamı niteliğinde yapılacak sonraki çalışmalar için yeni bir veri kaynağı elde edilmiş oldu. Bundan sonraki çalışmalarda bu verinin detaylı aşağı akış (downstream) analizinin yapılması veya başka bir omik verisiyle (transkriptom, mikrobiyom vb. veri setleriyle) birleştirilerek meta-analiz yapılması planlanabilir. Sonuç olarak bu tezin konusu olan aksolotl uzuv rejenerasyonu ve mikrobiyota ilişkisi bağlamında elde edilen bu hazır transkriptom veri seti mikrobiyota değişimlerini daha iyi anlamlandırmak ve daha kapsayıcı sonuçlara ulaşmak için tamamlayıcı bir öneme sahiptir. Bu veri seti bu yöndeki gelecek integratif biyoinformatik yaklaşımlar için önemli bir kaynak oluşturacaktır.

7. TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında; aksolotlun metamorfoz ile birlikte değişen yaşam ortamı mikrobiyotası, aksolotlun rejenerasyon ile birlikte değişen kol mikrobiyotası ve kol gen ifadesi araştırılarak rejenerasyon sürecine mikrobiyomun etkisi bütünsel olarak ele alındı. Neotenik ve metamorfik aksolotl yaşam ortamı örnekleri ile rejenerasyon olan neotenik aksolotl kol dokusu örneklerinin DNA izolasyonunun ardından, 16S PCR yapılarak tüm örnekler için dizileme yapıldı. Biyoinformatik analizler ile örneklerde bulunan mikroorganizmalar tespit edildi. Ayrıca yine rejenerasyon boyunca değişen gen ifadesini anlamak ve mikrobiyom ile ilişkilendirmek için mRNA dizileme ve biyoinformatik analizler gerçekleştirildi.

Neotenik ve metamorfik akvaryum su örneklerinde baskın olarak bulunan 7 şube vardı. Bunlardan *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Chlamydiae*, *Cyanobacteria* şubesi üyelerinin bolluğu metamorfik örneklerde azalırken; *Patescibacteria* ve *Proteobacteria* şubeleri üyelerinin bolluğu artmıştır. Bu sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarda yaşam ortamı mikrobiyomu ile kısmen benzerdir (Şekil 4.3.3. 1) (Walke et al. 2014). Metamorfik örneklerde artan *Patescibacteria* şubesi, önceleri CPR (aday şube radyasyonu) olarak adlandırılan, daha sonra bu şube üyelerinin tek bir filuma yani *Patescibacteria* şubesine ait olduğu tespit edilen, nanobakterilerin oluşturduğu şubedir (Danczak et al. 2017) (Herrmann et al. 2019). Yeni keşfedilen bir şube olduğundan bu şube üyelerinin özelliği iyi bilinmemektedir. Metamorfoz sonunda bu şube üyelerinin artışı ilginçtir. Metamorfoz sonrasında artış gösteren bir başka şube olan *Proteobacteria* şubesine ait bazı türler iki yaşamlılıları enfekte eden bazı mantarları baskılayan antimikotikler üretmesi ile bilinirler. Aksolotlun metamorfoz geçirmesi ile birlikte mantar enfeksiyonu riski artmaktadır. Bu bağlamda bu şube üyelerinin artışı, kara yaşamına adaptasyon olarak değerlendirildiğinde anlamlıdır.

Aksolotlun mide bağırsak deri ve dışkı mikrobiyomunda baskın olarak bulunan türler; *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* ve *Verrucomicrobia* şubesi üyeleridir (Demircan et al. 2018). Aksolotl yaşam ortamında *Firmicutes*

şubesi haricinde diğer şubeler baskın olarak bulunuyordu. Su yaşam ortamı ile canlı arasındaki kaçınılmaz etkileşimin doğal bir sonucu olarak aynı şubelerin baskın olması anlamlıdır. Yalnız su örneklerinde *Firmicutes* şubesi yerine *Patescibacteria* şubesi artış göstermiştir ki, bu şubenin neotenik hayvanın mikrobiyomunda bulunmaması ve metamorfoz ile birlikte armış olması ilginçtir.

Amfibiler benzersiz ve değişken deri toplulukları kazanabilirler. Mikrobiyal topluluklarını ebeveynlerinden, beraber yaşadıkları topluluklardan veya çevresel etmenler aracılığı ile edinebilir (Mckenzie et al. 2011). Deri mikrobiyomu, iç organlara kıyasla dış çevre ile daha yoğun temas halindedir. Bu durum, en azından deride konak mikrobiyomunun filogenetik özgüllüğünü gizleyebilir. Bu da farklı çevresel koşullarda büyüyen canlıların mikrobiyomunu değişken kılabilmektedir (Mckenzie et al. 2011). Bu nedenle de deri çevresel değişimler ile daha keskin değişimlere uğrayabilir. Deney koşullarında metamorfoza uğratılan bir aksolotl için neotenik duruma göre hiçbir çevresel değişiklik yoktur. Fakat metamorfoz sonrasında hem aksolotl deri mikrobiyomu hem de akvaryum su mikrobiyomu değişmiştir. Bu mikrobiyal değişimin tek nedeni ise hayvanda gerçekleşen metamorfoz olayıdır. Metamorfoz sonrasında hem deri mikrobiyomunda hem de akvaryum suyunda *Proteobacteria* artmış, *Verrucomicrobia* azalmıştır. Deri ile yaşam ortamı arasındaki etkileşim göz önüne alındığında bu değişimin birbiri ile uyumlu olması beklenen bir durumdur.

Aksolotl yaşam ortamı mikrobiyomu ve aksolotl mikrobiyomu kısmen değişkenlik göstermektedir. Bu da aksolotlun, yaşam ortamında bulunan türleri kendi mikrobiyomuna seçici olarak kabul etmesinin bir sonucu olabilir. Bu bulguyu destekleyen diğer bir gözlem ise; başka hiçbir değişiklik yokken metamorfoz sonrasında hayvanın ve akvaryum suyunun mikrobiyomunun değişime uğramasıdır.

Burkholderiaceae, ailesi üyeleri neotenik suda artış göstermişken metamorfik suda azalmıştır. Bu türün üyeleri iki yaşamlıların derisinde bulunmakla birlikte doğada suların derinliklerinde yaşarlar.

Rhodocyclaceae, *Chromobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Aeromonadaceae*, ve *Rubritaleaceae* ailesi üyeleri matamorfik su örneklerinde neotenik su örneklerine

kıyasla iki katı artış göstermiştir. Bu ailelerden *Rhodocyclaceae*, bd enfeksiyonuna karşı koruma sağlamaktadır (Hylidae 2020).

Vücut mikrobiyomu immün cevapları tetikleyerek rejenerasyonu etkileyebilir. Metamorfik aksolot su örneklerinde bağışıklık sistemini regüle edebilen mikroorganizmalar gözlenmiştir. *Rickettsiaceae* ailesi üyeleri insanlarda patojenik özellikleri ile bilinmekle birlikte, bu mikroorganizmalar ile enfekte edilmiş endotel hücrelerin, doğal bağışıklık tepkilerini arttırdığı ve yüzey yapışma moleküllerinin ifadesini arttırdığı gösterilmiştir. Neotenik su örneklerinde *Rickettsiaceae* ailesi artmış metamorfik su örneklerinde ise azalmıştır. Rejenerasyonun erken evrelerinde doğal bağışıklık tepkisi gereklidir. İnfalasyon uzuv rejenerasyonunda ve yara iyileşmesi evrelerinde olumlu katkılar sağlar. Pro-anti inflamatuvar sinyaller rejenerasyon boyunca eş zamanlı olarak uyarılmakta; sitokin salgılanması ile lökosit infiltrasyonu, damar oluşumu, hücre çoğalması ve kollajen yeniden modellenmesi olaylarına aracılık eder. Yerleşik mikroorganizmaların bağışıklık sistemine katkı sağladığı bilindiğinden, rejenerasyon yeteneği azalan metamorfik aksolotun yaşam ortamında bu türün azalması ilginçtir.

Flavobacterium cinsi doğada bol bulunur. Su, sebzeler, çiğ süt, süt ürünleri et ve et ürünleri gibi birçok gıdadan izole edilebilmektedir. Balıkların ve diğer hayvanların normal bağırsak florasında bulunabilir ve bazı türleri patojendir. 130 tane tanımlanmış türü vardır. *F. psychrophilum* *F. columnare* *F. branchiophilum* da içinde olduğu birkaç türü; tatlı su balıklarının ölümüne neden olur (Duchaud et al. 2007) (Declercq et al. 2013) (Good et al. 2015) Neotenik ve metamorfik örneklerin bazılarında artış göstermektedir. Metamorfoza indüklerken yaşanan hayvan kaybının nedeni ile ilişkilendirilebilir.

Flectobacillus cinsi su örneklerinde bulunur. Bacteroidetes filumunun Flexibacteraceae ailesinin bir üyesidir. Zebrafish bağırsaklarında bulunan bir türdür.

Aeromonas cinsi *Proteobacteria* sınıfının *Enterobacteriaceae* ailesinin bir üyesidir. *A. hydrophila*, *A. caviae*, and *A. veronii* türlerinin de içinde bulunduğu 14 ten fazla türü insan hastalıkları ile ilişkilendirilmiştir. Semenderler için de patojen özellikte olan türleri vardır. Aksolotlda kırmızı lekeli cilt olarak kendini gösteren bir hastalığa

neden olan parazitik türleri bilinmektedir. Aksolotlda hastalık modeli oluşturmak üzere kullanılmıştır (Farkas and Monaghan 2015). *Aeromonas* cinsi metamorfik su örneklerinin tamamında artmıştır. Metamorfoz sırasında yaşanan hayvan ölümleri ile doğrudan ilişki kurulabilir. Ayrıca *Aeromonas* cinsi üyelerinin, su canlılarının yara iyileşme süreçlerini olumsuz etkilediği gösterilmiştir (Minnaganti et al. 2000). Bu türün metamorfik suda artış göstermesi, yara iyileşmesi sürecini olumsuz etkilemesi dolayısı ile de azalan rejenerasyon yeteneği ile ilişkilendirilebilir.

Beta çeşitlilik analizine göre neotenik yaşam ortamı örneklerine kıyasla metamorfik yaşam ortamı örneğinde çeşitlilik azalmıştır. Çeşitliliğin azalması ve su mikrobiyomunun muhtemel patojen mikroorganizmalara kayması, metamorfik aksolotl rejenerasyon yeteneğinin çevresel etmenlerden etkilenebildiği hipotezini destekleyebilir.

Vücut mikrobiyomunda varolan simbiyotik bakteriler, patojen büyümesini engelleyerek konağı patojen organizmalardan koruyan özellikler sergilerler. Semenderler için ölümcül olabilen mantar patojeni *Batrachochytrium dendrobatidis*(*Bd*) enfeksiyon riski, yüksek sıcaklıklarda daha da artmaktadır. Farklı sıcaklıklarda *Bd*'yi baskılayan üç mikroorganizma türü; *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium* yapılan bir çalışma sonucunda bildirilmiştir (Muletz-wolz et al. 2017). Bu tez çalışmasında ise *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium* türleri neotenik aksolotlda bol bulunurken metamorfoz sonrası azalmıştır. Ancak bazı çalışmalar *Stenotrophomonas* suşlarının *Bd* enfeksiyonunundan koruyucu olduğunu bildirirken, bazı çalışmalar ise bu enfeksiyon ile sinerjik bir ilişki gösterdiğini bildirmiştir. *Stenotrophomonas* cinsi, mantar enfeksiyonuna maruz bırakılan bir semenderde fırsatçı patojen olarak enfekte edebilmektedir (Bates et al. 2019).

Semender bağırsak mikrobiyomu ve sindirim performansı farklı sıcaklıklarda değişkenlik göstermektedir. Bağırsak mikrobiyomunun çeşitliliği içeriği ve işlevselliği sıcaklık faktöründen etkilenir. Bağırsak mikrobiyomunun çeşitliliğinin sıcaklık artışı ile azaldığı bildirilmiştir. Semenderlerde belli taksonların yokluğu da patojen türlerin artışı ile ilişkilendirilmiştir (Fontaine, Novarro, and Kohl 2018).

Doğada metamorfoz sonrasında canlıların diyet bileşimleri de değişmektedir. Farklı türde karmaşık gıdaların sindirimi için de bağırsak mikrobiyomu değişkenlik

göstermektedir. *Stenotrophomonas*, ve *Sphingopyxis* cinsi bakterilerin semenderlerde sindirim ve enerji üretimi ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Metamorfik akvaryum su örneklerinde de *Sphingopyxis* artış gösterirken, neotenik akvaryum su örneklerinde ise *Sphingopyxis* cinsi mikroorganizmaların azaldığı gözlemlenmiştir. *Stenotrophomonas* türü bakteriler kitini sindirebilirler. Kitin, eklem bacaklıların dış iskeletlerinin baskın bileşenidir ve metamorfoz sonrası semenderlerin beslenmesi kitin içerikli olmaktadır (Maglia, 1996), bu da bu bakterilerin bolluğu ile bu hayvanlardaki enerji özümleme arasındaki ilişki için potansiyel bir açıklama önerir (Fontaine et al. 2018).

Bu tez kapsamına ilk defa mikrobiyotaya ile transkriptom-seviyesindeki değişimlerin eşzamanlı analizini içeren bir çalışma tasarlandı ve uygulandı. Sonuç olarak elde edilen transkriptom veri seti mikrobiyal değişimleri anlamlandırmak için ve yeni bakış açıları kazanmak için önemli bir kaynak oluşturmaktadır. Söz konusu verinin gelecekte yapılacak fonksiyonel karakterizasyon araştırmalarında büyük katkı sağlanması bekleniyor. Elde edilen transkriptom veri seti, okumaların kalitesi ve sayısı bakımından niteliklidir. Ayrıca bu yeni kaynak bu alandaki önemli bir boşluğu doldurmaktadır ve gelecek çalışmalar için uygun bir kaynak oluşturmaktadır. Bundan sonraki araştırmaların çıkış noktası olarak açısından elde edilen transkriptom verisinin aşağı akış (downstream) biyoinformatik analizlerinin yapılması önerilebilir. Bu yolla farklı gruplar arasında ifade düzeyi istatistiksel açıdan anlamlı olarak değişen genler ve/veya aday biyobelirteçler belirlenebilir. Bir sonraki basamak olarak da anlamlı değişim gösteren mRNA ürünlerinin (gene products) yani proteinlerin birbirleri ile etkileşimleri DAVID (<https://david-d.ncifcrf.gov/home.jsp>) ve STRING (<https://string-db.org/>) veri bankaları aracılığı ile listelenebilir ve Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>) programı aracılığıyla görsel (etkileşim ağı) hale getirilebilir.

Hazırlanan bu tez sadece iki omik bilgiyi kapsamaktadır. Oysa hızla yaygınlaşan sekanslama teknolojisi başka olanaklar da sunmaktadır. Proteomik, metabolomik gibi analizler bu teknolojilere örnek olarak verilebilir. Metatranskriptomik verilerinin elde edilmesi, mikrobiyal gen ifade düzeyi hakkında ve mikrop topluluklarının işlevleri hakkında bilgi vermesi açısından değerlidir. Bu yönden bu tür verilerin

oluşturulması metagenomiks çalışmalarını tamamlamak için hayati olabilmektedir (Bashiardes, Zilberman-schapira, and Elinav 2016).

Genel olarak daha uzun vadede diğer mikrobiyota çalışma alanlarında olduğu gibi aksotl rejenerasyon konusunda bütünleyici yaklaşımlara ihtiyaç vardır. Bu açıdan tamamlayıcı bir yöntem olarak multi-omik analizler büyük bir potansiyele sahiptir. Bunlara yönelik bütüncül biyoinformatik metotlar da şu an aktif olarak geliştirilmektedir ve bazı algoritmalar da uygulamaya konulmuştur. Son olarak, daha kapsamlı bir sonuca ulaşmak için omik analizlerle elde edilen bazı sonuçların laboratuvarında valide edilip detaylı olarak araştırılması gerekecektir. Bu deneyler hücrel, moleküler ve fonksiyonel karakterizasyon şeklinde olabilir.

Sonuç olarak bu tez metamorfoz ile birlikte azalan rejenerasyon yeteneğinin, mikrobiyal değişim ile ilişkisini mikrobiyota ve buna tamamlayıcı ek olarak transkriptom seviyesinde ele almıştır. Bu kapsamda metamorfoz öncesi ve sonrasında aksotl yaşam ortamı mikrobiyom değişimi ile, rejenerasyon sırasında değişen mikrobiyota profili ve gen ifadesi araştırılmıştır. Böylece hem yaşam ortamındaki hem de rejenerasyon sırasındaki mikrobiyal değişim ele alınarak bütünsel bir bakış açısı ile rejenerasyon yeteneği incelenmiştir. Bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlara göre, metamorfoz ile birlikte hem canlı organlarında hem de canlı yaşam ortamında mikrobiyota değişmektedir. Elde edilen yeni veri setleri daha önceki omik veri setlerini tamamlayıcı katkı sağlamaktadır. Buna benzer verilerin artması ve bütüncül olarak dikkate alınması bu model organizmanın daha etkili kullanımını kolaylaştıracaktır. Aksotl rejenerasyon konusu gittikçe daha çok dikkatleri üzerine çeken ve çalışmaların gittikçe hızlandığı bir alandır. Bu tezdeki yenilikçi yaklaşımla elde edilen veri setleri ve bulgular aksotl uzuv rejenerasyonu alanında önemli boşluğu doldurmakta ve gelecekte yapılacak daha kapsamlı araştırmalar için bir köprü niteliğini taşımaktadır.

8. SONUÇLAR

Neoteknik ve metamorfik akvaryum su örneklerinde baskın olarak bulunun 7 şube vardı. Bunlardan *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Chlamydiae*, *Cyanobacteria* şubesi üyelerinin bolluğu metamorfik örneklerde azalırken; *Patescibacteria* ve *Proteobacteria* şubeleri üyelerinin bolluğu artmıştır. Metamorfoz sonunda bu şube üyelerinin artışı ilginçtir. Metamorfoz sonrasında artış gösteren bazı türler iki yaşamlıları enfekte eden bazı mantarları baskılayan antimikotikler üretmesi ile bilinirler.

Metamorfik aksolot su örneklerinde bağışıklık sistemini regüle edebilen mikroorganizmalar gözlenmiştir. Yerleşik mikroorganizmaların bağışıklık sistemine katkı sağladığı bilindiğinden, rejenerasyon yeteneği azalan metamorfik aksolotun yaşam ortamında bu türün azalması ilginç bulunmuştur.

Bu tez kapsamına ilk defa mikrobiyotom ile transkriptom-seviyesindeki değişikliklerin eşzamanlı analizini içeren bir çalışma tasarlandı ve uygulandı. Sonuç olarak elde edilen transkriptom veri seti mikrobiyal değişiklikleri anlamlandırmak için ve yeni bakış açıları kazanmak için önemli bir kaynak oluşturmaktadır. Söz konusu verinin gelecekte yapılacak fonksiyonel karakterizasyon araştırmalarında büyük katkı sağlanması beklenmektedir.

9. KAYNAKLAR

- Aballay, Alejandro, and Frederick M. Ausubel. 2001. "Programmed Cell Death Mediated by Ced-3 and Ced-4 Protects *Caenorhabditis Elegans* from Salmonella Typhimurium-Mediated Killing." 98(5).
- Allen, Bennet M. 1925. "The Effects of Extirpation of the Thyroid and Pituitary Glands upon the Limb Development of Anurans." *Experimental Zoology*.
- Alvarado, Alejandro Sánchez, and Panagiotis A. Tsonis. 2006. "Bridging the Regeneration Gap : Genetic Insights from Diverse Animal Models." 7(November):873–84.
- Anon. 2012. "Department of Biology, University of Hildesheim, 31141 Hildesheim, Germany." 1606–24.
- Anon. n.d. "Evidence That Patterning Mechanisms in Developing and Regenerating Limbs Are the Same.Pdf."
- Arnold, Christopher P., M. Shane Merryman, Aleishia Harris-arnold, Sean A. Mckinney, Chris W. Seidel, Sydney Loethen, and Kylie N. Proctor. 2016. "Pathogenic Shifts in Endogenous Microbiota Impede Tissue Regeneration via Distinct Activation of TAK1 / MKK / P38." 1–39.
- Aurora, Arin B., and Eric N. Olson. 2015. "NIH Public Access." 15(1):14–25.
- Autoradiographic, An. 1961. "Of the Blastema in Regenerating the Newt *Triturus Viridescens* Limbs Of." 59:26–59.
- Aytürk, Nilüfer, Berna Yıldırım, and I. Elif. 2016. "Acta Histochemica A Histological Atlas of the Tissues and Organs of Neotenic and Metamorphosed Axolotl." 118:746–59.
- Baker, G. C., J. J. Smith, and D. A. Cowan. 2003. "Review and Re-Analysis of Domain-Specific 16S Primers." 55:541–55.
- Bashiardes, Stavros, Gili Zilberman-schapira, and Eran Elinav. 2016. "Use of Metatranscriptomics in Microbiome Research." 19–25.
- Bates, Kieran A., Jennifer M. G. Shelton, Victoria L. Mercier, and Kevin P. Hopkins. 2019. "Captivity and Infection by the Fungal Pathogen *Batrachochytrium* Salamandrivorans Perturb the Amphibian Skin Microbiome." 10(August):1–13.

- Bosak, Viktoria, K. E. I. Murata, Oliver Bludau, and Michael Brand. 2018. "Role of the Immune Response in Initiating Central Nervous System Regeneration in Vertebrates : Learning from the Fish." 417:403–17.
- Brandon RA. 1989. "Natural History of the Axolotl and Its Relationship to Other Ambystomatid Salamanders." Pp. 13–21 in *In developmental biology of the axolotl*.
- Brown, Donald D., and Liquan Cai. 2007. "Amphibian Metamorphosis." 306:20–33.
- Bryant, Donald M., Kimberly Johnson, Tia Ditommaso, Timothy Tickle, Matthew Brian, Duygu Payzin-dogru, Tae J. Lee, Nicholas D. Leigh, Tzu-hsing Kuo, G. Davis, Joel Bateman, Sevara Bryant, Anna R. Guzikowski, Stephanie L. Tsai, William Ye, Robert M. Freeman Jr, Leonid Peshkin, Clifford J. Tabin, Brian J. Haas, and Jessica L. Whited. 2017. "Identification of Limb Regeneration Factors." 18(3):762–76.
- Bryant, Susan V., Vernon French, and Peter J. Bryant. 1981. "Distal Regeneration and Symmetry." *Science* 212(4498):993–1002.
- Bryant, Susan V, Tetsuya Endo, and David M. Gardiner. 2002. "Vertebrate Limb Regeneration and the Origin of Limb Stem Cells." 896:887–96.
- Caporaso, J. Gregory, Christian L. Lauber, William A. Walters, Donna Berg-lyons, Catherine A. Lozupone, Peter J. Turnbaugh, Noah Fierer, and Rob Knight. 2010. "Global Patterns of 16S RRNA Diversity at a Depth of Millions of Sequences per Sample."
- Chakravorty, Soumitesh, Danica Helb, Michele Burday, and Nancy Connell. 2008. "NIH Public Access." 69(2):330–39.
- Chan, Rebecca J., Mervin C. Yoder. 2004. "The Multiple Facets of Hematopoietic Stem Cells." *Current Neurovascular Research* 197–206.
- Christensen, Randolph N., Michael Weinstein, and Roy A. Tassava. 2001. "Fibroblast Growth Factors in Regenerating Limbs of Ambystoma: Cloning and Semi-Quantitative RT-PCR Expression Studies." *Journal of Experimental Zoology* 290(5):529–40.
- Crowner, Anne, Shivam Khatri, Dana Blichmann, and S. Randal Voss. 2019. "Rediscovering the Axolotl as a Model for Thyroid Hormone Dependent Development." 10(April):1–6.

- Danczak, R. E., M. D. Johnston, C. Kenah, M. Slattery, K. C. Wrighton, and M. J. Wilkins. 2017. "Members of the Candidate Phyla Radiation Are Functionally Differentiated by Carbon- and Nitrogen-Cycling Capabilities." 1–14.
- De, Turan, Ayşe Elif İ, O. Guvanch, and Gürkan Özt. 2019. "Longitudinal 16S RRNA Data Derived from Limb Regenerative Tissue Samples of Axolotl *Ambystoma Mexicanum*." (January):1–7.
- Declercq, Annelies Maria, Freddy Haesebrouck, Wim Van Den Broeck, Peter Bossier, and Annemie Decostere. 2013. "Columnaris Disease in Fish : A Review with Emphasis on Bacterium-Host Interactions." 1–17.
- Demircan, Turan, Guvanch Ovezmyradov, Berna Yıldırım, İlknur Keskin, and Ayşe Elif İlhan. 2018. "Experimentally Induced Metamorphosis in Highly Regenerative Axolotl (*Ambystoma Mexicanum*) under Constant Diet Restructures Microbiota." (January):1–12.
- Denis, Jean-François, Mathieu Lévesque, Simon D. Tran, Aldo-Joseph Camarda, and Stéphane Roy. 2013. "Axolotl as a Model to Study Scarless Wound Healing in Vertebrates: Role of the Transforming Growth Factor Beta Signaling Pathway." *Advances in Wound Care* 2(5):250–60.
- Duchaud, Eric, Mekki Boussaha, Valentin Loux, Christian Michel, Brigitte Kerouault, Stanislas Mondot, Pierre Nicolas, Robert Bossy, Christophe Caron, Philippe Bessie, Fabien Dumetz, and Michel Le He. 2007. "Complete Genome Sequence of the Fish Pathogen *Flavobacterium Psychrophilum*." 25(7):763–69.
- Edwards, Ruth, and Keith G. Harding. 2004. "Bacteria and Wound Healing Colonisation Contamination." 91–96.
- Endo, Tetsuya, Susan V Bryant, and David M. Gardiner. 2004. "A Stepwise Model System for Limb Regeneration." 270:135–45.
- Epstein, William L., and Howard I. Maibach. 1965. "Cell Renewal in Human Epidermis." *Archives of Dermatology* 92(4):462–68.
- Farkas, Johanna E., and James R. Monaghan. 2015. "Chapter 3 Housing and Maintenance of *Ambystoma Mexicanum* , the Mexican Axolotl." 1290:27–46.
- Ferris, Donald R., Akira Satoh, Berhan Mandefro, Gillian M. Cummings, David M. Gardiner, and Elizabeth L. Rugg. 2010. "Ex Vivo Generation of a Functional and Regenerative Wound Epithelium from Axolotl (*Ambystoma Mexicanum*)

Skin.” 715–24.

- Fontaine, Samantha S., Alexander J. Navarro, and Kevin D. Kohl. 2018. “Environmental Temperature Alters the Digestive Performance and Gut Microbiota of a Terrestrial Amphibian.”
- Fox, W. F. 1986. “Cellular Contribution from Dermis and Cartilage to the Regenerating Limb Blastema in Axolotls.” 260:256–60.
- Gardiner, David M., Bruce Blumberg, Yuriko Komine, and Susan V Bryant. 1995. “Regulation of HoxA Expression in Developing and Regenerating Axolotl Limbs.” 17311741:1731–41.
- Gerber, Tobias, Prayag Murawala, Dunja Knapp, Wouter Masselink, Sarah Hermann, Malgorzata Gac-santel, Sergej Nowoshilow, Shahryar Khattak, Joshua Currie, J. Gray Camp, Elly M. Tanaka, and Barbara Treutlein. 2019. “Europe PMC Funders Group Single-Cell Transcriptomics Uncovers Molecular Funneling of Cell Identities during Axolotl Limb Regeneration.” 362(6413).
- Ghosh, Sukla. 2016. “Human Regeneration: An Achievable Goal or a Dream?” *Journal of Biosciences* 41(1):157–65.
- Giannoukos, Georgia, Dawn M. Ciulla, Katherine Huang, Brian J. Haas, Jacques Izard, Joshua Z. Levin, Jonathan Livny, Ashlee M. Earl, Dirk Gevers, Doyle V Ward, Chad Nusbaum, Bruce W. Birren, and Andreas Gnirke. 2012. “Efficient and Robust RNA-Seq Process for Cultured Bacteria and Complex Community Transcriptomes.” *Genome Biology* 13(3):r23.
- Godwin, James W., and Jeremy P. Brookes. 2006. “Regeneration , Tissue Injury and the Immune Response.” 423–32.
- Good, C., J. Davidson, G. D. Wiens, T. J. Welch, and S. Summerfelt. 2015. “Short Communication Flavobacterium Branchiophilum and F . Succinicans Associated with Bacterial Gill Disease in Rainbow Trout Oncorhynchus Mykiss (Walbaum) in Water Recirculation Aquaculture Systems.” (2011):409–13.
- Grayl, Michael W., David Sankoff, Robert J. Cedergren, Recherche De Mathematiques Appliquees, De Biochimie, and Universit De Montrwal. 1984. “Nucleic Acids Research.” 12(14):5837–52.
- Grefte, Sander, Anne Marie Kuijpers-Jagtman, Ruurd Torensma, and Johannes W. Von Den Hoff. 2007. “Skeletal Muscle Development and Regeneration.” *Stem*

Cells and Development 16(5):857–68.

- Groef, Bert De, Sylvia V. H. Grommen, and Veerle M. Darras. 2018. “General and Comparative Endocrinology Forever Young : Endocrinology of Paedomorphosis in the Mexican Axolotl (*Ambystoma Mexicanum*).” *General and Comparative Endocrinology* (March):0–1.
- Han, Manjong, Xiaodong Yang, Gail Taylor, Carol A. Burdsal, Rosalie A. Anderson, and K. E. N. Muneoka. 2005. “Limb Regeneration in Higher Vertebrates : Developing a Roadmap.” 14–24.
- Hardt, Wolf-dietrich. 2008. “The Role of Microbiota in Infectious Disease.” (February):107–14.
- Harty, Mark, Anton W. Neff, Michael W. King, and Anthony L. Mescher. 2003. “Regeneration or Scarring : An Immunologic Perspective AND REGENERATION IN.” 268–79.
- Herrmann, Martina, Carl-eric Wegner, Martin Taubert, Patricia Geesink, Katharina Lehmann, Lijuan Yan, Robert Lehmann, Kai Uwe Totsche, and Kirsten Küsel. 2019. “Predominance of Cand . Patescibacteria in Groundwater Is Caused by Their Preferential Mobilization From Soils and Flourishing Under Oligotrophic Conditions.” 10(June):1–15.
- Hietaniemi, K., J. Peltonen, and P. Paavolainen. 1995. “An Experimental Model for Non-Union in Rats.” *Injury* 26(10):681–86.
- Hylidae, Anura. 2020. “Critical Thermal Limits Do Not Vary between Wild- Caught and Captive-Bred Critical Thermal Limits Do Not Vary between Wild - Caught and Captive - Bred Tadpoles of *Agalychnis Spurrelli* (Anura : Hylidae).” (January).
- Iii, Jill E. Clarridge. 2004. “Impact of 16S RRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases.” 17(4):840–62.
- Johnston, Paul R., and Jens Rolff. 2015. “Host and Symbiont Jointly Control Gut Microbiota during Complete Metamorphosis.” 1–11.
- Knapp, Dunja, Herbert Schulz, Cynthia Alexander Rascon, Michael Volkmer, Juliane Scholz, Eugen Nacu, Mu Le, Sergey Novozhilov, Akira Tazaki, Stephanie Protze, Tina Jacob, Norbert Hubner, Bianca Habermann, and Elly M.

- Tanaka. 2013. "Comparative Transcriptional Profiling of the Axolotl Limb Identifies a Tripartite Regeneration-Specific Gene Program." 8(5).
- Knight, Rob, Jose Navas, Robert A. Quinn, Jon G. Sanders, and Qiyun Zhu. 2018. "Best Practices for Analysing Microbiomes." *Nature Reviews Microbiology* 16(July):410–22.
- Kragl, Martin, Dunja Knapp, Eugen Nacu, Shahryar Khattak, Malcolm Maden, Hans Henning Epperlein, and Elly M. Tanaka. 2009. "Cells Keep a Memory of Their Tissue Origin during Axolotl Limb Regeneration." *Nature* 460(7251):60–65.
- Lee, Fredrick J., B. Katherine, E. Benjamin, Fredrick J. Lee, Katherine B. Williams, Michael Levin, and Benjamin E. Wolfe. 2018. "The Bacterial Metabolite Indole Inhibits Regeneration of the Planarian Flatworm *Dugesia Japonica* The Bacterial Metabolite Indole Inhibits Regeneration of the Planarian Flatworm *Dugesia Japonica*." *ISCIENCE* 10:135–48.
- Ley, Ruth E., Justin L. Sonnenburg, Daniel A. Peterson, and Jeffrey I. Gordon. 2005. "Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine." (March):1915–21.
- Lu, Jang-jih, Cherng-lih Perng, Shih-yi Lee, and Chih-chieng Wan. 2000. "Use of PCR with Universal Primers and Restriction Endonuclease Digestions for Detection and Identification of Common Bacterial Pathogens in Cerebrospinal Fluid." 38(6):2076–80.
- Maden, Malcolm. 2018. "The Evolution of Regeneration – Where Does That Leave Mammals?" *International Journal of Developmental Biology* 62(6–8):369–72.
- Manuscript, Author. 2013. "NIH Public Access." 247–72.
- March, Accepted, and The Mexican. 1992. "Thyroid Hormone Receptors and Lodothyronine Developing Mexican Axolotl , *Ambystoma Deiodinases Mexicanum* in The."
- Martin, Paul, Deana D. Souza, Julie Martin, Richard Grose, Lisa Cooper, Rich Maki, Scott R. Mckercher, Inn Fields, London Wca, and La Jolla. 2003. "Wound Healing in the PU . 1 Null Mouse — Tissue Repair Is Not Dependent on Inflammatory Cells." 13:1122–28.
- Mccusker, Catherine, Susan V Bryant, and David M. Gardiner. 2015. "The Axolotl Limb Blastema : CellulMccusker, Catherine, Susan V Bryant, and David M. Gardiner. 2015. 'The Axolotl Limb Blastema : Cellular and Molecular

- Mechanisms Driving Blastema Formation and Limb Regeneration in Tetrapods.’ 54–71. *Ar and Molecular Mecha.*” 54–71.
- McCusker, Catherine, and David M. Gardiner. 2011. “The Axolotl Model for Regeneration and Aging Research: A Mini-Review.” *Gerontology* 57(6):565–71.
- Mcfall-ngai, Margaret, Michael G. Had, Thomas C. G. Bosch, Hannah V Carey, Tomislav Domazet-lo, Angela E. Douglas, Nicole Dubilier, Gerard Eberl, Tadashi Fukami, Scott F. Gilbert, Ute Hentschel, and Nicole King. 2013. “Animals in a Bacterial World , a New Imperative for the Life Sciences.” 110(9):3229–36.
- Mckenzie, Valerie J., Robert M. Bowers, Noah Fierer, Rob Knight, and Christian L. Lauber. 2011. “Co-Habiting Amphibian Species Harbor Unique Skin Bacterial Communities in Wild Populations.” *The ISME Journal* 6(3):588–96.
- Mead, Kristina S. 2005. “An Investigative Laboratory Exercise Examining the Cell Signaling and Regulatory Properties of Neurons in the Regenerating Forelimbs of the Axolotl *Ambystoma Mexicanum*.” *Journal of Undergraduate Neuroscience Education* 4(1):17–21.
- Mescher, Anthony L., and Anton W. Neff. 2005. “Regenerative Capacity and the Developing Immune System.” 39–66.
- Mescher, Anthony L., and Anton W. Neff. 2006. “Limb Regeneration in Amphibians : Immunological Considerations.” 6:1–11.
- Minnaganti, Venkat R., Pankaj J. Patel, Dan Iancu, Paul E. Schoch, Burke A. Cunha, Stony Brook, and New York. 2000. “Necrotizing Fasciitis Caused by *Aeromonas Hydrophila*.” (August):306–8.
- Monaghan, James R., Adrian C. Stier, Matthew D. Smith, Malcolm Maden, Ashley W. Seifert, and Bret Pasch. 2014. “Experimentally Induced Metamorphosis in Axolotls Reduces Regenerative Rate and Fidelity.” 2–14.
- Mondolj, M. 1979. “Thyroxine Concentrations Metamorphosing in Blood Serum and Pericardial Tadpoles and of Adult Frogs ’ Fluid of.” 349:343–49.
- Montoro, Daniel, and Michael T. Longaker. n.d. “Rethinking the Blastema.” 1097–1103.
- Muletz-wolz, Carly R., Jose G. Almario, Samuel E. Barnett, Graziella V Direnzo, An

- Martel, Frank Pasmans, Kelly R. Zamudio, Luís Felipe Toledo, Karen R. Lips, and Kimberly B. Ritchie. 2017. "Inhibition of Fungal Pathogens across Genotypes and Temperatures by Amphibian Skin Bacteria." 8(August):1–10.
- Mullen, Lina M., Susan V Bryant, Maureen A. Torok, Bruce Blumberg, and David M. Gardiner. 1996. "Nerve Dependency of Regeneration : The Role of Distal-Less and FGF Signaling in Amphibian Limb Regeneration." 3497:3487–97.
- Nakajima, Keisuke. 1997. "Induction of Apoptosis and CPP32 Expression by Thyroid Hormone in a Myoblastic Cell Line Derived from Tadpole Tail *." 272(8):5122–27.
- Namenwirth, Marion. 1974. "The Inheritance of Cell Differentiation in the Axolotl 'y during Limb Regeneration." 56:42–56.
- Oates, Phillip S., and Adrian R. West. 2006. "Heme in IntestinOates, P. S., & West, A. R. (2006). Heme in Intestinal Epithelial Cell Turnover, Differentiation, Detoxification, Inflammation, Carcinogenesis, Absorption and Motility. *World Journal of Gastroenterology*, 12(27), 4281–4295. <https://doi.org/>." *World Journal of Gastroenterology* 12(27):4281–95.
- Oviedo, Néstor J., and Wendy S. Beane. 2009. "Regeneration: The Origin of Cancer or a Possible Cure?" *Seminars in Cell and Developmental Biology* 20(5):557–64.
- Page, Robert B., James R. Monaghan, Amy K. Samuels, Jeramiah J. Smith, Christopher K. Beachy, and S. Randal Voss. 2007. "Microarray Analysis Identifies Keratin Loci as Sensitive Biomarkers for Thyroid Hormone Disruption in the Salamander *Ambystoma Mexicanum*." *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 145(1):15–27.
- Page, Robert B., and S. Randal Voss. 2017. "Induction of Metamorphosis in Axolotls (*Ambystoma Mexicanum*)." 4(8):9–11.
- Peer, Yves Van De, Sabine Chapelle, Rupert De Wachter, Departement Biochemie, Universiteit Antwerpen Uia, and B. Antwerpen. 1996. "A Quantitative Map of Nucleotide Substitution Rates in Bacterial rRNA." 24(17):3381–91.
- Press, Pergamon, Physiology Group, Biomedical Sciences Division, Cell Biology, Regeneration Group, and Population Biology. 1993. "MACROPHAGE RESPONSE DURING AXONAL REGENERATION IN THE AXOLOTL

- CENTRAL AND PERIPHERAL NERVOUS SYSTEM.” 54(3):781–89.
- Rakoff-nahoum, Seth, Justin Paglino, Fatima Eslami-varzaneh, Stephen Edberg, and Ruslan Medzhitov. 2004. “Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis.” 118:229–41.
- Roy, Stéphane, and Mathieu Lévesque. 2006. “Limb Regeneration in Axolotl : Is It Superhealing ?” 6:12–25.
- Sannino, David R., Adam J. Dobson, and Katie Edwards. 2018. “Crossm The *Drosophila Melanogaster* Gut Microbiota Provisions Thiamine to Its Host.” 9(2):1–16.
- Satoh, A., G. M. C. Graham, S. V Bryant, and D. M. Gardiner. 2008. “Neurotrophic Regulation of Epidermal Dedifferentiation during Wound Healing and Limb Regeneration in the Axolotl (*Ambystoma Mexicanum*).” 319:321–35.
- Shahi, Shailesh K., Samantha N. Freedman, and Ashutosh K. Mangalam. 2017. “Gut Microbiome in Multiple Sclerosis : The Players Involved and the Roles They Play.” 8(6):607–15.
- Sicard, R. 1985. *In Regulation of Vertebrate Limb Regeneration*. edited by R. Sicard.
- Simkin J, Han M, Yu L, Yan M, Muneoka K. 2013. “The Mouse Digit Tip: From Wound Healing to Regeneration.” *Methods Mol Biol*.
- Singer, Marcus. 1974. “Neurotrophic Control of Limb Regeneration in the Newt.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 228(1):308–21.
- Singer, Marcus, and Sakae Inoue. 1964. “The Nerve and the Epidermal Apical Cap in Regeneration of the Forelimb of Adult Triturus.” *Journal of Experimental Zoology* 155(1):105–15.
- Sommer, Felix, and Fredrik Bäckhed. 2013. “The Gut Microbiota — Masters of Host Development and Physiology.” *Nature Publishing Group* 11(4):227–38.
- Stocum, David L. 2011. “The Role of Peripheral Nerves in Urodele Limb Regeneration.” 34:908–16.
- Street, Gower, and Charles Bell House. 1997. “Wound Healing in Embryos : A Review.” 215–28.
- Sttger, Erik C. B. 1989. “Rapid Determination of Bacterial Ribosomal RNA Sequences by Direct Sequencing of Enzymatically Amplified DNA.” 65:171–76.

- Sugiura, Takuji, Heng Wang, Rico Barsacchi, Andras Simon, and Elly M. Tanaka. 2016. "Europe PMC Funders Group MARCKS-Like Protein Is an Initiating Molecule in Axolotl Appendage Regeneration." 531(7593):237–40.
- Taghiyar, Leila, Samaneh Hosseini, Fatemeh Safari, Fatemeh Bagheri, and Nesa Fani. n.d. "New Insight into Functional Limb Regeneration : A to Z Approaches."
- The, Source, Quarterly Review, No December, Scott F. Gilbert, Jan Sapp, and Alfred I. Tauber. 2013. "A Symbiotic View of Life : We Have Never Been Individuals Author (s): Scott F . Gilbert , Jan Sapp and Alfred I . Tauber A SYMBIOTIC VIEW OF LIFE : WE HAVE NEVER BEEN INDIVIDUALS." 87(4):325–41.
- Tile, I. 1912. "Feeding Experiments on Tadpoles ."
- Trautwein, Christian. 2006. "Liver Regeneration." *Zakim and Boyer's Hepatology* (April):23–36.
- Tsai, Stephanie L., Clara Baselga-garriga, and Douglas A. Melton. 2019. "STEM CELLS AND REGENERATION Blastemal Progenitors Modulate Immune Signaling during Early Limb Regeneration."
- Tweedell, Kenyon S. 2010. "The Urodele Limb Regeneration Blastema: The Cell Potential." *TheScientificWorldJournal* 10:954–71.
- Vijayan, Nidhi, Kimberley A. Lema, Brian T. Nedved, and Michael G. Hadfield. 2019. "Microbiomes of the Polychaete Hydroides Elegans (Polychaeta : Serpulidae) across Its Life - History Stages." *Marine Biology* 1–13.
- Voss, S. Randal, Hans H. Epperlein, and Elly M. Tanaka. 2009. "Ambystoma Mexicanum, the Axolotl: A Versatile Amphibian Model for Regeneration, Development, and Evolution Studies." *Cold Spring Harbor Protocols* 4(8).
- Voss, S. Randal, Alex Palumbo, Radha Nagarajan, David M. Gardiner, Ken Muneoka, Arnold J. Stromberg, and Antony T. Athipposhy. 2015. "Gene Expression during the First 28 Days of Axolotl Limb Regeneration I: Experimental Design and Global Analysis of Gene Expression." *Regeneration* 2(3):120–36.
- Walke, Jenifer B., Matthew H. Becker, Stephen C. Loftus, Leanna L. House, Guy Cormier, Roderick V Jensen, and Lisa K. Belden. 2014. "Amphibian Skin May Select for Rare Environmental Microbes." 2207–17.

Wallace, By H., A. Watson, and M. Egar. 1981. "Regeneration of Subnormally Innervated Axolotl Arms." 62:1–11.

Wang, Heng, Shahryar Khattak, Maritta Schuez, Kathleen Roensch, Tatiana Sandoval-guzma, Eugeniu Nacu, Akira Tazaki, Alberto Joven, and Elly M. Tanaka. 2014. "Article Fundamental Differences in Dedifferentiation and Stem Cell Recruitment during Skeletal Muscle Regeneration in Two Salamander Species." 174–87.

Wang, Jing. 2018. "Neutrophils in Tissue Injury and Repair." 531–39.



10.ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
23/08/2017	48		Yrd. Doç. Dr. Turan DEMİRCAN

"Aksolot kol rejenerasyonu sürecinde mikrobiyota etkisinin mikrobiyom ve transkriptom dinamiği açısından araştırılması" başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna "Oybirliği" ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: Şubat 2018, 24 ay

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Turan DEMİRCAN	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet OZANSOY	
Üye	Öğr. Gör. Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Uzm.Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	