



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**PRİMER İMMÜN YETERSİZLİĞİ OLAN
ÇOCUKLARDA DİŞ ÇÜRÜKLERİNDE
BULUNAN MİKROBİYAL TOPLULUĞUN 16S
rRNA GEN BAZLI METAGENOMİK ANALİZİ
VE TÜKÜRÜK TAMPONLAMA KAPASİTESİ
DEĞERLENDİRMESİ**

Bushra Lutf Ahmed AL-KEBSI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Mayıs-2022
KONYA
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ KABUL VE ONAYI

Bushra Lutf Ahmed AL-KEBSI tarafından hazırlanan “Primer İmmün Yetersizliği Olan Çocuklarda Diş Çürüklerinde Bulunan Mikrobiyal Topluluğun 16S rRNA Gen Bazlı Metagenomik Analizi ve Tükürük Tamponlama Kapasitesi Değerlendirmesi” adlı tez çalışması 27/05/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Gökhan SADI

.....

Danışman

Prof. Dr. Gökhan KARS

.....

Üye

Dr. Öğretim Üyesi Aslı DAĞERİ

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun .../.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim KALAYCI
FBE Müdürü

*Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 211315004 nolu proje ile desteklenmiştir.

**Dr. Öğretim Üyesi Hazal ÖZER bu tez çalışmasının ikinci danışmanıdır.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Bushra Lutf Ahmed AL-KEBSI

Tarih: 27/05/2022

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PRİMER İMMÜN YETERSİZLİĞİ OLAN ÇOCUKLARDA DIŞ ÇÜRÜKLERİNDE BULUNAN MİKROBİYAL TOPLULUĞUN 16S rRNA GEN BAZLI METAGENOMİK ANALİZİ VE TÜKÜRÜK TAMPONLAMA KAPASİTESİ DEĞERLENDİRMESİ

Bushra Lutf Ahmed AL-KEBSI

**Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

- 1. Danışman: Prof. Dr. Gökhan KARS**
- 2. Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Hazal ÖZER**

2022, 100 Sayfa

Jüri

**Prof. Dr. Gökhan KARS
Prof. Dr. Gökhan SADİ
Dr. Öğretim Üyesi Aslı DAĞERİ**

Bağışıklık sistemi ile ilgili hastalıklara bağlı olarak oral mikrobiyal kompozisyondaki değişiklik dış çürüklerine neden olan önemli bir nedendir. Bu çalışmanın amacı, 16S rRNA tabanlı metagenomik yaklaşımla primer immün yetmezlik hastalığı (PİYH) olan çocukların dış çürüğü mikrobiyotasını araştırmak ve sonuçları sağlıklı deneklerden elde edilen sonuçlarla karşılaştırmaktır. Bu doğrultuda, dış çürüklü ve primer immün yetmezliği olan on beş çocuktan oluşan bir hasta grubu ile dış çürüklü on beş sağlıklı çocuktan oluşan bir kontrol grubu çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışma deneklerinin DMFT indeksi, tükürük akış hızı ve tamponlama kapasitesi değerlendirilmiştir. Daha sonra, dış çürüklerinden ekstrakte edilen DNA'lar, 16S rRNA geninin V3-V4 hiper değişken bölgesini hedefleyen yüksek verimli Illumina dizileme teknolojisi ile incelenmiştir. Dizileme sonucu elde edilen okumaların kalitesi, Genomes OnLine Database (GOLD) ve Trimmomatic aracı kullanılarak kontrol edilerek ve geliştirilmiştir. Taksonomik profil oluşturma için, okumalar, Ribosomal Database Project (RDP) sınıflandırıcısı kullanılarak Greengenes veritabanına dayalı olarak hedef organizmalara göre hizalanmıştır. Sonuçlara göre iki grubun DMFT skoru, tükürük akış hızı ve tamponlama kapasitesi benzer bulunmuştur. Buna ek olarak, akış hızı ve tamponlama kapasitesi, %95 güvenle tür bolluğu ile hiçbir korelasyon göstermemiştir. Metagenomik analiz, tüm numunelerde 2440 bakteri suşunun tanımlanmasıyla sonuçlanmıştır. PİYH ve kontrol gruplarının çürük mikrobiyotası, PİYH grubunda daha fazla bulunan *Prevotella melaninogenica* CP002122 ve *Prevotella salivae* AB108826 dışında önemli bir farklılık göstermemiştir. Her bir PİYH alt grubunun tür bolluğu da kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. *Actinomyces naeslundii*, *Lautropia mirabilis* ve *Prophyromonas endodontalis* kontrol grubunda immün disregülasyon grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Kombine immün yetmezliği olan çocuklar ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ancak, *Parascardovia denticolens*, *Scardovia wiggsiae*, *Atopobium parvulum*, *Prevotella nigrescens* ve *Prevotella*

histicola kombine immün yetmezlik tanısı konulan ve kök hücre nakli tedavisi alan çocuklarda kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. *Streptococcus mutans* bolluğu kontrol grubunda antikor eksikliği olan çocuklara göre daha yüksek bulunurken, *Lactobacillus fermentum* ve *Macelibacteroides fermentans* antikor eksikliği olan çocuklarda daha yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak, PİYH ve kontrol gruplarının çürük mikrobiyotasındaki farklılıklar, bakteriyel kompozisyonun değişmesinde bağışıklık sisteminin rolünün olduğunu ortaya koymuştur. Bakteri kompozisyonundaki bu değişiklik, bakterilerin daha karyojenik veya patojenik olmaları için uygun ortam sağlayabileceği öngörülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Diş çürüğü; Metagenomik; 16S rRNA; Primer immün yetmezliği

ABSTRACT

MS THESIS

16S rRNA GENE-BASED METAGENOMIC ANALYSIS OF THE MICROBIAL COMMUNITY IN DENTAL CARIES IN CHILDREN WITH PRIMARY IMMUNODEFICIENCY AND EVALUATION OF SALIVA BUFFERING CAPACITY

Bushra Lutf Ahmed AL-KEBSI

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN MOLECULAR BIOLOGY AND
GENETICS**

- 1. Advisor: Prof. Dr. Gökhan KARS**
- 2. Advisor: Assist. Prof. Dr. Hazal ÖZER**

2022, 100 Pages

Jury

Prof. Dr. Gökhan KARS

Prof. Dr. Gökhan SADİ

Assist. Prof. Dr. Aşlı DAĞERİ

The alteration in oral microbial composition due to immune system-related diseases is an important reason to cause dental caries. The purpose of this study was to investigate caries microbiota of children with primary immunodeficiency disorder (PID) by 16S rRNA-based metagenomic approach and compare the results to those obtained from healthy subjects. In this regard, a group of fifteen primary immunodeficiency patients with caries and a group of fifteen healthy children with caries as a control group were enrolled. DMFT index, saliva flow rate and buffering capacity of each study subject were assessed before metagenomic analyses. Then, DNAs extracted from tooth decays were examined by high-throughput sequencing targeting the V3–V4 hypervariable region of the 16S rRNA gene using Illumina sequencing. The quality of readings was checked and improved using Genomes OnLine Database (GOLD) and Trimmomatic tool. For taxonomic profiling, readings were aligned to target organisms based on the Greengenes database using the Ribosomal Database Project (RDP) Classifier. According to the results, DMFT score, saliva flow rate and buffering capacity of the two groups were found to be similar. Moreover, flow rate and buffering capacity had no correlation with species abundance with 95% confidence. Metagenomic analysis resulted in identification of 2440 bacterial strains in all samples. The caries microbiota of PID and control groups showed no significant differences except for *Prevotella*

melaninogenica CP002122 and *Prevotella salivae* AB108826 which were more abundant in PID group. The species abundance of each PID subgroups was also compared to control group. *Actinomyces naeslundii*, *Lautropia mirabilis* and *Prophyromonas endodontalis* were found to be significantly higher in control group than immune dysregulation group. No significant differences were found between children with combined immunodeficiency and control group. However, *Parascardovia denticolens*, *Scardovia wiggisiae*, *Atopobium parvulum*, *Prevotella nigrescens*, and *Prevotella histicola* were higher in children diagnosed with combined immunodeficiency and had stem-cell transplantation therapy than control group. The abundance of *Streptococcus mutans* was higher in control group than children with antibody deficiency however *Lactobacillus fermentum* and *Macellibacteroides fermentans* were higher in children with antibody deficiency. In conclusion, the differences in caries microbiota between PID and control groups indicate the role of the immune system in altering the bacterial composition. This alteration in bacterial composition may provide the bacteria with the suitable environment to be more cariogenic or pathogenic.

Keywords: Dental caries; Metagenomic; 16S rRNA; Primary immunodeficiency disorder

ÖNSÖZ

Bu tezin hazırlanmasında desteklerini esirgemeyen ve bu tezi yazarken bana güç veren, yüksek lisans danışman hocalarım Prof. Dr. Gökhan KARS ve Dr. Öğretim Üyesi Hazal ÖZER'e teşekkür ederim. Değerli tez jüri üyeleri Prof. Dr. Gökhan SADİ ve Dr. Öğretim Üyesi Aslı DAĞERİ ile Prof. Dr. Şükrü Nail GÜNER, Ahmet Sami AKIN, Dr. İsmail ATİZ ve Ömer Faruk ATİZ'e katkılarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim. NEÜ, Diş Hekimliği Fakültesi, Pedodonti Anabilim Dalı öğretim elamanı ve çalışanları ile Meram Tıp Fakültesi, Çocuk Alerjisi ve İmmünoloji Bilim Dalı öğretim elamanı ve çalışanlarına katkılarından dolayı teşekkür ederim. Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü laboratuvar arkadaşlarıma desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Bana yüksek lisans için tam burs veren Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na (YTB) ve hayatımın her döneminde maddi ve manevi yanımda olan sevgili babam, annem, Eman, Rayhanah, Fatima, Khadijah, Banan, Baha'ya teşekkür ederim.

Bushra Lutf Ahmed AL-KEBSI

Tarih: 27/05/2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
ÖNSÖZ	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
TABLO LİSTESİ	xiii
ŞEKİL LİSTESİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. Primer İmmün Yetmezlik Hastalığı	5
2.1.1. Ağır kombine immün yetmezliği (SCID)	5
2.1.2. İmmün disregulasyon	8
2.1.3. Antikor eksikliği	9
2.2. Metagenomik	10
2.2.1. Metagenomik yaklaşımlar	12
2.2.1.1. Hedeflenmiş dizileme çalışmaları	13
2.2.1.1.1. Veri ön işleme	13
2.2.1.1.2. OTU toplama	16
2.2.1.1.3. Kümeleme algoritmaları	17
2.2.1.1.4. Çeşitlilik analizi	19
2.2.1.1.5. Çeşitlilik indeksleri	20
2.2.1.1.6. Basit görselleştirme teknikleri	Error! Bookmark not defined.
2.2.1.1.7. Amplikon metagenomikleri için boru hatları	24
2.2.1.2. Tüm metagenom shotgun dizileme çalışmaları	25
2.2.1.2.1. Metagenom assembly	26
2.2.1.2.2. Binning yaklaşımları	27
2.2.1.2.3. Taksonomiye bağlı gruplama	28
2.2.1.2.4. Taksonomiden bağımsız binning	29
2.2.1.2.5. Tanımlayıcı ve işlevsel analizler	30
3. MATERYAL VE YÖNTEM	32
3.1. Etik Beyan, Örneklem ve Tükürük Analizleri	32

3.2.	Metagenomik Analiz.....	33
3.2.1.	Metagenomik analiz için diş örneklerinin hazırlanması	33
3.2.2.	Diş çürüklerinden DNA izolasyonu.....	33
3.2.3.	16S rRNA kütüphane hazırlama ve gen dizileme.....	35
3.2.4.	Biyoinformatik ve istatistiksel analiz	43
4.	ARAşTIRMA BULGULARI VE TARTIşMA	45
4.1.	Çalışma Gruplarının Klinik Bilgileri ve Tükürük Testleri	45
4.2.	Genel Mikrobiyal Profil.....	49
4.3.	Alfa ve Beta Çeşitliliği	67
5.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	72
5.1.	Sonuçlar	72
5.2.	Öneriler	74
KAYNAKLAR.....		75

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	Santigrat
L	Litre
M	Metre
M	Molar
N	Nano
A	Alfa
B	Beta
μ	Mikro
pH	H iyon konsantrasyonu
Ort	Ortalama
SD	Standart sapma
H ₂ S	Hidrojen sülfür

Kısaltmalar

A-T	Ataxia-telangiectasia (Ataksi-Telanjektazi)
ADA	Adenozin Deaminaz
AGNB	Anaerobik Gram-Negatif Basiller
<i>ATM</i>	Ataxia-Telangiectasia Mutated Gene
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Base Pair (Baz Çifti)
D	Distance (Mesafe)
DNA-PK	DNA-Dependent Protein Kinase
H	Hasta
HLA	Human Leukocyte Antigens
HSCT	Hematopoietic Stem Cell Transplantation
HTS	High Throughput Sequencing
IBD	İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı
Ig	İmmunoglobulin
IPEX	Immune dysfunction, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked (İmmün Sistem Disfonksiyonu)

ITS	Internal Transcribed Spacer
LRBA	LPS-Responsive Beige-like Anchor Protein
MDS	Multidimensional Scaling
MS	Multipl Sklerozu
NGS	Next Generation Sequencing (Yeni Nesil Dizileme)
OTU	Operational Taxonomic Unit
PCoA	Principal Coordinate Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PIYH	Primer İmmün Yetmezlik Hastalıkları
Q	Quality
QIIME	Quantitative Insights Into Microbial Ecology
RDP	Ribosomal Database Project (Ribozomal Veritabanı Projesi)
RTI	Respiratory Tract Infections (Solunum Yolu Enfeksiyonları)
S	Sağlıklı
SCID	Severe Combined Immunodeficiency (Ağır Kombine İmmün Yetmezliği)
SE	Single-end
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TCR	T Cell Receptor
Treg	T Düzenleyici Hücreler
UniFrac	Unique Fraction
Uu	Unweighted Unifrac
VDJ	Variable (V), Diversity (D), Joining (J)
WMS	Whole Metagenome Sequencing

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1. Çalışma gruplarının klinik bilgileri ve tükürük testleri sonuçları.....	46
Tablo 4.2. Diş örneklerinden izole edilen DNA'lara ait değerler.	49
Tablo 4.3. Örneklerin Shannon, Simpson ve inverse-Simpson indeksleri ve tür sayısı.	70

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. 16S rRNA hiper değişken bölgeleri.	3
Şekil 2.1. SCID’de immünolojik sınıflandırma.....	5
Şekil 2.2. Pürin salvage yolağı.	7
Şekil 2.3. Metagenomik yaklaşımlar.	12
Şekil 2.4. Dizileme hedeflenen bölge.....	14
Şekil 2.5. OTU toplama stratejileri.....	16
Şekil 2.6. Çeşitlilik analizi türleri.....	20
Şekil 2.7. Ağırlıklandırılmamış UniFrac metrik.....	24
Şekil 2.8. Shotgun dizilimi için biyoinformatik stratejisi.....	26
Şekil 2.9. Üç organizma içeren bir veri kümesinden metagenom assembly.	27
Şekil 2.10. Binning yaklaşımları.	28
Şekil 4.1. Tükürük tamponlama kapasitesi ile akış hızının tür sayısı ile korelasyonu	48
Şekil 4.2. Cins seviyesine kadar bir taksonomik birime tanımlanmış okumalar.....	50
Şekil 4.3. Tüm örneklerde en yüksek orana sahip 20 bakteri suşu.....	51
Şekil 4.4. Tüm örneklerde tespit edilen ilk 30 filum.....	52
Şekil 4.5. Tüm örneklerde tespit edilen ilk 30 sınıf.....	53
Şekil 4.6. Tüm örneklerde tespit edilen ilk 30 takım.....	54
Şekil 4.7. Tüm örneklerde tespit edilen ilk 30 aile.....	55
Şekil 4.8. Tüm örneklerde tespit edilen ilk 30 bakteri cinsi.....	56
Şekil 4.9. Tür düzeyinde nispi bolluklar.	57
Şekil 4.10. Hasta ve sağlık grupları arasındaki tür düzeyinde farklılıklar.....	58
Şekil 4.11. PİYH alt gruplarının nisbi bolluk karşılaştırması	61
Şekil 4.12. PİYH alt gruplarında tür dağılımı ve bolluk arasındaki ilişki.....	67
Şekil 4.13. Hasta ve sağlıklı grup arasındaki alfa çeşitlilik analizi	69
Şekil 4.14. Cins düzeyinde temel koordinat analizi (PCoA).....	71

1. GİRİŞ

Sağlıklı bir ağız ortamı, esas olarak bakımlı dişler ve tükürükten oluşur. Tükürük, tükürük bezleri tarafından salgılanan hipotonik sıvıdır. Ağızdaki su, protein, mineraller, enzimler, kan, gıda ve yerleşik mikroorganizmalardan oluşur. İnsan tükürüğü, konuşma, yemek yeme, yutma, dişleri ve ağız mukozasını koruma gibi diğer işlevlere katkıda bulunur. Tükürük ayrıca mikroorganizmalar tarafından üretilen veya diyet yoluyla alınan asitlere karşı tampon görevi görür, bu nedenle pH'ı sabit tutar. Tükürüğün en önemli işlevi, durulama ve tamponlama etkisi ile çürüğü önlemektir (Islas-Granillo ve ark., 2015). Bununla birlikte, tükürüğün akış hızı ve viskozitesi de çürük gelişimini etkileyebilir (Animireddy ve ark., 2014). Diş çürükleri, ağız mikrobiyomu biyofilm-diş yüzeyinde demineralizasyonu arttırdığında ortaya çıkar (Divaris ve ark., 2019). *Streptococcus mutans*, diş çürümesine neden olan en yaygın bakteridir, ancak bazı diş çürüğü bulunan ve bu hastalarda yapılan testlerde *Streptococcus mutans* tespit edilememiştir (Chen ve ark., 2017). Ağız boşluğunda yaklaşık 700 filotip mikroorganizma (genel olarak bakteri) bulunabilmektedir. Bu mikroorganizmalar diş çürükleri, diş eti iltihabı, periodontitis, kandidiyazis, endodontik enfeksiyonlar, ortodontik enfeksiyonlar ve peri-implantitis gibi ağız hastalıkları ile ilişkilidir. Oral mikrobiyota, konakçı bağışıklık sistemini etkiler ve bunun tersi de geçerlidir ve ağız sağlığının iyi olduğu durumlarda, bağışıklık sisteminin, yabancı patojenlerin oluşumunu önleyen ortak, ancak bölgesel bir oral mikrobiyotayı tolere edecek ve kolaylaştıracak şekilde gelişmesi muhtemeldir (Baker ve ark., 2019).

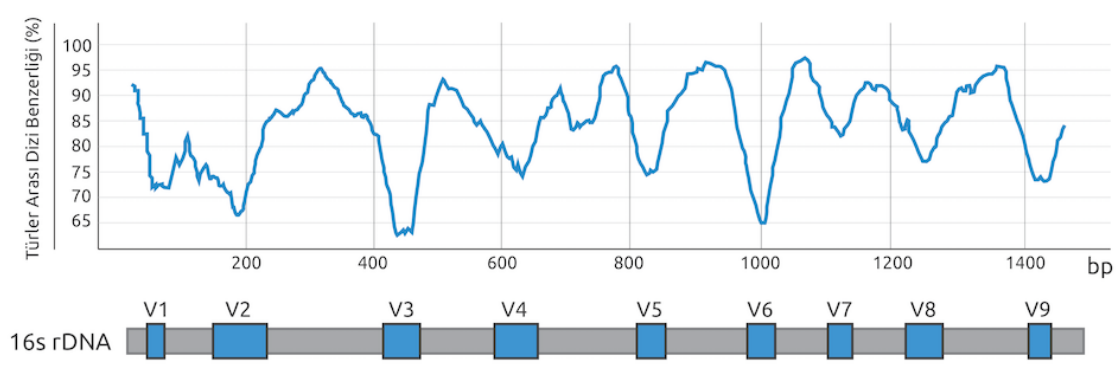
Diş çürükleri bazen şiddetlidir ve anestezi ile acil tedavi gerektiren ciddi bir enfeksiyona neden olur. Çürük patogenezinin nedeni olan mikrobiyal topluluk yeterince açık değildir. Asidojenik türler asit üreterek çürüğe neden olsalar da diğer bazı diş çürüğü vakalarında bulunmazlar (Gross ve ark., 2012). Diş çürükleri, dişin yumuşak ve sert dokusunu tahrip eder ve hayati dokunun ölümüne doğru ilerleyen iltihaplanmaya neden olabilir (Chen ve ark., 2017). Ağız boşluğundaki diş çürüğü oluşumu, insanların farklı yaşlarında görülen yaygın bir hastalıktır. Diş çürükleri plak mikroflorası, bağışıklık

sistemi, karbonhidrat alımı ve ağız hijyeni gibi birçok farklı faktörden kaynaklanmaktadır (Jagathrakshakan ve ark., 2015). İmmün yanıt, lokal oral biyofilmlerin yapısal ve fonksiyonel değişikliklerine neden olabilir. Bu değişiklikler, konakçı ve yerleşik mikrobiyota arasındaki dengenin istikrarını değiştirebilir, böylece periodontitis ve diş çürüklerinin başlamasını ve ilerlemesini tetikleyebilir (Belstrom ve ark., 2017). İzolasyon ve kültürlenme teknikleri, birkaç farklı bakteri türünü izole etmek için tasarlanmıştır. Bu nedenle, bir örnekteki mikrobiyal topluluğu tanımlamak, ölçmek ve geniş bir spektrum analizi sağlamak için yeni bir tekniğe ihtiyaç vardır (Jagathrakshakan ve ark., 2015). Mikrobiyal taksonomik kompozisyon analizi ve mikrobiyal aktivite, ağız sağlığı durumunun bir göstergesi olabilir ve olası farklılıklar, immün yetersizliği olan hastalarda oral hastalıkların potansiyel biyobelirteçleri olarak kullanılabilir. Ağızdan bulaşıcı patojenler ağız boşluğunda iltihaplanma, çoklu sistemik hastalıklar, bakteriyel pnömoni, diyabet, romatoid artrit, iltihaplı bağırsak hastalığı ve kolon kanseri gibi pek çok hastalıkla ilişkilendirilebilir.

Bu tez ile primer immün yetersizliğinin çocukların diş çürüğü mikrobiyotasına etkisinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Bu amaçla primer immün yetersiz ve sağlıklı çocukların diş çürüklerindeki mikrobiyota farklılıkları metagenomik yaklaşımla ortaya çıkarılmıştır. Metagenomik yaklaşım, belirli bir örnekte bakteri varlığını anlamak ve tanımlamak için uygun bir analizdir. Bakteriyel hiyerarşi modelini ve gruplarda bakteri taksonomi düzeyinin karşılaştırmalı prevalansını anlatır (Jagathrakshakan ve ark., 2015). Metagenomik, doğrudan çevresel örneklerden ekstrakte edilen genetik materyalin incelenmesidir. Bu, hangi mikroorganizmaların bulunduğunu ve belirli bir ortamda ne yaptıklarını anlamak için yararlıdır. Bu çalışma ile ilk defa Konya şehrindeki primer immün yetersizliği olan çocukların diş çürüklerindeki bakteri profili ortaya çıkarılmıştır. Çalışma sonucunda primer immün yetersizliğinin çocukların diş çürüklerindeki bakteri profillerini nasıl değiştirdiği ve diğer bakteriyel hastalıklarla yol açabilme durumu değerlendirilmiştir. Uluslararası literatür araştırmamıza göre, Konya ölçeğinde PİY hastalarından elde edilen diş çürükleriyle yapılan metagenomik çalışmaya daha önce

rastlanmamıştır, bu da tez çalışmasının tamamen özgün olduğunu göstermektedir. Diş çürüklerinde bulunan mikroorganizmalar yeme-içme kültürüyle ilişkili de olabilir, bu nedenle Konya'ya özgü bu çalışma, primer immün yetersizliği olan çocuklarda mikrobiyal kompozisyonun ortaya çıkarılması açısından da önem arz etmektedir.

Bu çalışmada diş çürüğü olan sağlıklı ve PİYH hastası çocukların tükürük analizleri (tükürük akış hızı, tamponlama kapasitesi ve bakteri değerlendirmesi) yapıldıktan sonra çürük diş örneklerindeki bakteri kompozisyon ve çeşitlilik analizleri metagenomik yaklaşımla yapılmıştır. Diş çürüğü olan primer immün yetersizliğe sahip çocuklarda metagenomik teknikleri ve analizi için çürüğün kendisini kullanılmıştır. 16S rRNA hiper değişkenliği ile bakteri taksonlarının tanımlanmasında ve sınıflandırılmasında iyi bir markör olduğundan bu çalışmada 16S rRNA-bazlı metagenomik yaklaşım tercih edilmiştir (Şekil 1.1). Tüm bakterilerde bulunan 16S rDNA, yaklaşık 1500 nükleotid uzunluğundadır ve dokuz hiper değişken (V1-V9) bölgeden oluşur. 16S rDNA geni, yüksek oranda korunmuş bölgelerden ve farklı bakteri türlerinin filogenetik sınıflandırması için kullanılan değişken bölgelerden oluşmaktadır.



Şekil 1.1. 16s rRNA hiper değişken bölgeleri.

Son yıllarda, çevresel örneklerde bulunan ve kültüre edilemeyen birçok bakteri türü, 16s rRNA dizilerine göre tanımlanmaktadır (The National Academies Press, 2007). 16s rRNA dizileri GreenGenes, Ribozomal Database Project ve SILVA gibi birçok veri

tabanına kaydedilmiştir. Daha sonra, yeni nesil dizileme gibi yöntemler kullanılarak elde edilen 16s rRNA dizileri bu veri tabanları ile karşılaştırılarak bakteri türleri belirlenmektedir.

Bu tez çalışmasında, 16S rRNA'ya dayalı metagenomik yaklaşım ile primer immün yetmezliği olan çocuk hastaların ve primer immün yetmezliği olmayan çocukların diş çürüklerindeki mikrobiyota analiz edilmiştir. Ayrıca, ağız sağlığının korunmasında önemli olan tükürük akış hızı, pH, tamponlama kapasitesi ile *Streptococcus mutans* ve *Lactobacilli* içeriği de değerlendirilmiştir.

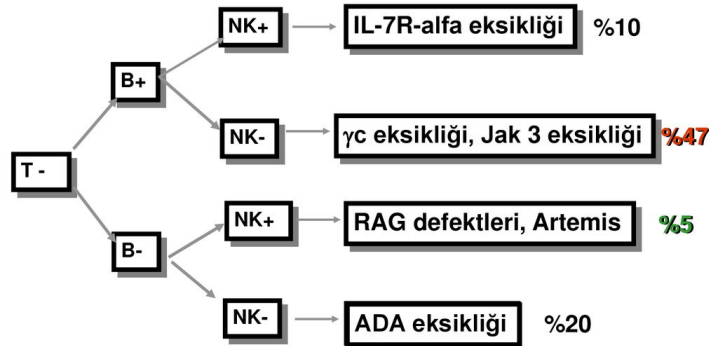
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Primer İmmün Yetmezlik Hastalığı

Primer immün yetmezlik hastalığı (PİYH), bağışıklık sisteminin işlevi veya gelişimi ile ilgili bir bağışıklık sistemi bozukluğudur. PİYH'ler hem doğuştan gelen, hem de adaptif olarak kazanılan bağışıklık sistemlerini (beyaz kan hücreleri, nötrofiller, T ve B lenfositleri, doğal öldürücüler, dendritik hücreler vb.) etkilemektedir. Çoğu PİYH hastasının enfeksiyon riski yüksektir ve erken teşhis ve tedavi bu hastalığa bağlı morbiditeyi önlemektedir (McCusker ve Warrington, 2011). Bağışıklık sistemi, konakçı-mikrop homeostazını (Zheng, 2020) ve ortamdaki bakteri davranışını (proinflamatuvar veya antiinflamatuvar) etkilediğinden, dış çürüğünün başlamasına ya da gelişmesine sebep olmaktadır. Birçok PİYH türü mevcuttur ve bu bölümde tanımları ve bağışıklık sistemini baskılamadaki rolleri ile bazı PİYH örnekleri verilmiştir.

2.1.1. Ağır kombine immün yetmezliği (SCID)

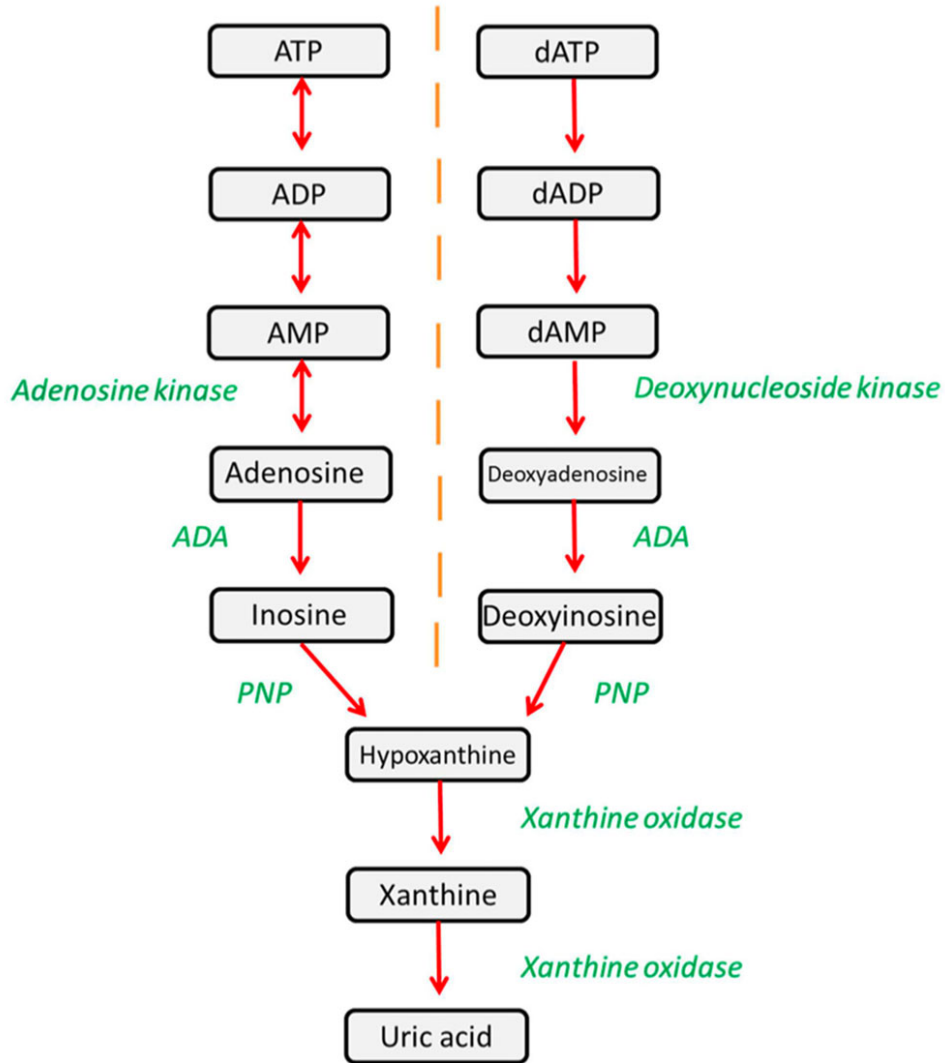
Ağır kombine yetmezliği (SCID) PİYH'nin en ciddi düzensizlik çeşididir (Şekil 2.1) Kalıtsal bir PİYH, bebeklik döneminde bağışıklık sistemini zayıflatan, derin bir bağışıklık yetmezliği durumuyla kendini gösterir. Bu nedenle, bağışıklık sistemi hafif enfeksiyonlarla bile savaşamaz.



Şekil 2.1. SCID'de immünolojik sınıflandırma (Ochs HD ve ark., 2007).

SCID, T hücresi farklılaşmasında veya işlevinde derin bir kusur ile karakterize edilen, T hücrelerinin genetik bir kusurudur (Belström, ve ark., 2017). Ayrıca SCID tipine bağlı olarak B hücreleri ve NK hücreleri de etkilenebilir. NK hücreleri, T hücreleri ve B hücreleri, enfeksiyonlara neden olan bakteri, virüs ve mantarlarla mücadelede kritik öneme sahiptir. SCID tedavisindeki gelişmeler sayesinde hastaların en az 3/4'ü ya tam HLA (human leukocyte antigens) uyumlu ya da kısmi uyumlu kemik iliği transplantasyonu ile tedavi olmuştur (Fischer, 1992). Hematopoetik kök hücre nakli (HSCT) yapılmadığı takdirde SCID'li bebekler genellikle tedavi olmadan ölürlür. Hematopoetik kök hücre transplantasyonu ne kadar erken olursa, o kadar iyi sonuç alınır. İlk 3 ay içinde transplantasyon gerçekleştirilirse en iyi sonuç elde edilir (Fischer, 1992). En sık görülen SCID türleri aşağıda verilmektedir:

- i. ADA eksikliği: Adenozin deaminaz (ADA) enziminin eksikliğinden kaynaklanır. Adenozin deaminaz (ADA), pürin salvage yolağının (Şekil 2.2.) anahtar enzimidir ve ADA genindeki bir mutasyon, enzim eksikliğine yol açmaktadır. ADA fonksiyon bozukluğu, adenozin gibi toksik metabolitlerin birikmesine neden olur. ADA eksikliği, SCID karakterizasyonları, nörogelişimsel eksiklikler ve iskelet anormalliklerine ek olarak lenfositopenidir (T- ve B-lenfositleri ve NK hücre eksikliği) (Flinn ve Gennery 2018).
- ii. Ataksi-telanjiektazi (A-T): Louis-Bar sendromu olarak da bilinen otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. Mutasyona uğramış ataksi-telanjiektazi geni (*ATM*) serebellar dejenerasyon, telanjiektazi, kanser duyarlılığı, radyasyon duyarlılığı ve immün yetmezliğine (immünoglobulin ve antikor eksiklikleri ve lenfopeni) neden olur. Ayrıca A-T hastalarında dermatolojik ve endokrin belirtiler de olabilir. A-T genellikle DNA hasar tepki sendromu olarak adlandırılmıştır (Oviatt ve ark., 2016).



Şekil 2.2. Pürin salvage yoluğı (Gaspar, 2016).

- iii. *RAG2* eksikliği: Adaptif bağışıklık tepkileri, spesifik antijen tanıma yeteneğine sahip reseptörlerin bir ifadesini gerektirmiştir. *RAG* proteinleri, T hücre reseptöründe (*TCR*) genlerin rekombinasyonunu başlatır ve geniş bir antijen tanıma özgüllüğü ile T ve B hücrelerinin üretilmesine izin vermektedir. *RAG2*, *VDJ* rekombinasyonu işlemi için gerekli bir protein kompleksi olan bir *VDJ* (değişken (V), çeşitlili (D) ve katılma (J)) rekombinazı oluşturur. İmmünoglobulin ve T hücre reseptör genlerinin değişken

bölgeleri ise gelişen B ve T lenfositlerinde bir araya gelir. *RAG2* mutasyonları, T ve B lenfositleri ve NK yokluğu ile birlikte ciddi kombine immün yetmezliği ile sonuçlanan klinik ve immünolojik fenotiplerle ilişkilidir. Bununla birlikte, *RAG2* sadece T ve B hücre gelişimini kontrol etmek için değil, aynı zamanda bağışıklık toleransını korumak için de gereklidir (Ottavia ve ark., 2019; Marita ve ark., 2021).

- iv. Artemis eksikliği: *RAG* geninde *V(D)J* segmentleri bir saç toka (hair pin) yapısını oluşturmak üzere birleştirilir. DNA'ya bağımlı protein kinaza (DNA-PK) sahip Artemis nükleaz, bu uçları bağlar ve saç tokasının ucuna yakın tek bir kesim yapar. Kesim bölünme bölgesi değişkendir ve ortaya çıkan antikora aşırı çeşitlilik sağlar ve bağışıklık sisteminin herhangi bir yabancı antijene karşı bir bağışıklık tepkisi oluşturmaya izin verir. Artemis eksikliği olan bireylerde, *V(D)J* rekombinasyonu, saç tokası uçları açılmadığından bloke olur ve bu nedenle SCID olarak bilinen bir durum olan, hiçbir gelişmiş B veya T hücresi üretilmez (Catharina ve ark., 2013).

2.1.2. İmmün disregulasyon

Bağışıklık sistemi süreçlerinin kontrolünde herhangi bir işlevsizliğe bağışıklık düzensizliği denir, örneğin otoimmün hastalıkların patojenitesi bir tür düzensizliktir. İmmün sistem disfonksiyonu, IPEX sendromunda olduğu gibi immün disfonksiyona yol açar, poliendokrinopati enteropati X'e bağlı (IPEX), otoimmün hastalığa neden olan düzenleyici T hücrelerinin (Treg'ler) transkripsiyon faktörünü kodlayan *FOXP3* genindeki genetik bir mutasyonun neden olduğu bir sendromdur. Hastalıklar kendini tip I diyabet veya egzama olarak gösterir (McGinness ve ark., 2006). Bazı immün disregülasyon hastalıklarından örnekler aşağıda verilmiştir:

- i. LPS responsive beige-like anchor protein (LRBA) eksikliği: Birçok farklı klinik fenotip ile ortaya çıkan bir PİYH bozukluğudur. LRBA'daki mutasyonlar, Treg'de bulunan *CTLA-4*'ü değiştirir. LRBA protein fonksiyonundaki düşüş, Treg hücrelerinin yüzeyinde *CTLA-4*'ün ekspresyonunu bloke eder. *CTLA-4* kusuru olan hastalarda lenfoproliferasyon (aşırı

sayıda bağışıklık hücresi), hipogamaglobulinemi (düşük antikor seviyeleri) ve bağırsak, akciğerler ve beyin gibi ilişkili olmayan lenfoid organların lenfositik infiltrasyonu görülür (Kostel ve ark., 2017).

- ii. İnflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH): Genetik olarak duyarlı bir bireyde konakçı-mikrobiyal etkileşimlerden (vücudun kendi bağışıklık sistemi sindirim sisteminin elemanlarına saldırır) kaynaklanan tekrarlayan bağırsak iltihabı atakları olarak tanımlanır. Bu inflamatuvar, Crohn hastalığı ve ülseratif kolit olmak üzere iki şekilde ortaya çıkar. Crohn hastalığı, gastrointestinal sistemin herhangi bir latent kısmında, çoğunlukla terminal ileum ve kolonda ülserasyon ile sonuçlanır. Ülseratif kolit, kolon mukozasının yaygın iltihaplanmasını içerir. Hastalar ishal, kanlı dışkı ve kusma gibi karın semptomları yaşarlar. Ayrıca, İBH'lı bazı hastalarda bağırsak epitel bariyer fonksiyonunda kayıplar olur (Marc ve ark., 2014; McDowell ve ark., 2021).

2.1.3. Antikor eksikliği

Primer immün yetmezlik hastalıklarından en yaygın olan türüdür. IgG plasenta yoluyla anneden fetüse geçmediğinde yaklaşık bir yaşından sonra belirtiler görülmeye başlar. Antikor eksiklikleri geniştir, en şiddetli tipi tüm Ig ve B hücrelerin yokluğunda görülür, en hafif tipi ise serumdaki spesifik bir Ig'nin eksikliğidir. Antikor eksikliklerinin semptomları, otoimmünite ve maligniteler gibi başka hastalıklara da yol açabilir. Ayrıca, antikor eksikliği olan hastalarda enfeksiyon gelişme olasılığı daha yüksektir. Bununla birlikte, antikor eksiklikleri için geliştirilmiş tedavi (intravenöz immün serum globulin replasman), diğer belirtilerin veya kolayca yakalanan enfeksiyonların kontrolüne yardımcı olur. Ancak ciddi enfeksiyonlardan önce erken teşhis, pnömoni ve bronşektazide olduğu gibi enfeksiyonların dokulara zarar vermesini engeller (Ballou, 2002).

2.2. Metagenomik

20. yüzyılın başlarında kültüre edilmemiş bir mikroorganizmanın olmayacağına inanılıyordu. 1985'te Pace'in devrim niteliğindeki çalışması bu inancı değiştirdi, bu çalışma kültüre alınamamış mikrobiyal çeşitliliğin şimdiye kadar çoğaltılan küçük mikroorganizma yelpazesinden çok daha ağır bastığını gösterdi (Pace ve ark., 1986). Bu çalışma ile, çok çeşitli insan sağlığı sorunlarından stres veya diğer inorganik süreçler dışında, mikroorganizmaların sorumlu olduğu anlaşılmıştır. Bu yeni kültüre alınamayan mikroorganizmaları anlamak ve hakkında bilgi sahibi olmak için yeni tekniklere ve analizlere ihtiyaç olduğu anlaşıldı. Bu keşfin ardından yepyeni bir alan olan metagenomik geliştirildi. Bu yeni alan, ekime direnen mikroorganizmaların analizine ayrılmıştı. Derin deniz menfezlerinden insan bağırsaklarına kadar çok çeşitli ortamların çeşitliliğini karakterize etmek ve birçok yeni tür, cins ve filum keşfetmek için yoğun çabalar sarf edilmiştir. Metagenomik, organizmaların genomlarını analiz etmek ve hangi tür olduklarını ve çevreleri üzerinde ne gibi etkileri olduğunu keşfetmek için DNA dizileme teknolojisini kullanır.

Metagenomik, belirli bir ortamın veya mikroorganizma topluluğunun kültürden bağımsız genomik analizidir. Bu yaklaşımın temel bir yararı, standart kültür tekniklerine uygun olmayan büyük oranda bakteri, arke ve virüslerin genomik özelliklerini araştırmak için bir araç sunmasıdır. Sonuç olarak, metagenomik hem filogenetik hem de fonksiyonel perspektiflerle ilgili yeni anlayışlar ortaya koyarak mikrobiyal ekoloji anlayışımızı büyük ölçüde genişletme potansiyeline sahiptir. Özellikle, metagenomik çalışmalar, mikrobiyal türler içindeki ve arasındaki genetik değişkenliği karakterize etmenin yanı sıra hem bireysel türlerin hem de tüm toplulukların fonksiyonel repertuarlarını ve ekolojik rollerini sıralamak gibi temel konulara ışık tutmuştur.

Mikroorganizmaların %99'undan fazlasının kültüre dirençli olduğu tahmin edilmektedir (Ferrer ve ark., 2005; Tringe ve Rubin, 2005; Riesenfeld ve ark., 2004). Metagenomik, doğrudan çevreden amplifiye edilen ve böylece tek kaynaklı bir organizma

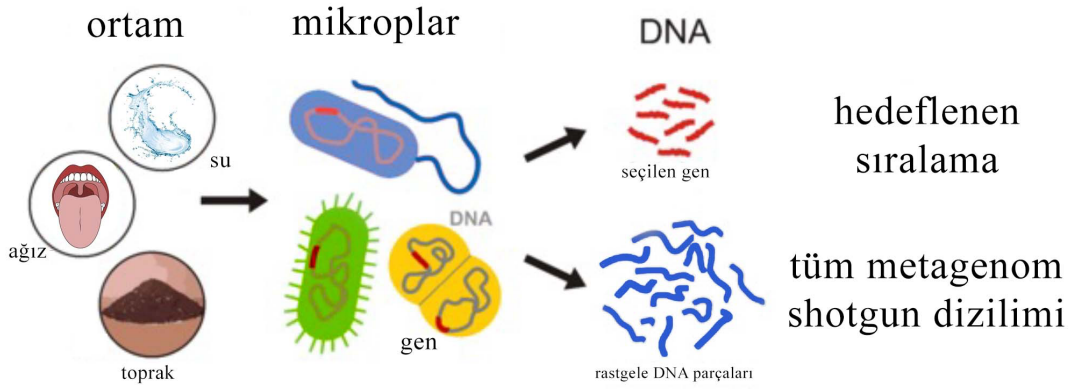
yerine çeşitli genomik kaynakları içeren heterojen DNA örneklerini dizileyerek bu sınırlamayı ortadan kaldırır (Tringe ve Rubin, 2005; Handelsman, 2004). Bu yöntemin bariz faydası, daha önce erişilemeyen mikroorganizmalara erişim sağlamasıdır. Örneğin, simbiyontlar ve zorunlu patojenler, konakçılarının dışında hayatta kalamazlar ve çevresel mikroplar genellikle saf kültürde büyüyemezler. Bununla birlikte, DNA, bu tür organizmalar doğal ortamlarındayken doğrudan ekstrakte edilebilir, böylece dizi verisi kütüphanelerine ayrılabilen heterojen bir DNA karışımı elde edilebilir. Metagenomik kütüphaneler, belirli bir çevreye göre meydana gelen genlerin tamamlayıcısını ortaya çıkararak topluluk dinamikleri hakkında da bilgi sağlar (Tringe ve Rubin, 2005). Genel olarak metagenomik, saf kültür paradigmasını göz ardı ederek genomiklerin mevcut sınırlamalarını aşmak için bir yol sunar, böylece kullanılabilir dizi verilerinin miktarını artırır.

Bakteriler arasında filogenetik ilişkiler geliştirmek için 16S rRNA genlerini ilk kullananlar, 1980'de Woese ve meslektaşları (Suenaga ve ark., 2007) idi; bu morfoloji, büyüme veya beslenmeye dayalı standart yanlış sınıflandırma yöntemlerinden radikal bir ayrılığı temsil etmiştir. Protein sentezinde önemli bir role sahip olan 16S rRNA geni tüm prokaryotlarda bulunur ve kısa dizilerle karakterize edilir, tür içinde korunur ve türler arasında farklılık gösterir. Bu karakterizasyonlar doğru taksonomik sınıflandırmaya izin verir. Pace ve arkadaşları, RNA'yı kopyalamak için ters transkriptaz kullanarak ilk metagenomik çalışmayı gerçekleştirmek için 16S yöntemine dayalı bu tekniği kullanmıştır (Pace ve ark., 1986; Jacques ve Amado, 2014; Karlsson, ve ark., 2013).

Polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) geliştirilmesinin ardından, bu yöntem farklı ortamlarda yeni taksonların keşfedilmesi için etkin bir şekilde kullanılmıştır. PCR yöntemi kültür yanılmalarından (bias) değil, yalnızca kendi yanılmalarından (self-bias) etkilendiğinden, bilinmeyen türlerin aralığını ve çeşitliliğini ortaya koymak için yardımcı oldu.

2.2.1. Metagenomik yaklaşımlar

Metagenomik çalışmalarda iki farklı dizileme stratejisi kullanılabilir (Tringe ve ark., 2005). Ana amaç yalnızca mikrobiyal topluluğu taksonomik olarak tanımlamaksa, seçilen hedef genin amplicon dizilimi, (hedefli dizileme) kullanılır. Bu yaklaşım, genomları hakkında herhangi bir bilgi olmaksızın sadece bir numunedeki türlerin veya sadece cinslerin belirlenmesine izin verse de verilerin işlenmesi daha kolaydır ve mikrobiyal çalışmalarda birçok uygulama için böyle bir sonuç yeterlidir. Aksine, ikinci yaklaşım, veri işleme çok daha karmaşıkken bir örnekte bulunan organizmaların tüm genomlarının çalışılmasına izin verir. Bu yaklaşım, tam metagenom shotgun dizilimine (WMS) dayanmaktadır (Thomas ve ark., 2012) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Metagenomik yaklaşımlar.

Hedeflenmiş DNA dizileme yaklaşımı, habitatta bulunan bakteri topluluklarını tanımlamayı amaçlar. 16S rRNA geni bu durumda genellikle hedef gen olarak kullanılır. Bu gen, metagenomik yaklaşım kurulmadan önce zaten öne çıkmıştı ve kullanılmakta idi. Woese ve arkadaşları 1977’de bu geni bakteriler arasındaki filogenetik ilişkileri tanımlamak ve organizmaları bakteri, arke ve ökaryotlara bölerek metagenomik için en yararlı hedef gen haline getirmek için kullandılar (Woese ve ark., 1977). Bununla birlikte, iki türü ayırt etme yeteneği yeterince güçlü değildir, ancak internal transcribed spacer

(ITS) gibi diğer hedef diziler, mantarlar için daha uygun barkod dizileri olarak kullanılır (Schoch ve ark., 2012).

2.2.1.1. Hedeflenmiş dizileme çalışmaları

Bu bölümde, metagenomik hedefli dizileme yaklaşımı için belirli adımlar açıklanacaktır. Amplikon dizileme metagenomiği, kullanım için çok çeşitli biyoinformatik teknikler, araçlar ve hatlara sahiptir ve daha sonra tartışılacaktır.

Mikrobiyal çalışmalar için biyoinformatik stratejisi üç ana bölüme ayrılabilir. Strateji, sekanslanmış amplikonun ön işleme tabi tutulmasıyla başlar. Bu işlem dizilerin istenmeyen bölümlerinin (örn. adaptörler veya barkod dizileri) kaldırılmasını içermektedir. Düşük kaliteli diziler kaldırıldıktan sonra, özel bir kümeleme adımı gereklidir. Diziler, ilgili organizma gruplarını temsil eden Operasyonel Taksonomik Birimlere (OTU'lar) ayrılır. Son olarak, çeşitlilik analizinden sonra görselleştirme yapılabilir.

2.2.1.1.1. Veri ön işleme

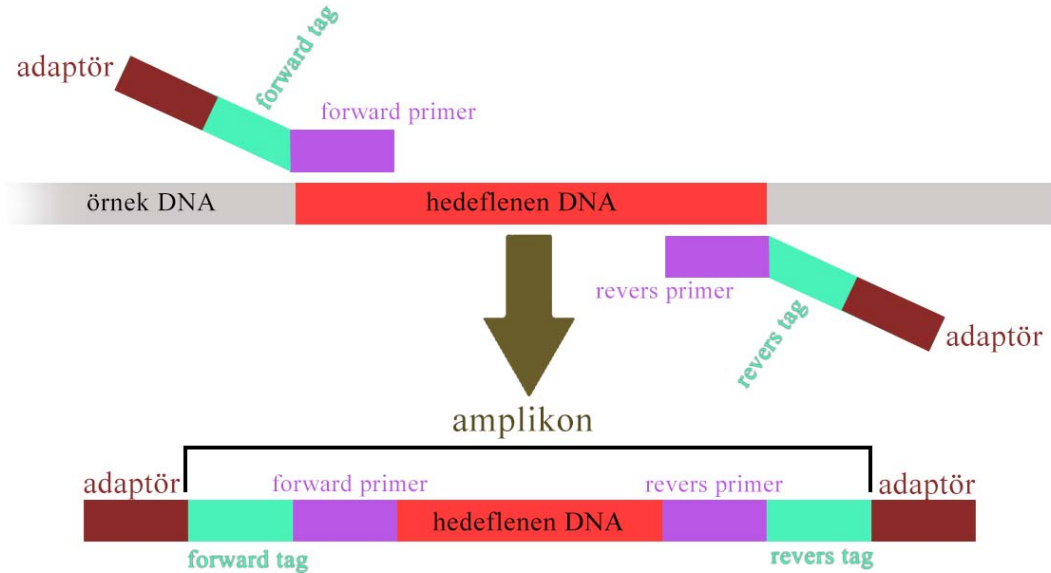
Hedeflenen dizileme metagenomik veri işlemedeki ilk adımlar genellikle otomatiktir ve bunlar herhangi bir yeni nesil dizileme (NGS) uygulamasında aynıdır. Veri ön işleme adımları aşağıda verilmektedir.

Adaptör kırpma

Kütüphane hazırlama sırasında, adaptör adı verilen kısa oligonükleotitler, izole edilmiş DNA'nın bir dizileme makinesi tarafından okunmasına olanak sağlaması amacıyla dizilenen DNA'ya bağlanır. Kütüphane hazırlama protokolleri, farklı dizileme platformları için farklılık gösterir. Kütüphane hazırlığı önemlidir ve bir mikrobiyal çalışmanın sonuçlarını etkileyebilir. Dizilenen parçanın 5' ucuna bağlanan adaptör okuma

bölgesinden önce gelir ancak DNA parçası okuma bölgesinden kısaysa adaptör 3' ucunda bulunur.

Eklenecek adaptör sentetik bir dizidir, okumanın taksonomik tanımlamasını karmaşıklaştırmamak için çıkarılması gerekir ve böylece yalnızca amplicon dizisi kalacaktır (Şekil 2.4). Günümüzde, adaptör dizileri otomatik olarak kaldırılmaktadır. Adaptörler bilindiğinden, standart bir kalite değerlendirme prosedürü sırasında çıkarılmak üzere tanımlanabilirler. FastQC, tüm numuneler için verilere, adaptör içeriğine ve istatistiklere genel bir bakış sağlar. Bu sonuçlar, MultiQC kullanılarak html raporunda özetlenebilir (Ewels ve ark., 2016). Bununla birlikte, kırma ve veri işleme için birçok farklı araç kullanılabilir. Adaptör kırma kategorisinde (www.omictools.com/adapter-trimming-category) OMIC araçlarında listelenen 50'den fazla adaptör kırma aracı vardır. Adaptör kırmaya ek olarak, bu araçlar demultiplexing'de dahil tüm veri ön işleme için kullanışlıdır (Örn. Trimmomatic) (Bolger ve ark., 2014). Bu araç günümüzde tanımlayıcı mikrobiyal çalışmalar için en yaygın kullanılan platform olan Illumina için iki yönlü veri işleme için geliştirilmiştir.



Şekil 2.4. Dizilemede hedeflenen bölge.

Kaliteli kırpma ve iki yönlü okuma birleştirme

Herhangi bir yüksek verimli dizileme – High Throughput Sequencing (HTS) veri ön işleminde olduğu gibi, veri işleminin her adımından sonra kalite değerlendirmesi önerilir. Kalite kriterlerini karşılamayan tüm diziler, bir dizi parametreyi değerlendiren kalite kırpma işleminde kaldırılır, örn. dizi uzunlukları, minimum kalite puanı, barkod dizisindeki uyumsuzluklar vb. ve düşük kaliteli diziler kaldırılmalıdır (Gerzova ve ark., 2015). Veri oluşturma otomatik olarak yapılabilir, baz arama adı verilen baz tanımlamanın kalitesi, Phred kalite puanı (Phred quality score) kullanılarak şu şekilde ölçülebilir:

$$Q = -\log_{10}P \quad (2.1)$$

P: hatalı baz okuma olasılığı (base-calling error probability).

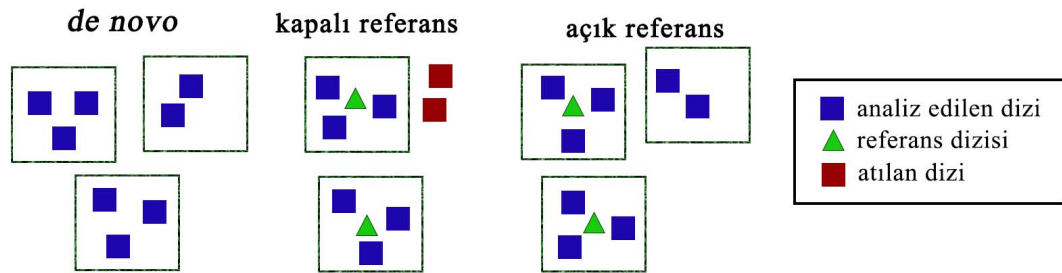
Örneğin, Illumina kalitesinde okumaların kırılması, “Quantitative Insights Into Microbial Ecology” (QIIME) içinde varsayılan eşik değer olarak Phred Q20'ye ayarlanmıştır. Yukarıda verilen matematiksel işlem yapıldığında Phred skoru Q20'nin baz yanlış çağrılma olasılığının %1'e karşılık geldiği sonucuna ulaşılır. Bu nedenle, amplicon dizilimine dayalı metagenomik gereksinimleri doğru olmalıdır. Kimeralar, PCR'nin hibrit ürünleridir. Birden fazla ana dizi birbirine bağlandığında kimerik diziler analize başka bir tür hata kaynağı getirir. Kimerik dizilerin okumaları yüksek kaliteye sahip olsada, OTU toplama sırasında yanlış bir şekilde yeni organizmalar olarak yorumlanırlar. Bu nedenle, tanımlanmaları ve kaldırılmaları gerekir. Roche 454 veya Ion Torrent platformları, genellikle tek yönlü okuma yaklaşımıyla bir uçtan diğerine tüm ampliconları aynı anda kapsayabilen okumalar üretir. Bu nedenle, bu okumalar doğrudan işlenebilir. Aksine, Illumina platformu iki yönlü okuma yaklaşımıyla bir ampliconun her iki ucundan daha kısa okumalar üretir. İki yönlü okuma tekniği QIIME boru hattında bulunan fastq-join gibi veri ön işleme araçlarında mevcuttur (Aronesty, 2013).

2.2.1.1.2. OTU toplama

OTU toplama, hedeflenmiş dizileme ile metagenomik çalışmalarında çok önemli bir adımdır ve diziler kırıldıktan sonra bu adım gerçekleştirilir. Kümelenmeleri sırasında Operasyonel Taksonomik Birimler (OTU) oluşturulmaktadır. Bir OTU, DNA benzerliklerine göre gruplandırılmış bir organizma kümesini temsil eder. Bu gruplama, yeni organizmanın tanımlanmasına ek olarak bir referans veri tabanı kullanarak zaten bilinen organizmaları tanımlar ve mikrobiyomları tanımlamak ve analiz etmek için çeşitli istatistiksel teknikler uygular.

OTU toplama stratejileri

OTU'ların amacı, numunedeki tüm organizmaları modüle etmektir. OTU toplama stratejileri şunlardır: de novo, kapalı referans ve açık referans kümeleme. De novo kümeleme, benzerliklerine göre OTU okumaları oluşturur. Kapalı referans kümelemede, okumalar bir referans karşılaştırması ile test edilir. Açık referans, her iki stratejinin birleşimidir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. OTU toplama stratejileri.

2.2.1.1.3. Kümeleme algoritmaları

OTU toplamının sonuçları ayrıca kümeleme algoritmasına ve dizi benzerliği düzeyine de bağlıdır. Varsayılan değer olarak, %97 benzerlik belirlenmiştir. Bu değer, 16S rRNA gen benzerliğine dayalı tür tanımlaması için eşik değeridir (Stackebrandt ve Goebel, 1994). Diğer hedef genler ve diğer benzerlik seviyeleri kullanıldığından, 16S rRNA'nın orijinal eşığının %99 olması daha sonra önerilmiştir (Stackebrandt, 2006). Ancak bu eşikler 16S rRNA geninin tamamı için önerilmiştir. Bununla birlikte 16S rRNA'nın yalnızca bir veya iki değişken bölgesini kullanmak sadece alemde cins seviyesine kadar kümelenebilir. Etkili bir algoritma olmadan metagenomik veri kümelerinin içerdiği büyük miktarda diziyi kümelemek imkansızdır. Ayrıca, metagenomik uygulamalar için popüler BLAST'tan daha hızlı özel algoritmalar önerilmektedir. Nispeten uzun bir süre için, cd-hit başlangıçta büyük protein veritabanlarının kümelenebilirliği için önerilir, daha sonra hızlı kümeleme ve nükleotid dizilerinin büyük veri kümelerinin karşılaştırılması için de modifiye edilir (Weizhong ve Godzik, 2006). Ek olarak, cd-hit tüm dizileri verilen tüm merkezlerle karşılaştırır ve ayrıca milyonlarca diziyi içeren veri kümelerini BLAST benzeri algoritmalarla daha hızlı kümelemek ve karşılaştırır. Cd-hit, hesaplama talepleri için sözcükleri ve dizin tablolarını kullanır. Belirli bir benzerlik eşiği için, diziler en az bir x uzun kelimeyi paylaşmalıdır. Örneğin, %90 benzerlik, dizilerin en az 10 bp'lik bir kelime içermesi ve hizalama için dizilerin bu kriterleri karşılaması gerektiği anlamına gelir. Şu anda, UCLUST en yaygın kullanılan algoritmadır ve bu aynı zamanda QIIME ardışık düzeninde üç OTU toplama stratejisinin tümünü gerçekleştirebilen varsayılan seçenektir.

UCLUST, merkezlere göre kümelemeye dayalı bir algoritmadır. Her dizinin mevcut merkezlere hizalanması, hesaplama gerektiren bir süreçtir, bu nedenle UCLUST, USEARCH (Edgar, 2010) adlı özel bir sezgisel algoritma kullanır. USEARCH, tüm dizilerle çalışmaktan kaçınmak için k-mers adlı ayrı bir sözcük kullanır. Gerçek hizalama için yalnızca en çok k-mer'i paylaşan birkaç dizi seçilir. USEARCH, cd-hit ile

karşılaştırıldığında, daha yüksek hassasiyet anlamına gelen daha düşük kimliklerde kümeleme yapabilir, daha yüksek hız ve daha düşük bellek kullanımı nedeniyle çok daha büyük veri kümelerini sınıflandırabilir. Ancak, UCLUST kümelemesinde dizilerin girişi sırayla olmalıdır. Bununla birlikte, bir veri kümesinin işlenmesi sırasında merkezler sürekli olarak oluşturulduğundan, dizilerin tümü tüm merkezlerle karşılaştırılmaz. Bu, ağırlık merkezine çok benzemesine rağmen yanlış kümelemeye yol açabilir. De novo stratejisine uygun başka bir OTU toplama algoritması mothur'da uygulanmaktadır, tek, tam veya ortalama bağlantı olarak temel kümeleme algoritmaları kullanılarak kümelenen mesafeler matrisi ile çalışır.

Swarm de novo kümeleme için uygundur ancak tohum olarak rastgele bir dizi seçmekle başlar. Algoritma daha sonra tohumdan belirtilen mesafe (d) kadar farklı olan dizileri arar. Daha sonra bu koşulu sağlayan diziler sete eklenir. Bir sonraki adımda, gerekirse kümeleri bölmek için belirli kümelerin bolluk yapısı kullanılır. Yöntemin dezavantajı, bireysel kümelerin kendi aralarında büyük bir mesafeye sahip olduğunu varsaymasıdır (Mahé ve ark., 2014).

Referans veri tabanları

Referans veritabanlarının kullanımı, veri analizinin önemli bir unsuru haline gelmiştir. OTU toplama için sadece kapalı referans stratejisinde kullanılan veritabanları değil, aynı zamanda de novo stratejisi tarafından oluşturulan OTU'lara sınıflandırma atamaya da hizmet ederler. GenBank halka açıktır ve hızla büyümektedir, bu nedenle veriler doğru olmayabilir. Ancak Greengenes, SILVA veya Ribozomal Database Project (RDP) gibi metagenomik veritabanları, 16S ribozomal RNA analizi için daha uzmanlaşmıştır.

Greengenes, tüm arke ve bakteriyel 16S rRNA genlerine adanmıştır ve standartlaştırılmış bir tanımlayıcı alanlar seti, taksonomik atama ve kimera taraması

sağlar. Veritabanındaki veriler, büyük metagenomik çalışmalar için taksonomiye geliştirmek için kullanılır (McDonald ve ark., 2012). Bir başka kapsamlı rRNA dizileri kaynağı SILVA'dır. Hizalanmış rRNA dizileri kalite kontrollüdür. SILVA, 300 bp'den uzun mevcut tüm dizilerin bir veri tabanını içerir (Quast ve ark., 2013). Buna rağmen, RDP, ribozomla ilgili verilerin ilk veritabanıdır. Veritabanı eski olmasına rağmen ve sürekli güncellenmektedir (Cole ve ark., 2014). Ancak, SILVA ve RDP artık metagenomikte yaygın olarak kullanılmaktadır.

OTU tablosu

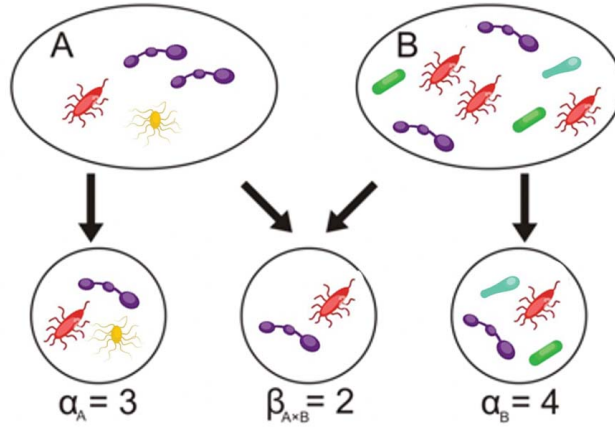
Taksonomi atadıktan sonra veriler bir OTU tablosuna dönüştürülür. OTU tablosu, belirli bir OTU'yu temsil eden satırdan ve belirli bir numuneyi temsil eden sütundan oluşur. Tablodaki değerler, belirli bir örnekteki bir OTU'nun bolluğudur. Bu tablolar daha sonra istatistiksel olarak analiz edilir ve R, SPSS veya Microsoft Excel gibi araçlar kullanılarak görselleştirilir.

2.2.1.1.4. Çeşitlilik analizi

Veriler bir OTU tablosuna dönüştürüldükten sonra, bir topluluk içindeki filogenetik ilişkilere ek olarak, bir ortam içindeki çeşitliliğin veya ortamlar arasındaki çeşitliliğin, topluluk bileşimi ve çevresel özellikler arasındaki ilişkilerin analizi için birçok farklı teknik kullanılarak geniş bir bilgi yelpazesi toplanır.

İki tür çeşitlilik vardır: Alfa (α) ve beta (β) çeşitlilik analizi. İlk olarak α çeşitliliği, bir örnek içindeki türlerle ilgilenir ve bunların bir arada bulunma ilişkilerini tanımlar, örn. türlerin sayısı ve bolluğu. Bununla birlikte, β çeşitliliği, çeşitli örnekler arasındaki tür kompozisyonundaki farklılıklarla ilgilenir; bir dizi ortak tür. Örnek; Numune A, 3 farklı türden ama dört dizi ile oluşturur ($\alpha = 3$). Numune B ise, dört farklı türü kapsayan sekiz

dizi içerir ($\alpha = 4$). Her iki numune de iki farklı türü paylaşır, dolayısıyla $\beta = 2$. Bu iki çeşitliliğin ilkeleri Şekil 2.6.'da gösterilmektedir.



Şekil 2.6. Çeşitlilik analizi türleri.

2.2.1.1.5. Çeşitlilik indeksleri

Bir OTU tablosunu tanımlamanın en basit yolu, çeşitlilik indekslerinde bulunabilir. Bu endeksler ortalama, medyan, standart sapma gibi tanımlayıcı istatistikleri kullanır. Farklılıkları analiz etmek için kullanılan çeşitli indeksler vardır (Magurran, 2004). Ancak alfa ve beta analizi birlikte daha bilgilendirici bilgi verir. Temel katsayı oranı tür sayısıdır. Bunların en basiti bir örnekteki takson S sayısıdır. Ayrıca, taksonların bolluğunu sayan veya türlerin kümülatif sayısının bolluğunu tanımlayan bir eğrinin şeklini derecelendiren karmaşık indeksler genellikle metagenomikte kullanılır. Tür zenginliğini hesaplayan bir indeks örneği Chao 1'dir. α çeşitlilik analizi, zenginlik olarak bilinen gerçek tür sayısına dayanır, ancak türlerin sayısı bir örneğin dizileme kapsamından etkilenir. Nadir türlerin sayısı kullanılarak, zenginlik şu şekilde tahmin edilebilir:

$$S_1 = S_{obs} + \frac{F_1^2}{2F_2'} \quad (2.2)$$

S_{obs} : örnekteki takson sayısı

F_1 : örnekte yalnızca tek bir oluşumu olan tür sayısı.

F_2 : örnekte tam olarak iki oluşumu olan tür sayısı.

Türlerin nispi bolluğunun eşitliği ile sayılan daha gelişmiş endeksler, tür oranına dayalı endeksler olarak adlandırılır ve ayrıca iki gruba ayrılabilir: bilgi teorisine dayalı endeksler ve baskınlık endeksleri. Zenginlik için kullanılan en geniş analiz **Shannon endeksidir** (Hughes ve ark., 2001). Değeri, şu şekilde tanımlanan entropi kavramına karşılık gelir:

$$H = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i \quad p_i = \frac{n_i}{N} \quad (2.3)$$

S : taksonların toplam sayısı.

n_i : i . taksonuna atanan okuma sayısı.

N : tüm okumaların sayısı.

Baskınlığı hesaplamak için **Simpson indeksi** kullanılır. Bu analiz en bol türler için sayılır, nadir türleri ise ihmal eder. Simpson değerleri sıfırdan bire kadar değişir. Bire ne kadar yakınsa taksonun baskınlığı o kadar fazladır ve sıfıra ne kadar yakınsa numunenin tekdüzeliğini gösterir. Bunun hesaplanması şöyle tanımlanır:

$$D = \sum_{i=1}^S \frac{n_i(n_i-1)}{N(N-1)} \quad (2.4)$$

S : taksonların toplam sayısı.

n_i : i . taksona atanan okuma sayısı.

N : tüm okumaların sayısı.

2.2.1.1.6. Basit görselleştirme teknikleri

Mikrobiyal veriler karmaşık ve çok boyutlu olsa da birçok teknikle basit bir şekilde görselleştirilebilir. Görselleştirme, mikrobiyotalar arasındaki gizli bağların bulunmasına yardımcı olabilir ve metagenomik veri kümelerinin işlenmesi ve yorumlanmasında çok önemlidir. Python, R, Matlab vb. gibi betik dillerinde veya mikrobiyal çalışmalar için kullanılacak SPSS veya Statistica gibi istatistiksel hesaplama yazılımlarında veri görselleştirme için çeşitli araçlar vardır.

OTU bolluğu ısı haritası

OTU tablosunu görselleştirmenin en basit yolu bir ısı haritasıdır. Bir OTU'nun bolluğu, anlaşılır bir genel bakış sağlamak için okumalar yerine renklerle kodlanmıştır. Bununla birlikte, mutlak okuma sayısı geniştir ve gösterilmesi zordur. Bu nedenle, gerçek değerler log değerlerine dönüştürülür. Harita düzeni, kümeleme algoritmalarına bağlıdır. OTU tablolarının ısı haritaları, OTU seçiminden sonra taksonların bolluklarına genel bir bakış olarak kabul edilir. OTU tablosundaki verilerin doğrudan görselleştirilmesi katı kurallara sahip değildir ve burada verilen örnekler yalnızca temel ve yaygın olarak kullanılan tekniklerdir. Görsel çıktılar bilgilendirici ve yeri doldurulamaz, ancak metagenomik veri analizi ve görselleştirme için daha gelişmiş tekniklere ihtiyaç vardır.

UniFrac ölçümleri ve görselleştirme

UniFrac (Unique Fraction) metriği, OTU'lar arasındaki filogenetik ilişkilerin yanı sıra ampikon metagenomiğinin gelişmiş kümelenmesine ve görselleştirilmesine izin veren bir metriktir. Prensipten Koordinat Analizi (PCoA) kullanılarak boyut azaltma ile metagenomik örneklerin karşılaştırılması için en güçlü tekniklerden birini oluşturur. UniFrac, topluluk üyeleri arasındaki filogenetik mesafeleri dikkate alır. Bu nedenle, UniFrac bir β çeşitlilik ölçüsü olarak kabul edilir. Ağırlıksız olarak adlandırılan orijinal UniFrac (Lozupone ve Knight, 2005) nitel bir metriktir. Bir örnekte bulunan tüm OTU'lar

bir filogenetik ağaca yerleştirilir ve ağırlıklandırılmamış UniFrac (uu) mesafesi, tüm dalların uzunluğundaki karşılaştırılan topluluklar için benzersiz olan toplam dal uzunluklarının bir kesri olarak hesaplanır:

$$u_u = \frac{\sum_{j=1}^{N_u} b_j}{\sum_{i=1}^N b_i} \quad (2.5)$$

N_u : benzersiz olan dalların sayısı.

N : toplam şube sayısı.

b_i ve b_j : sırasıyla i ve j dallarının uzunluklarıdır (Şekil 2.7)

UniFrac mesafesi her örnek çiftini hesaplar ve ardından çok değişkenli istatistik için bir mesafe matrisi oluşturur. Ancak kalitatif ölçüm yalnızca farklı taksonlardan oluşan toplulukları karşılaştırmak için daha uygunken aynı taksonların farklı göreceli bolluklarından oluşan toplulukları karşılaştırmak için uygun değildir. Bu ikinci tip toplulukları karşılaştırmak için kantitatif ölçüm gerekir. Bu nedenle ağırlıklı UniFrac önerilmiştir (Lozupone ve ark., 2007). Ağırlıklı UniFrac, dal uzunluklarını OTU'ların nispi bolluklarıyla ağırlıklandırarak, karşılaştırılan örneklerde bulunan OTU'ların bolluğunu dikkate alır. İlk adımda, ham ağırlıklı UniFrac şu şekilde hesaplanır:

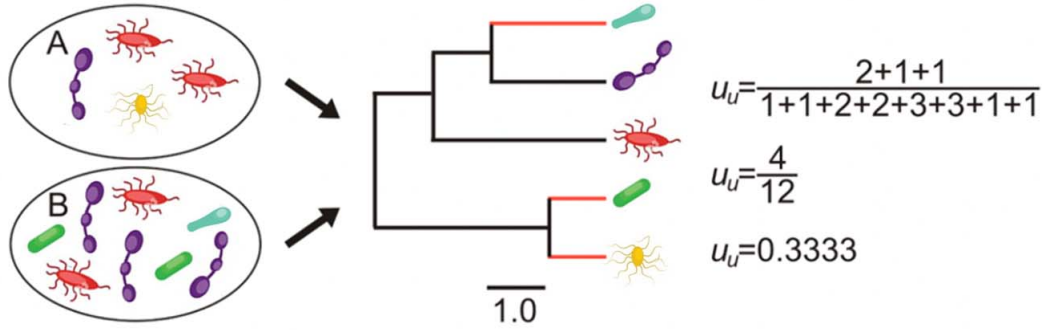
$$u_w = \sum_{i=1}^N b_i \cdot \left| \frac{A_i}{A_T} - \frac{B_i}{B_T} \right| \quad (2.6)$$

N : toplam şube sayısı.

b_i : i dalının uzunluğu.

A_i ve B_i : Sırasıyla A ve B topluluklarında i dalından inen taksonların bolluğu (OTU'ya atanan okuma sayısı).

A_T ve B_T : sırasıyla A ve B örneklerindeki toplam okuma sayısı.



Şekil 2.7. Ağırlıklandırılmamış UniFrac metriği. Analiz edilen örneklerde tüm taksonları kullanan bir filogenetik ağaç.

Temel koordinat analizi (PcoA)

Klasik çok boyutlu ölçekleme (MDS) olarak da adlandırılan temel koordinat analizi, çok değişkenli analizlerde kullanılan bir boyutluluk azaltma tekniğidir. PCoA, UniFrac dahil olmak üzere tercih edilen herhangi bir metriğe göre yeniden oluşturulmuş bir mesafe matrisi ile başlar. PCoA tarafından takip edilen UniFrac analizinin çıktısı, numuneler arasındaki öklid mesafesinin orijinal mesafe matrisini yeniden üreteceği şekilde daha düşük sayıda boyutta numunelerin bir temsilidir. Tipik olarak, veri varyasyonunu tanımlamak için bilgilendirici görselleştirmeler olarak iki veya üç boyut kullanılır (Gower, 1966).

2.2.1.1.7. Amplikon metagenomikleri için boru hatları

Önceki bölümlerde sunulan bazı teknikler ve yöntemler bağımsız araçlar oluştururken, bunların önemli bir kısmı, hedeflenen dizileme metagenomikleri veya genel olarak metagenomikler için kapsamlı hesaplama boru hatlarına uygulanır.

QIIME

Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME, çaym olarak telaffuz edilir), kullanıcıların OTU toplama ve taksonomik sınıflandırma üzerinden demultiplexing'den çeşitlilik analizlerine ve gelişmiş veri görselleştirmeye kadar ham verileri analiz etmelerini sağlayan açık kaynaklı bir yazılım paketidir. Temel olarak çeşitli araçların çıktılarını ve girdilerini tek bir iyi düzenlenmiş boru hattına dönüştüren python betiklerinden oluşur. QIIME'nin avantajı, kullanıcıların onu korumaya yardımcı olmasıdır. Herkesin kendi koduyla QIIME'ye katkıda bulunmasına izin verilse de, QIIME hala kurulumunu karmaşıklarılabilecek birçok bağımlılığa sahip bir python arabirimidir (Caporaso ve ark., 2010).

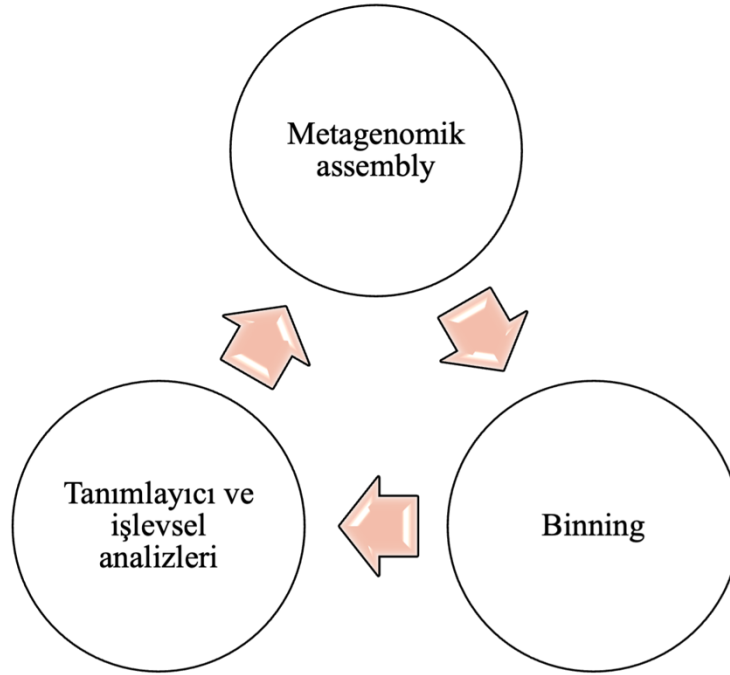
Mothur

OTU toplama algoritmasına ek olarak, Mothur bağımsız bir metagenomik ardışık düzendir. QIIME'den farklı olarak mothur, Linux, Mac ve Windows platformları için çok sayıda kullanışlı algoritmayı kapsayan tek başına yürütülebilir bir programdır. Kurulumu kolaydır ve ayrıntılı kılavuzlar mothur wiki ve forumlarda mevcuttur. Ayrıca, mothur açık kaynak kodludur, yani herkes kaynak kodlarını indirebilir ve iyileştirmeler için kullanabilir. Öte yandan, bağımsız işlem hattının performansı, veri görselleştirme ile sınırlamaya sahip olabilir. Bununla birlikte, zayıf görselleştirmeleri iyileştirmek için çıktılar, R dahil olmak üzere herhangi bir araca veya programlama diline aktarılabilir.

2.2.1.2. Tüm metagenom shotgun dizileme çalışmaları

“Whole Metagenome Sequencing (WMS) ya da “Shotgun Metagenome Sequencing” olarak bilinen tüm metagenom dizilemede veri işlemindeki adımlar, hedeflenmiş dizileme yaklaşımından farklıdır. Şekil 2.8'de gösterildiği gibi üç ana bloğa bölünmüştür, adımların uygulanması bir sıra takip etmez. Bu, bir analizin sonuçları için farklı beklenti ve taleplerden kaynaklanmaktadır. Ham shotgun verileri, genomların

rastgele kısımlarını temsil eder. Bu nedenle, dizi birleştirme, bir metagenomdaki orijinal genomları yeniden yapılandırmanın ilk adımıdır. Ancak metagenomik montaj (assembly) karmaşık bir süreçtir. Montajı geliştirmenin en iyi yolu kontiglerin sayısını azaltırken aynı anda uzunluğunu arttırmaktır. Çünkü daha uzun dizilerin gruplanması daha iyi kümeler üretir ve gruplama algoritmaları bazen birleştirilmiş veriler gerektirir. Kontig'ler, bir kerede veya ayrı kutularda tanımlayıcı ve işlevsel analizlerden geçebilir.



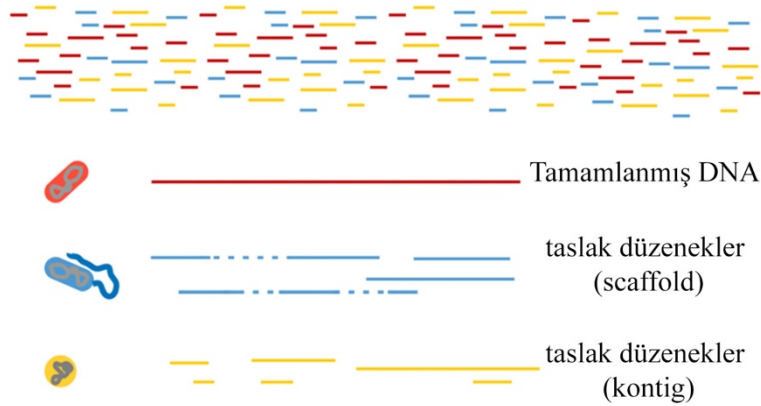
Şekil 2.8. Shotgun dizilimi için biyoinformatik stratejisi.

Tüm metagenom shotgun dizilemesindeki ön işleme adımı, hedeflenen dizileme stratejisine benzer ve temel olarak adaptör ve kaliteli düzeltmeden oluşur.

2.2.1.2.1. Metagenom assembly

Metagenomların derlemeleri, orijinal genom dizisini analiz için yeniden yapılandırmak ve binning süreçlerini iyileştirmeye yardımcı olmak amacıyla okumaları daha uzun dizilere bağlamak için önemli bir adımdır. Genom birleştiriciler genellikle belirli bir dizileme platformu için tasarlanmıştır. Genom birleştirme için her araç kendi

özel prosedürünü kullanır, de novo birleştirmeyi gerçekleştirmek için iki ana algoritma grubu vardır (daha kısa genomlar için, örneğin viral genomlar için) – dizi ve grafik algoritmaları (genom birleştirmede ana rolü oynarlar) (Warren ve ark., 2007; Zhenyu ve ark., 2012). Genom montajının en iyi sonucu, bir organizmanın eksiksiz bir genom dizisidir. Tek bir organizmanın veri setini gerçekleştirmek zor olsa da metagenomik veriler için imkansızdır (Şekil 2.9).



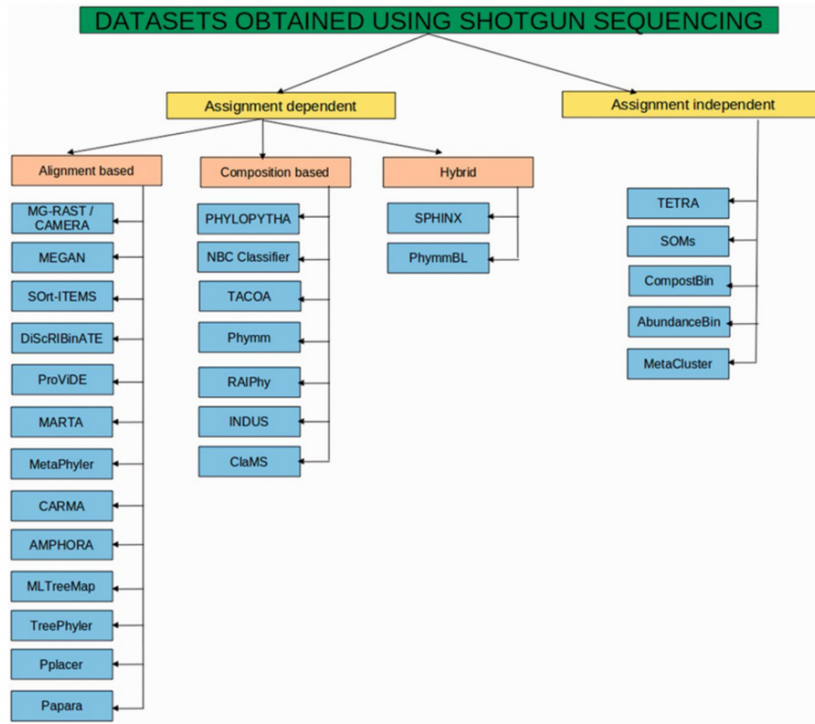
Şekil 2.9. Üç organizma içeren bir veri kümesinden metagenom assembly.

Ancak çıktı bir taslak derlemedir, genom daha kısa genomik dizilere (Kontigler) bölünür. Kontig'lerin konumu ve genom içindeki aralarındaki boşluklar bilinmemektedir. Bununla birlikte, iki yönlü okumalar kullanılarak boşlukların uzunluğu tahmin edilebilir ve bu bitişikler iskeleler halinde gruplandırılır.

2.2.1.2.2. Binning yaklaşımları

Binning adımı, mikrobiyal toplulukların taksonomik çeşitliliğini karakterize etmek için ampikon veri işlemede OTU toplama işlemine eşdeğerdir. Binning stratejileri, okumaların uzunluğuna göre farklılık gösterir. Bununla birlikte, bazı algoritmalar, kısa okumalarla kontig kapsamı ile hesapladıkları için verileri bolluklarına göre kümeler. İki

binning stratejisi vardır, referans veritabanı (taksonomiye bağlı) ve de novo yöntemler (taksonomiden bağımsız) (Mande ve ark., 2012) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Binning yaklaşımları (Mande ve ark., 2012).

2.2.1.2.3. Taksonomiye bağlı gruplama

Atama bağımlı teknikler bir referans veritabanı kullanır ve dizi işlemeye dayalı olarak hizalamaya dayalı, kompozisyona dayalı ve hibrit olarak alt kategorilere ayrılır. Bu yaklaşımda kullanılan veritabanları daha kapsamlıdır. Örneğin, nükleotid hizalamaları için Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), DDBJ (www.ddbj.nig.ac.jp/) veya amino asit hizalamaları için Uniprot (www.uniprot.org/) kullanılır. Hizalamaya dayalı stratejiler, dizilere standart bir hizalama veya BLAST (Altschul ve ark., 1990) gibi standart algoritmalar kullanarak bilinmeyen dizileri bilinen referanslarla karşılaştırır. Ayrıca, sınıflandırmayı atamak için en iyi isabet kullanılır. Bununla birlikte, bu

veritabanları hala milyonlarca bilinmeyen türü kaçırmakta ve bu nedenle tanımlanan dizilerin doğruluğu etkilenmektedir. Bu sorun, En Düşük Ortak Ata (LCA) kullanılarak aşılabilir. Bu, önemli isabetler kümesine karşılık gelen organizmaların en düşük ortak taksonomik atasının taksonomisini atamak olarak çalışır. Bu teknik, hizalama BLAST tabanlı araçların çoğunda mevcuttur (Mande ve ark., 2012). Bununla birlikte, atamaya bağlı yöntemler, metagenomların çoğunluğunu oluşturan bilinmeyen mikropları daha önce yakalayamaz. Bu nedenle, metagenom gruplaması taksonomiden bağımsız yöntemler kullanır.

2.2.1.2.4. Taksonomiden bağımsız binning

Taksonomiden bağımsız binning, daha iyi bilgisayar verimliliği elde etmek için tüm dizileri değil, orijinal verilerden elde edilen vektörleri içeren yöntemleri kullanır ve başlıca şu metotlardan birine dayanır:

i. Dizi bileşimine dayalı yöntemler

Bu yöntem dizilerin kompozisyonel özellikleri ile çalışır. Bu özellikler makine öğrenme algoritmaları tarafından karşılaştırma için kullanılan bir özellikte öztlenmiştir. Genomik imza olarak da bilinen normalleştirilmiş k-mer frekansı en çok kullanılan özelliktir. Örneğin k 4 olarak seçilmiştir ve sonuçlar yüksek Öklit uzayı boyutundadır. $4^4 = 256$ boyut ise dört karakter uzunluğundaki belirli kelimelerin frekansları tarafından oluşturulur (ATTT, AAAC, AAAA). Vektör kümelemede makine öğrenmesi kullanmadan önce daha hızlı bir işlem elde etme adına vektörleri kısaltmak için bir boyut indirgenmesi uygulanır. 3B veya 2B'ye indirgeme, verilerin anlaşılır bir görselleştirilmesine olanak tanır. Bu sayede kompozisyon tabanlı teknikler veri görselleştirme için en iyi araçtır (Gregory ve ark., 2009). Bununla birlikte, CG içeriği veya oligonükleotit frekansından türetilen hata gradyanı gibi diğer bileşim parametreleri k-merlerin uzunluğunu değiştirebilir. Kompozisyon temelli tekniklerin ana konuları

şunlardır; 1) kısa NGS okumalarının kümelerin ayırt edilebilirliğini uygulamak zor olduğu için uzun dizilere duyulan ihtiyaç, 2) düşük miktarda bulunan türlerin yanlış yakalanması ve yüksek oranda bol türlerin bir parçası olarak yanlış sınıflandırılması.

ii. Bolluğa dayalı yöntemler

Bolluğa dayalı binning araçları, bir mikrobiyal örnekte verilen taksonların bolluğunu yansıtan bitişik kapsamaya dayalı özelliklerle çalışır. Bu araçlar iki gruba ayrılır. 1. grup, birden fazla numunenin birleştirilmiş kontiglerinin bir veri kümesi üzerinde çalışır, daha sonra yüksek kapsama profiline sahip aynı genom, birden fazla numune arasında ilişkilendirilmelidir (Nielsen ve ark., 2014). 2. grup ham okumalarla çalışır ve sıralı okumaları dağıtmak için Lander-Waterman modelini takip eder ve her nükleotidin kapsamı Poisson dağılım olasılığı (Lander ve ark., 1988) kullanılarak hesaplanır. Bu yöntemin kompozisyon temelli gruplama tekniklerinden farkı, benzerlikleri (kompozisyon) ile değil, k-mer bolluğu (içerik) ile tanımlanan küme oluşumudur.

iii. Hibrit yöntemler

Hibrit yöntemler bu özelliklerin her ikisini de birleştirir. (Sedlar ve ark., 2017), her iki yöntemin dezavantajlarını en aza indirir ve daha doğru bindirme sonucu sağlar (Lin ve ark., 2016). Bu yöntem kompozisyona dayalı yaklaşımın hızlı ön kümeleme ve veri görselleştirme özellikleri ile bolluk tabanlı yaklaşımının grupları arıtma stratejisinin bir araya gelmesinden oluşur (Laczny ve ark., 2015).

2.2.1.2.5. Tanımlayıcı ve işlevsel analizler

WMS verileri, bir topluluk hakkında biyolojik bilgi sağlamak için tanımlayıcı ve işlevsel analizlere tabi tutulur. Hedeflenmiş dizileme yaklaşımı ile tüm metagenom

arasındaki fark, WMS'nin analiz edilen bir mikrobiyal topluluğun tüm fonksiyonel özelliklerini içermesidir. Bununla birlikte, genomik yaklaşım, bir mikrobiyal topluluğun metabolik ve fonksiyonel potansiyeline tam özellikler vermez. Bu nedenle, bir topluluğun tüm işlevlerini belirtmek için diğer omiklerin dahil edilmesi gerekir.

- I. **Tanımlayıcı çalışmalar:** Shotgun veri seti tüm mikrobiyal topluluğu tanımlar. Veriler, bir topluluğun belirli üyelerinin taksonomik bileşimi ve bolluğu hakkında bilgi içerir (Marchesi ve ark., 2015).
- II. **Fonksiyonel çalışmalar:** Metagenomikte fonksiyonel çalışmalar, standart genomikte uygulanan prosedürleri kopyalar. Bunlar, dizilerin açıklanmasından ve açıklamalı öğelere bir fonksiyonun atanmasının ardından oluşur. Bununla birlikte, metagenomik verilerin açıklanması için özel sunucular mevcuttur.

Metagenomik, genomiğe benzer şekilde, bir organizmanın veya bir organizma topluluğunun gerçek işlevi veya mevcut durumu yerine yalnızca işlevini bildirir. Bu nedenle metagenomik fonksiyonel çalışmalar genellikle metatranskriptomik, metaproteomik veya metabonomik ile birleştirilir (Parro ve ark., 2007).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Etik Beyan, Örneklem ve Tükürük Analizleri

Bu çalışma için etik onay, Necmettin Erbakan Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurulu'ndan (başvuru no.: 2021-/01-13) alınmıştır. Örnek grubunu oluşturan tüm çocukların ebeveynlerinden yazılı bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır. Bu tez çalışmasına diş çürüğü ve immün yetmezliği olan 15 hasta (H) grubu ile diş çürüğü olan fakat herhangi bir immün yetmezliği olmayan 15 sağlıklı (S) grup dahil edilmiştir. Hasta ve sağlıklı gruptan herhangi bir yiyecek ve sıvı tüketmeden, dişlerini fırçalamadan en az bir saat süre ile açken tükürük örnekleri alınmıştır. Örnek grubunu oluşturacak bireylere, tükürük üretimini uyarmak üzere çiğnemeleri için bir parafin peleti verilmiş ve ardından ağız tabanından alınan tükürük örnekleri steril tüplere aktarılarak tükürük akış hızı hesaplanmıştır. Prosedürler, kit üreticisinin kullanım tavsiyelerine göre (CRT® buffer, CRT® Intro Pack-Caries Risk Test, Ivoclar Vivadent, Schaan, Lihtenştayn) uygulanmıştır.

Bu tez kapsamında, tükürükteki *Mutans streptococci* ve *Lactobacilli* yoğunluğu analiz edilmiştir. Bunun için (CRT® buffer, CRT® Intro Pack-Caries Risk Test, Ivoclar Vivadent, Schaan, Lihtenştayn) kit içerisindeki agarın her iki yüzeyi bir taşıyıcı pipet kullanılarak tükürük ile tamamen ıslatılmıştır. Örneklerin inkübatörde 37°C'de 48 saat inkübasyonundan sonra, *Mutans streptococci* ve *Lactobacilli* koloni yoğunluğu, üretici tarafından hazırlanan model tablosuna göre değerlendirilmiştir. İnkübasyon sonrası elde edilen koloni sayıları 10⁵ CFU/mL tükürük'ten büyük veya küçük (k: küçük, b: büyük) olarak sınıflandırılmıştır. Sonuçlar istatistiksel olarak da değerlendirilmiştir.

Tükürük örneklerinin tamponlama kapasiteleri tek kullanımlık test şeritleri ile araştırılmıştır. Üreticinin (CRTR-bacteria, CRT® Intro Pack-Caries Risk Test, Ivoclar Vivadent, Schaan, Lihtenştayn) kullanım tavsiyelerine göre, test şeritleri tükürük ile ıslatılmış ve 5 dakika sonra tükürük tamponlama kapasitesi görsel değerlendirme ile h:

yüksek, m: orta ve l: düşük olarak değerlendirilmiştir.

3.2. Metagenomik Analiz

3.2.1. Metagenomik analiz için diş örneklerinin hazırlanması

Çalışmaya, Necmettin Erbakan Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Kliniğine başvuran primer immün yetmezlik hastalıkları (PIYH) ve diş çürüğü olan 15 hasta (yaş ort: 6.5) grubu ile herhangi bir immün yetersizlik hastalığı olmayan diş çürüklü 15 sağlıklı çocuk (yaş ort: 6.9) kontrol grubu olarak dahil edilmiştir. Örnekler, daha önce klinik ve araştırma deneyimi olan eğitimli bir pediatrik diş hekimi tarafından toplanmış ve bir hafta içinde DNA ekstraksiyonu için 4°C'de steril bir tüpte saklanmıştır. Numuneler diş kontaminasyonlardan arındırmak için %70 etanol ile yıkandıktan sonra havan ve tokmak kullanılarak toz haline getirilmiştir. Daha sonra üreticinin talimatlarına göre (ZymoBIOMICS DNA Miniprep kiti, ZYMO RESARCH, Tustin, ABD) aşağıda detaylı olarak anlatılan DNA ekstraksiyonu prosedürü uygulanmıştır. İzole edilen DNA örnekleri (100 ng DNA), metagenomik analizi yapılmak üzere soğuk zincir koşulları altında firmaya (GenEra, Türkiye) gönderilmiştir.

3.2.2. Diş çürüklerinden DNA izolasyonu

Diş çürüklerinden DNA izolasyonu için ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep kiti kullanılmıştır. İzolasyon protokolü firmanın önerilerine uygun olarak, şu şekilde yapılmıştır.

1. DNA'sı izole edilecek örnek, ZR BashingBead™ lizis Tüplerine (0,1 ve 0,5 mm) eklenmiştir. 750 µl ZymoBIOMICS™ Lizis Solüsyonu tüpe eklenerek kapak sıkıca kapatılmıştır.

2. İçerisinde örnek bulunan tüp ≥ 5 dakika boyunca maksimum hızda vortekslenmiştir.
3. Vorteks işleminden sonra, tüp $\geq 10\ 000 \times g$ 'de 1 dakika boyunca mikrosantrifüjde santrifüj edilmiştir.
4. 400 μ l süpernatant, bir toplama tüpüne Zymo-Spin™ III-F Filtresi üzerine aktararak 1 dakika $8\ 000 \times g$ 'de santrifüjlenmiştir. Daha sonra Zymo-Spin™ III-F Filtresi atılmıştır.
5. 1200 μ l ZymoBIOMICS™ DNA Bağlama Tamponu, Toplama Tüpündeki süzüntüye eklenmiştir.
6. 800 μ l karışım, bir toplama tüpünde bir Zymo-Spin™ IICR kolonuna aktararak 1 dakika $10\ 000 \times g$ 'de santrifüjlenmiştir.
7. Santrifüj sonunda toplama tüpünde biriken sıvı dökülerek 6. basamak tekrar edilmiştir.
8. Yeni bir toplama tüpüne aynı Zymo-Spin™ IICR kolonu yerleştirilmiş ve kolon üzerine 400 μ l ZymoBIOMICS™ DNA yıkama tamponu-1 eklenmiştir. Ardından 1 dakika boyunca $10\ 000 \times g$ 'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda toplama tüpünde biriken sıvı atılmıştır.
9. Toplama tüpündeki Zymo-Spin™ IICR kolonu üzerine 700 μ l BIOMICST™ DNA yıkama tamponu-2 eklenerek $10\ 000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda toplama tüpünde biriken sıvı atılmıştır.
10. Toplama tüpündeki Zymo-Spin™ IICR kolonu üzerine 200 μ l BIOMICST™ DNA yıkama tamponu-2 eklenerek $10\ 000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda toplama tüpünde biriken sıvı atılmıştır.

11. Zymo-Spin™ IICR kolonu temiz bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve kolon matriksine 100 µl (minimum 50 µl) ZymoBIOMICST™ DNaz/RNaz-içermeyen su eklenerek 1 dakika inkübe edilmiştir. DNA'nın ayrılması için 10 000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

12. Yeni bir toplama tüpüne Zymo-Spin™ III-HRC Filtresi yerleştirilmiş ve 600 µl ZymoBIOMICST™ HRC Hazırlama solüsyonu eklenerek 8000 x g'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.

13. Temiz bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne hazırlanan Zymo-Spin™ III-HRC Filtresi yerleştirilmiş ve üzerine 11. basamakta elde edilen DNA eklenmiştir. 3 dakika boyunca 16 000 x g'de santrifüj edilmiştir.

DNA'nın miktarı ve saflığı NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, ABD) ile değerlendirilmiştir. Örneklerden izole edilen DNA'lar metagenomik analiz için kullanılmıştır.

3.2.3. 16S rRNA kütüphane hazırlama ve gen dizileme

Bu prosedürlerde KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Roche, ABD) kullanılarak her numune için ayrı ayrı 25 döngü PCR gerçekleştirilmiştir. Kütüphane hazırlığı sırasında iki aşamalı PCR gerçekleştirilmiştir. Bu kitin prosedürüne göre uygulanan bu aşamada, 16S rRNA genine özgü primerler V3-V4 bölgelerini amplifiye etmek üzere kullanılmıştır. Illumina Miseq adaptör primerlerinin nükleotid dizileri, gene özgü primerlere eklenmektedir. Primer dizileri şunlardır: 16S Amplikon PCR İleri Primer = 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCT ACGGGNGGCWGCAG ve 16S Amplikon PCR Geri Primer = 5' GTCTCGTGG GGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC. Çıkıntı (overhang) adaptör dizisi, hedeflenecek bölge için lokusa özgü primere eklenmiştir. Illumina ileri primer overhang: 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-[lokusa özel dizi] ve geri primer

overhang: 5' GTCTCGTGGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-[lokusa özel dizi] dizileri kütüphane hazırlığında kullanılmıştır. Kütüphane hazırlama ve dizileme işlemleri aşağıda basamaklar halinde verilmektedir.

1. Amplikon PCR

16S V3-V4 amplikonunu çoğaltmak için aşağıda bileşen miktarları ve koşulları verilen PCR reaksiyonu 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix ve 16S V3-V4 amplikon primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

İçerik	Hacim
DNA (5 ng/μl)	2.5 μl
Amplikon PCR Forward Primer, 1 μM	5 μl
Amplikon PCR Reverse Primer, 1 μM	5 μl
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	12.5 μl
Toplam	25 μl

PCR, aşağıdaki program kullanılarak bir termal döngüleyicide gerçekleştirilmiştir:

95°C'de 3 dakika

95 °C 30 saniye	}	25 döngü
55 °C 30 saniye		
72°C 30 saniye		

72°C 5 dakika

4°C'de inkübasyon

2. PCR temizleme

16S V3-V4 amplikonunu serbest primerlerden arındırmak için AMPure XP boncuklarını kullanarak gerçekleştirilen temizleme adımı aşağıdaki şekildedir.

1. Amplikon PCR plakası, yoğunlaştırmak için 20°C'de 1 000 × g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
2. Boncukların eşit şekilde dağıldığından emin olmak için AMPure XP boncukları 30 saniye vortekslenmiştir.
3. Çok kanallı bir pipet kullanarak, Amplikon PCR plakasının her kuyucuğuna 20 µl AMPure XP boncuk eklenmiştir.
4. Karışım, 10 kez aşağı yukarı pipetlenmiştir.
5. Plaka oda sıcaklığında 5 dakika boyunca çalkalanmadan inkübe edilmiştir.
6. Plaka, süpernatant temizlenene kadar 2 dakika boyunca manyetik bir stand üzerine tutulmuştur.
7. Amplikon PCR plakası manyetik stand üzerindeyken, süpernatant çok kanallı bir pipet yardımı ile atılmıştır.
8. Amplikon PCR plakası manyetik stand üzerindeyken boncuklar yeni hazırlanmış %80 etanol ile aşağıdaki gibi yıkanmıştır:
 - a. Çok kanallı bir pipet kullanılarak, her numune kuyucuğuna 200 µl yeni hazırlanmış %80 etanol eklenmiştir.
 - b. Plaka manyetik stand üzerinde 30 saniye süreyle inkübe edilmiştir.
 - c. Süpernatant atılmıştır.
9. 8. adım tekrarlanarak, ikinci kez etanol yıkaması yapılmıştır.
10. Plaka 10 dakika süreyle açık havada kurumaya bırakılmıştır.
11. Amplikon PCR plakası daha sonra manyetik standtan çıkarılmıştır. Amplikon PCR plakasının her kuyucuğuna çok kanallı bir pipet kullanarak, 10 mM Tris (pH 8.5)'ten 52,5 µl eklenmiştir.
12. Karışım, 10 kez aşağı yukarı pipetlenmiştir.

13. Plaka oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir.
14. Plaka, süpernatant temizlenene kadar 2 dakika boyunca manyetik bir stand üzerinde tutulmuştur.
15. Amplikon PCR plakasından alınan 50 µl süpernatant çok kanallı bir pipet kullanarak, yeni bir 96-kuyulu PCR plakasına aktarılmıştır.

3. İndeks PCR

Bu adımda, Nextera XT İndeks Kiti kullanılarak ikili indeksler ve Illumina dizileme adaptörleri eklenmiştir.

1. Çok kanallı bir pipet kullanılarak önceki 96 kuyulu plakadan 5 µl alınarak yeni bir 96 kuyulu plakaya aktarılmıştır. Kalan 45 µl, diğer kullanımlar için saklanmıştır.
2. İndeks 1 ve 2 primerleri, aşağıdaki formata göre plakaya yerleştirilmiştir:
 - a. İndeks 2 primer tüpleri, A'dan H'ye kadar olan sıralarla hizalanarak dikey olarak düzenlenmiştir (beyaz kapaklar, berrak solüsyon).
 - b. İndeks 1 primer tüpleri (turuncu kapaklar, sarı solüsyon) yatay olarak, 1'den 12'ye kadar olan sütunlara hizalanmıştır.
3. Yeniden süspansiyon edilmiş 5 µl PCR ürünü içeren 96 kuyulu PCR plakası, TruSeq İndeks Plaka Fikstürüne yerleştirilmiştir.
4. Aşağıda hacimleri verilmiş bileşenler ile DNA reaksiyonu başlatılmıştır:

İçerik	Hacim
DNA	5 µl
Nextera XT Index Primer 1 (N7xx)	5 µl
Nextera XT Index Primer 2 (S5xx)	5 µl
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	25 µl
PCR Dereceli su	10 µl
Toplam	50 µl

5. Karışım, 10 kez yukarı ve aşağı pipetlenerek karıştırılmıştır.
6. Plaka Microseal film ile kaplanmıştır.
7. Plaka, 1 dakika boyunca 20°C'de 1 000 x g'de santrifüjlenmiştir.
8. PCR bir termal döngüleyicide, aşağıdaki program kullanılarak gerçekleştirilmiştir:

95°C'de 3 dakika

95 °C 30 saniye	}	8 döngü
55 °C 30 saniye		
72°C 30 saniye		

72°C 5 dakika

4°C'de inkübasyon

4. 2. PCR temizleme

Bu son adım, AMPure XP boncukları kullanarak DNA kütüphanesini temizlemek için gerçekleştirilmiştir.

1. Index PCR plakası, yoğunlaştırmak için 20°C'de 280 x g'de 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir.
2. AMPure XP boncukları boncukların eşit olarak dağıldığından emin olmak için 30 saniye vortekslenmiştir.
3. Index PCR plakasının her kuyucuğuna çok kanallı bir pipet kullanarak, 56 µl AMPure XP boncuk eklenmiştir.
4. Karışım 10 kez yukarı aşağı pipetleme yapılarak karıştırılmıştır.
5. Karışımlar 5 dakika boyunca çalkalanmadan oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.

6. Plaka, süpernatant temizlenene kadar 2 dakika boyunca manyetik bir stand üzerinde bırakılmıştır.
7. Manyetik stand üzerindeki Index PCR plakasından çok kanallı bir pipet kullanılarak süpernatant atılmıştır.
8. Manyetik stand üzerindeki Index PCR plakasındaki boncuklar, yeni hazırlanmış %80'lik etanol ile aşağıdaki gibi yıkanmıştır:
 - a. Çok kanallı bir pipet kullanılarak, her numune kuyucuğuna 200 µl taze hazırlanmış %80 etanol eklenmiştir.
 - b. Plaka, manyetik stand üzerinde 30 saniye süreyle inkübe edilmiştir.
 - c. Süpernatant atılmıştır.
9. İkinci bir etanol yıkaması için, 8. adım tekrarlanmıştır.
10. Fazla etanol çok kanallı pipet kullanılarak çıkarılmıştır.
11. Plaka 10 dakika süreyle havada kurumaya bırakılmıştır.
12. Index PCR plakası manyetik standtan çıkarılmıştır. Çok kanallı bir pipet kullanılarak, Index PCR plakasının her kuyucuğuna 27,5 µl 10 mM Tris pH 8,5 eklenmiştir.
13. Karışım, boncuklar tamamen yeniden süspanse edilene kadar 10 kez yukarı ve aşağı pipetlenerek karıştırılmıştır.
14. Plaka oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir.
15. Plaka, süpernatant temizlenene kadar 2 dakika boyunca manyetik stand üzerine tutulmuştur.
16. 25 µl süpernatant çok kanallı bir pipet kullanılarak Index PCR plakasından yeni bir 96-kuyulu PCR plakasına aktarılmıştır. Böylece DNA kütüphanesi hazırlanmıştır.

5. MiSeq dizileme reaksiyonu

Küme oluşturma ve dizileme için hazırlık sürecinde, havuzlanmış kütüphaneler NaOH ile denatüre edildikten sonra, hibridizasyon tamponu ile seyreltilmiştir ve MiSeq dizilemesinden önce ısıtılmıştır. Her çalıştırma en az %5 PhiX içermelidir. PhiX, düşük

çeşitlilik kütüphaneleri için dahili bir kontrol olarak çalışmaktadır. Daha iyi bir çalışma metrikleri elde etmek için aşağıdaki gibi MiSeq v3 reagent kiti kullanılmıştır.

1. Bir ısı bloğu 96°C'ye ayarlanmıştır.
2. MiSeq reaktif kartuşu oda sıcaklığında çözülmüştür.
3. 3 kısım buz ve 1 kısım su oranı sağlanarak bir buz-su banyosu hazırlanmıştır.
4. Bir mikrosantrifüj tüpünde havuzlanmış nihai DNA kütüphanesinin aşağıdaki hacimleri ve yeni seyreltilmiş 0,2 N NaOH birleştirilmiştir:
 - 4 nM havuzlanmış kütüphane (5 µl)
 - 0,2 N NaOH (5 µl)
5. Kalan 0,2 N NaOH seyreltisi bir PhiX kontrolü için ayrılmıştır.
6. Numune solüsyonu vortekslenmiş ve daha sonra 1 dakika boyunca 20°C'de 280 x g'de santrifüjlenmiştir.
7. DNA'yı tek sarmal halinde denatüre etmek için numuneler oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir.
8. Denatüre DNA içeren tüpe aşağıdaki hacimde önceden soğutulmuş HT1 eklenmiştir:
 - Denatüre DNA (10 µl)
 - Önceden soğutulmuş HT1 (990 µl)HT1 sonuçları, 1 mM NaOH içinde 20 pM denatüre kütüphaneye eklenmiştir.
9. Denatüre DNA, son seyreltme işlemine kadar buz üzerine yerleştirilmiştir.
10. Denatüre DNA, 120 µl 20 pM denatüre kütüphane ve 480 µl önceden soğutulmuş HT1 kullanılarak 4 pM konsantrasyona seyreltilmiştir.
11. Daha sonra DNA solüsyonu karıştırılmıştır.
12. Denatüre ve seyreltilmiş DNA buz üzerine yerleştirilmiştir.

PhiX kontrolünün denatüre edilmesi ve seyreltilmesi

10 nM PhiX kütüphanesini amplikon kitaplığı ile aynı yükleme konsantrasyonuna denatüre etmek ve seyreltmek için aşağıdaki adımlar uygulanmıştır. Nihai kütüphane karışımı, en az %5 PhiX içermiştir.

1. PhiX kitaplığını 4 nM'ye seyreltmek için aşağıdakiler birleştirilmiştir:
 - 10 nM PhiX kütüphanesi (2 µl)
 - 10 mM Tris pH 8,5 (3 µl)
2. Aşağıdaki 4 nM PhiX ve 0,2 N NaOH hacimleri bir mikrosantrifüj tüpünde birleştirilmiştir:
 - 4 nM PhiX kütüphanesi (5 µl)
 - 0.2 N NaOH (5 µl)
3. 2 nM PhiX kütüphanesi vortekslenmiştir.
4. PhiX kütüphanesini tek iplikler halinde denatüre etmek için karışım, oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir.
5. 20 pM PhiX kütüphanesi elde etmek için denatüre edilen PhiX kütüphanesi içeren tüpe, önceden soğutulmuş HT1'in aşağıdaki hacimleri eklenmiştir:
 - Denatüre PhiX kütüphanesi (10 µl)
 - Önceden soğutulmuş HT1 (990 µl)
6. 20 pM denatüre PhiX kitaplığı, Amplikon kitaplığı ile aynı yükleme konsantrasyonuna seyreltilmiştir.
7. 20 pM denatüre PhiX, 120 µl 20 pM denatüre edilmiş kütüphane ve 480 µl önceden soğutulmuş HT1 kullanılarak 4 pM konsantrasyona seyreltilmiştir.
8. Daha sonra DNA solüsyonu karıştırılmıştır.
9. Denatüre edilmiş ve seyreltilmiş PhiX buz üzerine yerleştirilmiştir.

Amplikon kütüphanesi ve PhiX kontrolününün birleştirilmesi

Aşağıdaki adımlar takip edilerek örnekler ve PhiX kontrolü Illumina cihazına yerleştirilmiştir:

1. Aşağıdaki denatüre PhiX kontrol kütüphanesi ve denatüre amplikon kütüphanesi bir mikrosantrifüj tüpünde birleştirilmiştir:
 - Denatüre ve seyreltilmiş PhiX kontrolü (30 µl)
 - Denatüre ve seyreltilmiş amplikon kütüphanesi (570 µl)
2. Bir ısı bloğu kullanılarak, birleştirilmiş kütüphane ve PhiX kontrol tüpü, 96°C'de 2 dakika süreyle inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyondan sonra tüp 1-2 kez alt üst edilerek karıştırılmış ve hemen buz-su banyosuna yerleştirilmiştir.
4. Tüp buzlu su banyosunda 5 dakika tutulmuştur.

Örnekler MiSeq'e yüklendikten sonra, 16S Metagenomiks protokolü seçilip çalıştırılmıştır.

3.2.4. Biyoinformatik ve istatistiksel analiz

Dizileme uygulamasından sonra kalite kontrol aşamasında FastQC programı (versiyon 0.11.9; Babraham Bioinformatics Group, Babraham Institute, Cambridge, UK; www.bioinformatics.babraham.ac.uk/) kullanılmıştır. Kalite kontrol sonuçlarına göre her numune için veri miktarları, okuma kalitesi, GC dağılımları, k-mer dağılımları ve olası adaptör kontaminasyonları incelenmiştir. Bu aşamadan sonra, düşük okuma kalitesine sahip okumalar (Phred Skoru <Q20, pencere aralığı 30 bp) tüm verilerden çıkarılmıştır. Ek olarak, düşük kaliteli baz okumaları, olası adaptör kirleticileri ve okuma uçlarındaki kimerik diziler, Genomes OnLine Database (GOLD) ve Trimmomatic aracı (versiyon 0.40, usadellab.org, Almanya) temel alınarak kırpılmıştır.

Taksonomik profil oluşturma için, okumalar Wang ve arkadaşları tarafından geliştirilen Greengenes veritabanına (<http://greengenes.lbl.gov/>) dayalı olarak Ribozomal Veritabanı Projesi (RDP) Sınıflandırıcı kullanılarak hedef organizmalara göre hizalanmıştır (Wang ve ark., 2007). Hizalamadan sonra, her numunedeki OTU grupları mikrobiyal topluluk yapısı, bileşimi, alfa çeşitliliği ve beta çeşitliliği analizi gibi biyoinformatik analizler için R vegan paketi (versiyon 2.5-6, <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>) kullanılarak veri raporlama, istatistiksel analiz ve veri görselleştirme işlemleri gerçekleştirilmiştir. İki alışma grubu arasındaki taksonların nispi bolluklarındaki farklılıklar t-testi, Kruskal-Wallis testi ve Mann Whitney U testi ile değerlendirilmiş, ayrıca türler arasındaki ilişkileri ve korelasyonu değerlendirmek için spearman testi kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, *p* değeri 0,05'ten küçükse ilişki anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel analizler, SPSS V.27 istatistiksel yazılımı (, IBM, Armonk, NY, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca alt gruplar (antikor eksikliği, kombine immün yetmezlikler, immün disregulasyon ve kök hücre nakli) ile kontrol grubu arasındaki farklılıklar da araştırılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Çalışma Gruplarının Klinik Bilgileri ve Tükürük Testleri

Çalışma grubu olarak primer immün yetmezlik hastalıkları (PİYH) ve diş çürüğü olan 15 hasta (yaş ort: 6.5) grubu ile herhangi bir immün yetersizlik hastalığı olmayan diş çürüklü 15 sağlıklı çocuk (yaş ort: 6.9) kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Örnek gruplara ilişkin klinik özellikler detaylı olarak Tablo 4.1. 'de gösterilmektedir. Tükürük, proteinler, glikoproteinler, elektrolitler ve küçük organik moleküller içeren heterojen bir sıvıdır. Tükürük, dişleri ve ağız mukozasını sürekli olarak yıkar. Tükürüğün çürük gelişimini etkileme yeteneği, salınan salgıların miktarına ve bileşimine bağlıdır. Tükürük, antimikrobiyal bileşenler ve ağız dokularını koruyan bir tamponlama maddesi içerir. Laktoferrin, lizozim ve histatinler gibi tükürükte bulunan proteinler, ağız boşluğundaki mikroorganizmaların büyümesini yok etme veya engelleme yeteneğine sahiptir ve en önemli işlevleri, diş çürümesine yol açan diş plağı oluşturan ağız bakterilerini kontrol etmektir (Battino ve ark., 2002). Tükürük testleri sonucuna göre, tampon kapasitesi (orta) ($p=0.5$) ve akış hızı (H grubu ± 0.4 ml/dk ve S grubu ± 0.4 ml/dk) ($p=0.4$) açısından her iki grup arasında herhangi bir farklılık bulunmamaktadır. Diş çürükleri ile tükürük akış hızı, pH, tampon kapasitesi ve tükürüğün savunma sistemleri arasındaki ilişkileri araştıran çok az çalışma bulunmaktadır (Pandey ve ark., 2015).

Bu çalışmada DMFT indeksi (Decayed, Missing and Filled Teeth) kullanılmıştır. Bu indeks, bireyin çürük, eksik ve dolgulu kalıcı dişlerinin (DMF) toplamını verir (Jayve ark., 2008). Bu çalışmada, DMFT indeksi S grubu için 9.6 ± 3.6 , H grubu için ise 8.3 ± 2.3 bulunmuştur ($p=0.3$).

Bu çalışmada S ve H gruplarında tükürük akış hızı, tampon kapasitesi ve DMFT benzer bulunmuştur. Bu benzerlik, bu çalışmaya konu edilen tüm örneklerin çürüklü olması nedeniyle beklenen bir sonuçtur.

Tablo 4.1. Çalışma gruplarının klinik bilgileri ve tükürük testleri sonuçları.

GRUP ^a	YAŞ	CİNSİYET	DMFT ^b	TÜKÜRÜK AKIŞ HIZI (ml/dk)	TAMPONLAMA KAPASİTESİ ^c	<i>Lactobacilli</i>	<i>Mutans</i>	H TANISI	H SINIFI
H1	8	E	6	1,25	Y	k	k	Hipogamaglobinemi, klinefelter sendromu	Antikor eksikliği
H 2	6	E	10	1	D	b	b	Hipogamaglobulinemi	Antikor eksikliği
H 3	7	K	8	0,5	D	b	b		Kombine İY
H 4	5	K	10	1	O	k	b	İmmun disregulasyon	İmmun disregulasyon
H 5	4	K	6	0,7	O	k	k	Artemis eksikliği	Nakil
H 6	5	K	8	0,8	Y	k	k	Ataxia telenjektazi	Kombine İY
H 7	5	K	6	1	Y	k	k	RAG 2 eksikliği	Nakil
H 8	4	K	7	1	D	b	b	Tanımlanmamış immün yetmezlik + hipogamaglobulinemi	Antikor eksikliği
H 9	5	E	4	1,3	Y	k	k	Hipogamaglobulinemi, bronşiolitis obliterans	Antikor eksikliği
H 10	4	E	9	0,3	Y	b	b	Hipogamaglobulinemi + inflamatuvar bağırsak hastalığı	İmmun disregulasyon
H 11	6	E	12	0,9	O	k	k	LRBA eksikliği	İmmun disregulasyon
H 12	8	E	9	1	O	k	b	Hipogamaglobulinemi, tbc	Antikor eksikliği
H 13	4	K	11	0,6	O	k	k	ADA eksikliği	Nakil
H 14	16	E	11	1,2	D	k	k	Wideman steiner sendromu	Antikor eksikliği
H 15	11	E	8	1	O	b	b	Hipogamaglobulinemi, bronşektazi	Antikor eksikliği
S1	4	E	5	0,9	Y	k	k		
S 2	5	E	9	1	Y	k	k		
S 3	6	E	14	1,2	O	b	b		
S 4	6	E	11	1	O	k	b		
S 5	6	K	10	0,5	O	b	b		

S 6	7	E	6	0,5	Y	k	k
S 7	8	E	10	1	D	k	b
S 8	9	E	17	1,3	O	b	k
S 9	6	K	4	1	Y	k	k
S 10	9	K	11	0,9	D	b	b
S 11	10	K	14	2	Y	k	k
S 12	9	K	10	0,8	Y	k	k
S 13	7	E	6	1	Y	k	k
S 14	6	K	9	1,2	D	b	b
S 15	6	K	8	0,9	O	k	k
<i>P- değeri</i>	0.7		0.3	0.4	0.5		

^d

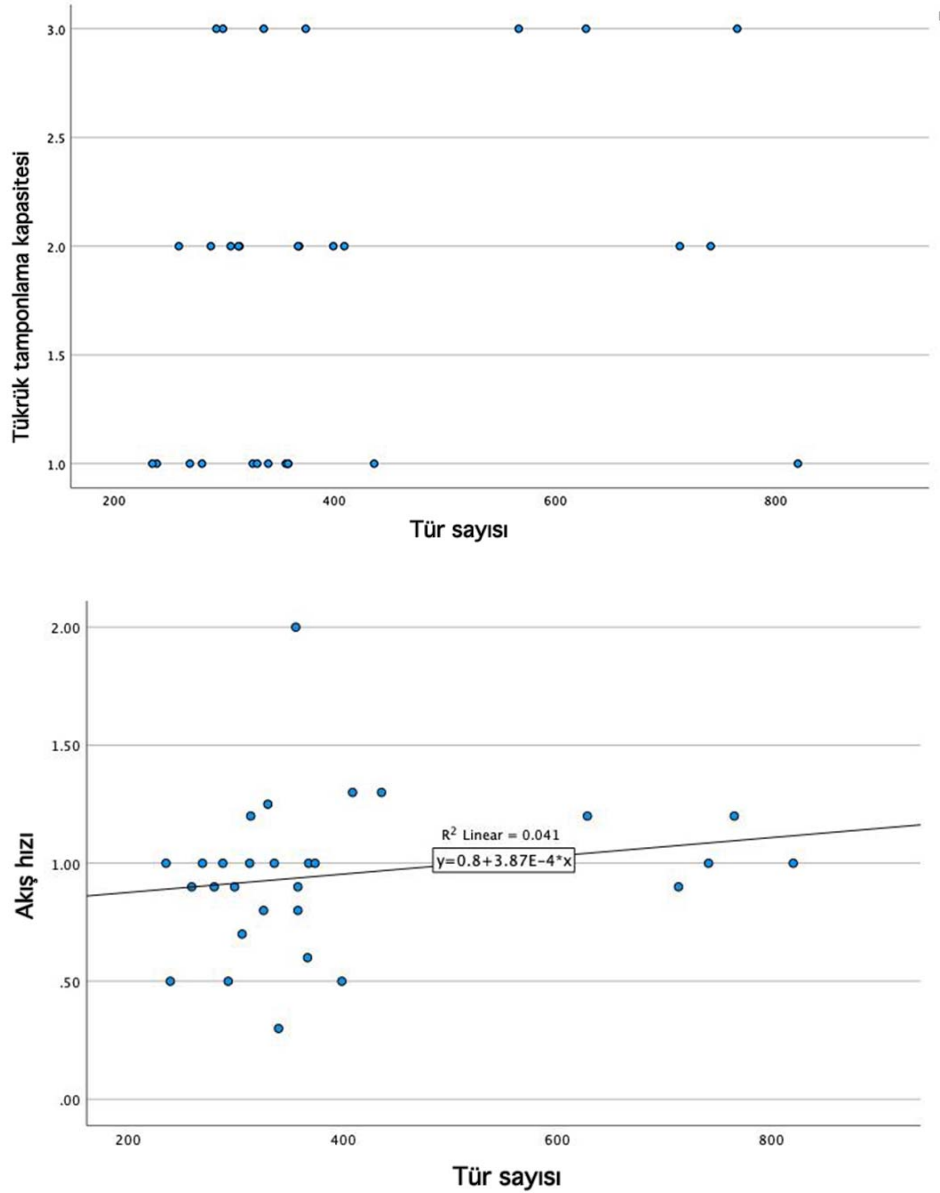
^a S: Kontrol grubu. H: Primer immün yetersizliği

^b dmft (d: çürük, m: eksik veya f: dolgulu t: süt dişleri)

^c Y: yüksek, O: orta, D: düşük

^d *p-değeri*: gruplar arasındaki fark. Önemli fark yok ($p > 0.05$)

Tampon kapasitesi ile tür sayısı arasında ($R^2 = 0,06$, $F(1,28) = 1,78$, p -değeri $= 0,19$) anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır (Şekil 4.1). Akış hızı ile tür sayısı arasında da ($R^2 = 0,04$, $F(1,28) = 1,19$, p -değeri $= 0,3$) anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.



Şekil 4.1. Tükürük tamponlama kapasitesi ile akış hızının tür sayısı ile korelasyonu ($p > 0,05$).

4.2. Genel Mikrobiyal Profil

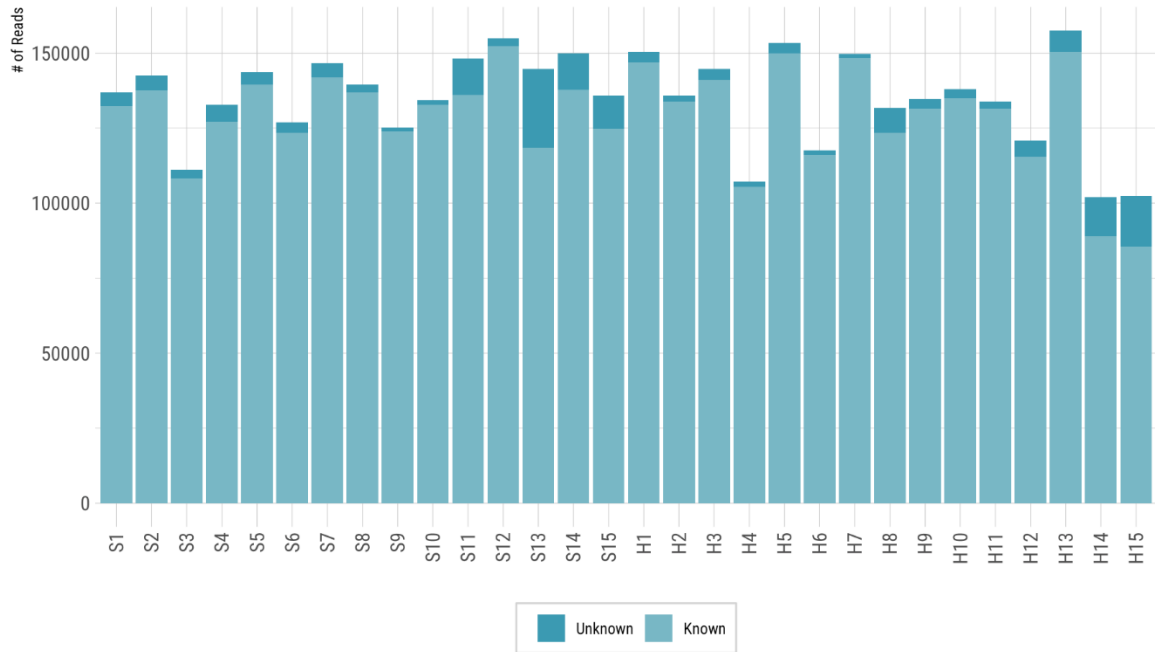
ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep kiti kullanılarak diş çürüklerinden elde edilen DNA'lara ait saflık ve konsantrasyon değerleri Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Diş örneklerinden izole edilen DNA'lara ait değerler.

Örnek	Konsantrasyon (µg/ml)	260/280 nm	260/230 nm
S1	139,4	1,919	1,139
S2	20,735	2,6095	0,26375
S3	62,89	2,0115	0,67545
S4	148,75	1,8805	1,1525
S5	137,775	1,9165	1,0016
S6	160,7	1,91	1,265
S7	157,4	1,952	1,3535
S8	55,145	2,1195	0,67865
S9	25,345	2,257	0,3664
S10	23,675	2,3745	0,33665
S11	84,365	1,9425	0,8383
S12	18,33	3,224	0,2864
S13	13,14	2,735	0,2052
S14	32,25	2,043	0,4207
S15	32,35	2,05	0,4104
H1	31,225	2,334	0,40285
H2	86,865	2,0235	0,8502
H3	116,2	1,959	1,0735
H4	54,46	2,149	0,62335
H5	253,5	1,9085	1,5645
H6	137,8	1,941	1,225
H7	149,5	1,891	1,221
H8	98,225	2,003	1,0325
H9	63,185	1,9855	0,7096
H10	152,95	1,9135	1,2365
H11	99,285	1,956	0,9868

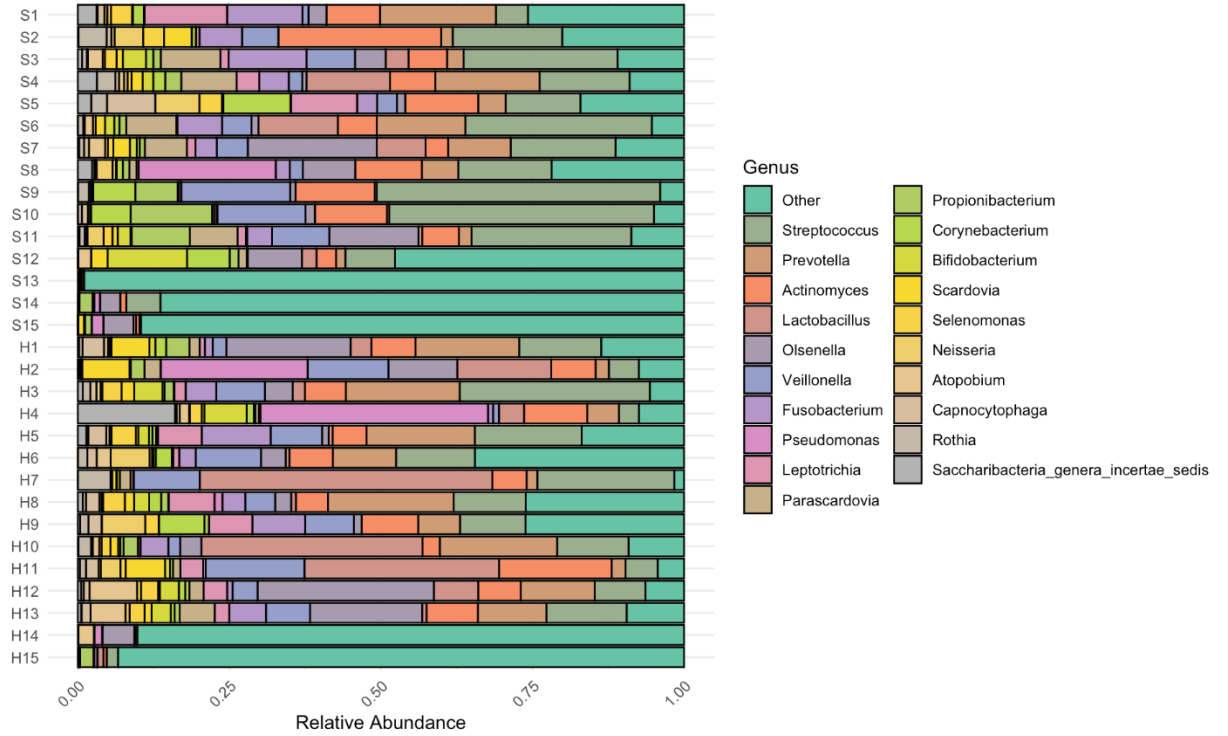
H12	64,655	2,0685	0,7522
H13	75,685	2,0085	0,84195
H14	18,82	2,2335	0,2541
H15	20,445	2,2435	0,2795

Örneklerden izole edilen DNA'lar kullanılarak gerçekleştirilen dizileme işleminden sonra kalite kontrolünü geçen okumalar, farklı taksonomik seviyelerde en yüksek benzerlik gösteren taksonomik birime atanmıştır. Aşağıdaki grafikte (Şekil 4.2.), her bir örnekte tespit edilen toplam okuma sayıları ve cins seviyesine kadar bir taksonomik birime tanımlanmış (açık mavi renkli) okumalar gösterilmiştir. Koyu mavi renkli okumalar, cins seviyesinden daha üst taksonomik birime atanmış okumaları göstermektedir.



Şekil 4.2. Cins seviyesine kadar bir taksonomik birime tanımlanmış okumalar.

Aşağıdaki görselde (Şekil 4.3.), tez kapsamında tüm numunelerde en yüksek oranda görülen 20 bakteriyel cins çubuk grafiği olarak sunulmuştur. İlk 20 cinsten daha az oranda tespit edilenler “Other” (Diğer) olarak gruplanmıştır.

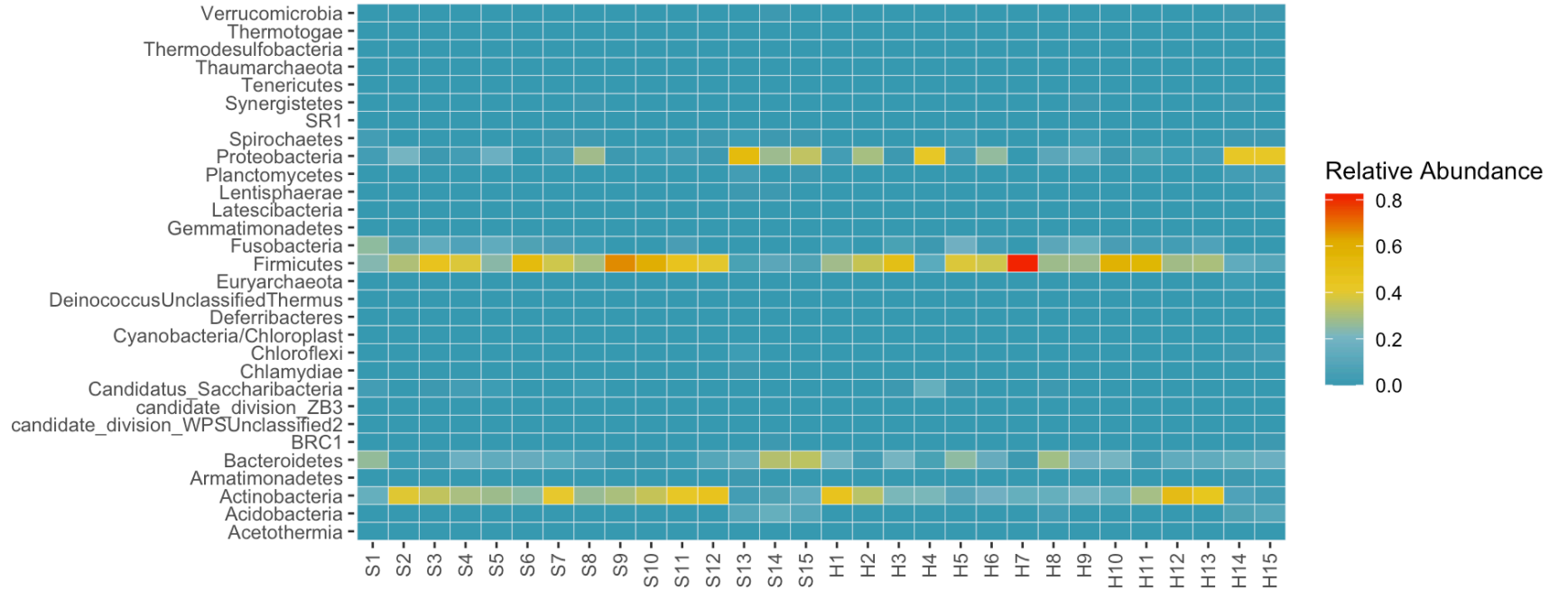


Şekil 4.3. Tüm örneklerde en yüksek orana sahip 20 bakteri suşu. H (Hasta), S (sağlıklı).

Metagenomik analiz, 1327 cins, 303 aile, 123 takım, 82 sınıf ve 46 filuma ait 2440 bakteri suşunun tanımlanmasıyla sonuçlanmıştır. Bu çalışmada tespit edilen tüm bakteri filumları, cinsleri, tür-suşu için örnek nispi bolluklar aşağıdaki gibi sunulmaktadır.

Phylum (Filum)

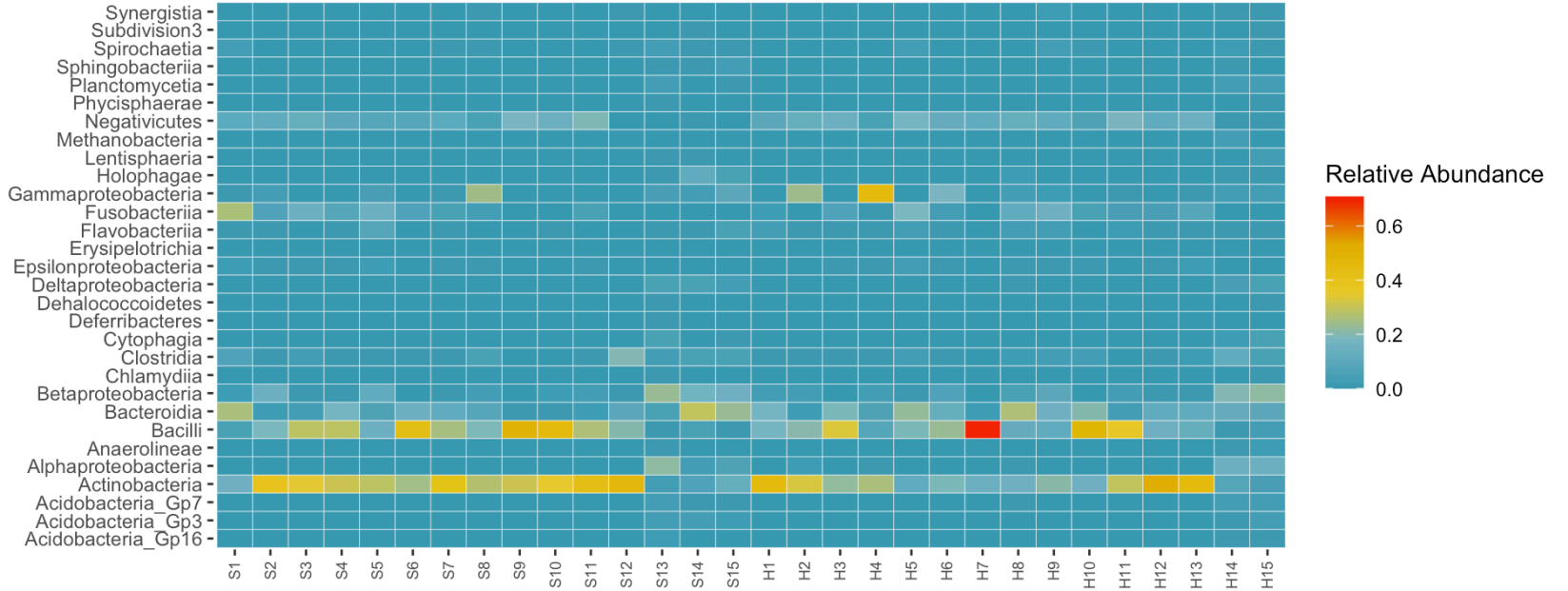
Metagenomik analiz sonucunda, tüm örneklerde toplamda 46 filum tespit edilmiştir. *Firmicutes* (34,64% ve 35,42%), *Actinobacteria* (27,73% ve 23,57%), *Bacteroidetes* (12,83% ve 14,80%), *Proteobacteria* (13,37% ve 15,23%), *Fusobacteria* (6,00% ve 5,40%), *Acidobacteria* (2,43% ve 1,33%), *Candidatus_Saccharibacteria* (0,80% ve 1,40%), (S ve H) olarak sıralanmıştır (\geq %1 nispi bollukta). En yüksek oranda görülen ilk 30 filum aşağıdaki grafikte gösterilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Tüm örneklerde tespit edilen ilk 30 filum. H (Hasta), S (sağlıklı).

Class (Sınıf)

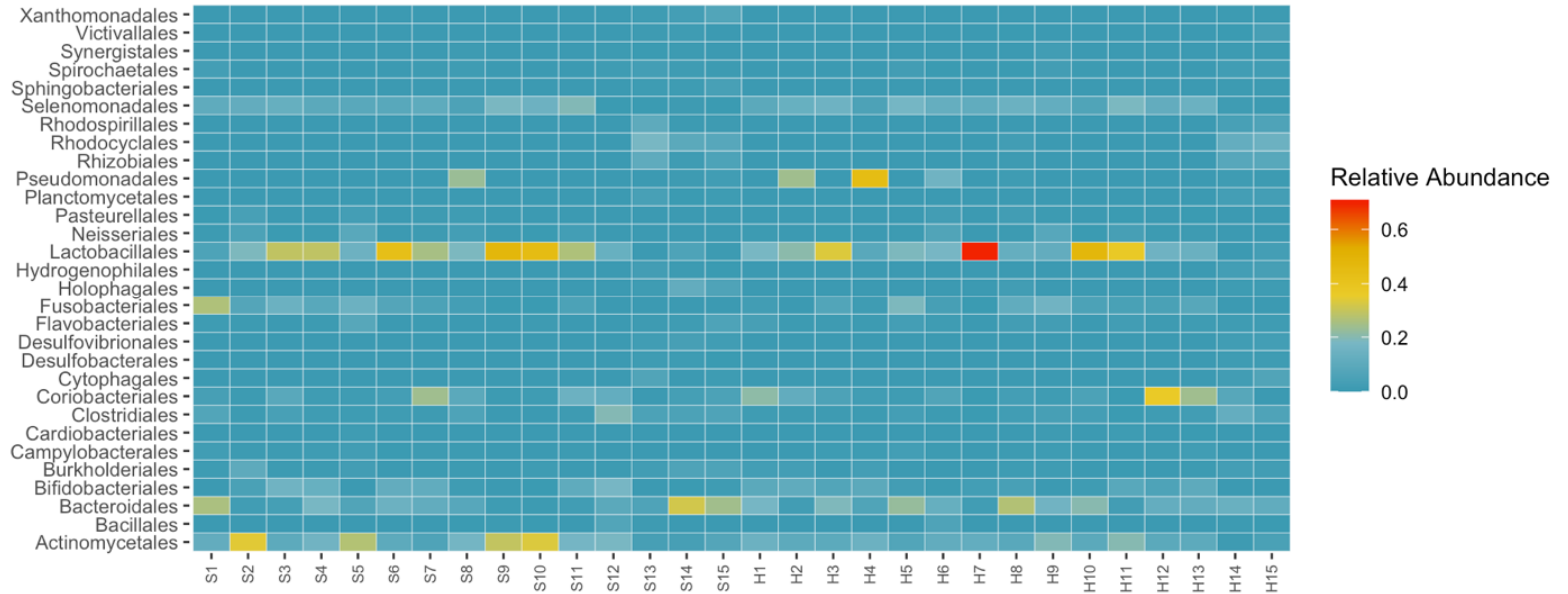
Metagenomik analiz sonucunda, tüm örneklerde toplamda 82 sınıf tespit edilmiştir. *Actinobacteria* (28,00% ve 23,98%), *Bacilli* (22,15% ve 22,35%), *Bacteroidia* (10,64% ve 12,82%), *Negativicutes* (8,75% ve 10,75%), *Fusobacteriia* (6,11% ve 5,46%), *Betaproteobacteria* (6,48% ve 5,38%), *Gammaproteobacteria* (3,52% ve 6,81%), *Clostridia* (3,87% ve 2,53%), *Alphaproteobacteria* (2,09% ve 2,28%) ve *Flavobacteriia* (1,42% ve 1,51%) (S ve H) olarak sıralanmıştır (\geq %1 nispi bollukta). En yüksek oranda görülen ilk 30 sınıf aşağıdaki grafikte gösterilmiştir (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Tüm örneklerde tespit edilen ilk 30 sınıf. H (Hasta), S (sağlıklı).

Order (Takım)

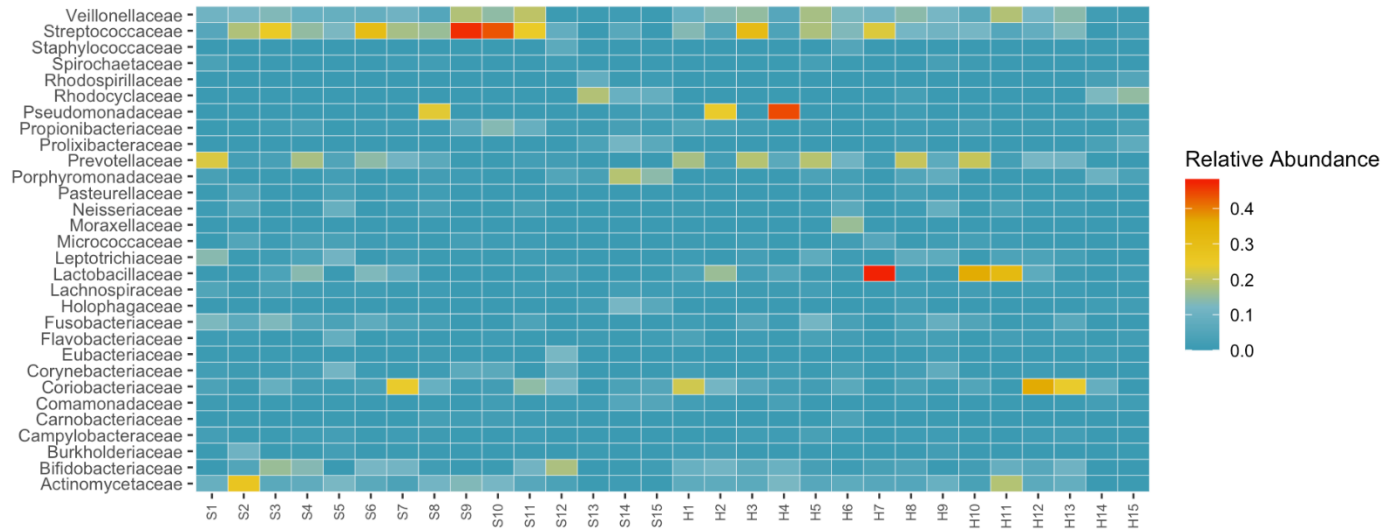
Metagenomik analiz sonucunda, tüm örneklerde toplamda 123 takım tespit edilmiştir. *Lactobacillales* (21,49% ve 21,90%), *Actinomycetales* (16,17% ve 10,71%), *Bacteroidales* (10,93% ve 13,03%), *Selenomonadales* (8,77% ve 10,78%), *Coriobacteriales* (5,95% ve 8,43%), *Fusobacteriales* (6,11% ve 5,47%), *Bifidobacteriales* (5,92% ve 4,87%), *Pseudomonadales* (1,76% ve 5,82%), *Clostridiales* (3,93% ve 2,63%), *Rhodocyclales* (2,34% ve 1,96%), *Burkholderiales* (2,20% ve 1,21%), *Neisseriales* (1,53% ve 1,58%), *Flavobacteriales* (1,46% ve 1,54%), *Rhizobiales* (1,17% ve 1,20%), *Holophagales* (1,26% ve 0,32%), (S ve H) olarak sıralanmıştır (\geq %1 nispi bollukta). En yüksek oranda görülen ilk 30 takım aşağıdaki grafikte gösterilmiştir (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Tüm örneklerde tespit edilen ilk 30 takım. H (Hasta), S (sağlıklı).

Family (Aile)

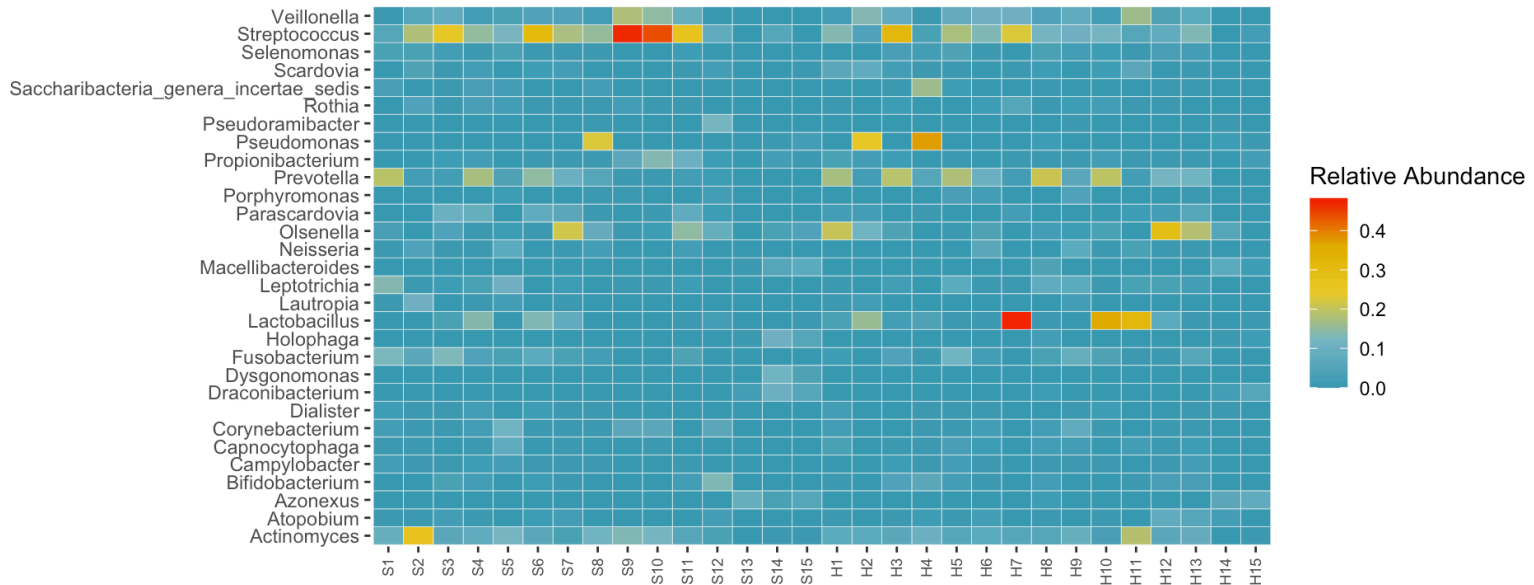
Metagenomik analiz sonucunda, tüm örneklerde toplamda 303 aile tespit edilmiştir. *Streptococcaceae* (17,85% ve 11,25%), *Veillonellaceae* (8,82% ve 10,81%), *Prevotellaceae* (5,65% ve 9,86%), *Actinomycetaceae* (7,89% ve 6,87%), *Coriobacteriaceae* (5,98% ve 8,47%), *Lactobacillaceae* (2,79% ve 10,22%), *Bifidobacteriaceae* (5,95% ve 4,88%), *Fusobacteriaceae* (3,85% ve 3,04%), *Pseudomonadaceae* (1,76% ve 4,77%), *Porphyromonadaceae* (3,27% ve 2,22%), *Leptotrichiaceae* (2,30% ve 2,45%), *Propionibacteriaceae* (2,88% ve 1,31%), *Corynebacteriaceae* (2,65% ve 1,24%), *Rhodocyclaceae* (2,40% ve 2,01%), *Neisseriaceae* (1,55% ve 1,59%), *Flavobacteriaceae* (1,08% ve 1,43%), ve *Micrococcaceae* (1,22% ve 1,04%) (S ve H) olarak sıralanmıştır (\geq %1 nispi bollukta). En yüksek oranda görülen ilk 30 aile aşağıdaki grafikte gösterilmiştir (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Tüm örneklerde tespit edilen ilk 30 aile. H (Hasta), S (sağlıklı).

Genus (Cins)

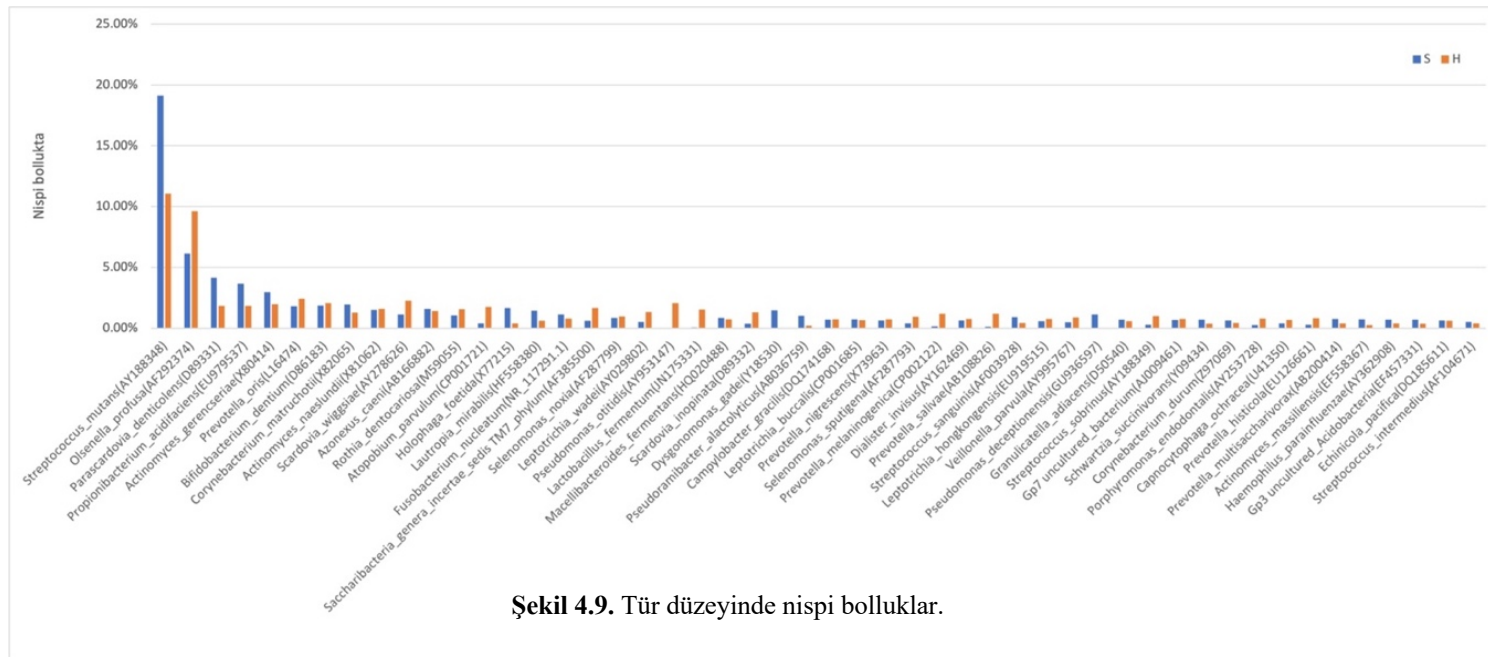
Cins düzeyinde, tüm örneklerde toplamda 1327 cins tespit edilmiştir. H ve S grupları için nispi bollukları en fazla bulunan cinsler; *Streptococcus* (%18 ve %11,3), *Prevotella* (%5,4 ve %9,8), *Actinomyces* (%7,9 ve %6,8), *Lactobacillus* (%2,8 ve %10,2), *Olsenella* (%5 ve %6,8), *Veillonella* (%5 ve %6,5), *Fusobacterium* (4 % ve % 3.1). Her iki grup arasında farklı bolluğu gösteren ancak anlamlı bir fark olmayan *Pseudomonas*'tır (% 2 ve % 4,3) (Şekil 4.8). Metagenomik analiz sonucunda, tüm örneklerde toplamda 1327 cins tespit edilmiştir. En yüksek oranda görülen ilk 30 cins (\geq %1 nispi bollukta) aşağıdaki grafikte gösterilmiştir (Şekil 4.8.).



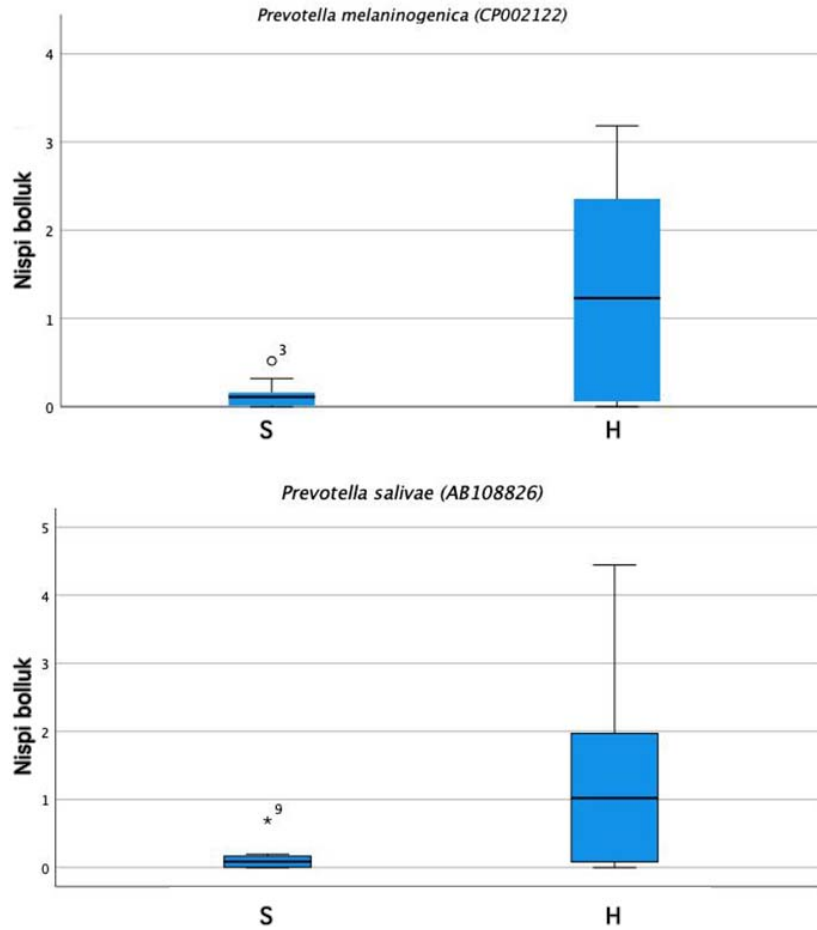
Şekil 4.8. Tüm örneklerde tespit edilen ilk 30 bakteri cinsi. H (Hasta), S (sağlıklı).

Species (Tür)

Metagenomik analiz sonucunda, tüm örneklerde toplamda 2440 tür tespit edilmiştir. *Streptococcus_mutans* (AY188348), (19,13% ve 11,05%), *Olsenella_profusa* (AF292374) (6,12% ve 9,63%), *Parascardovia_denticolens* (D89331) (4,14% ve 1,84%), *Propionibacterium_acidifaciens* (EU979537) (3,64% ve 1,84%), *Actinomyces_gerencseriae* (X80414) (2,97% ve 1,96%), *Prevotella_oris* (L16474) (1,79% ve 2,41%), *Bifidobacterium_dentium* (D86183) (1,87% ve 2,05%), *Corynebacterium_matruchotii* (X82065) (1,93% ve 1,26%), *Actinomyces_naeslundii* (X81062) (1,48% ve 1,58%), *Scardovia_wiggisiae* (AY278626) (1,13% ve 2,25%), *Azonexus_caeni* (AB166882) (1,59% ve 1,42%), ve *Rothia_dentocariosa* (M59055) (1,04% ve 1,56%) (S ve H) olarak sıralanmıştır (\geq %1 nispi bollukta) (Şekil 4.9.).



Numune başına bakteri türü/suşu sayısı 235-820 arasında değişmektedir. Hasta ve sağlıklı gruplarda en bol bulunan 50 tür Kruskal-Wallis testi ile analiz edildiğinde bu iki grup arasında anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir. Yalnızca, *Prevotella melaninogenica* ($p=0.002$) ve *Prevotella salivae* ($p=0.004$) H grubunda anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4.10.).

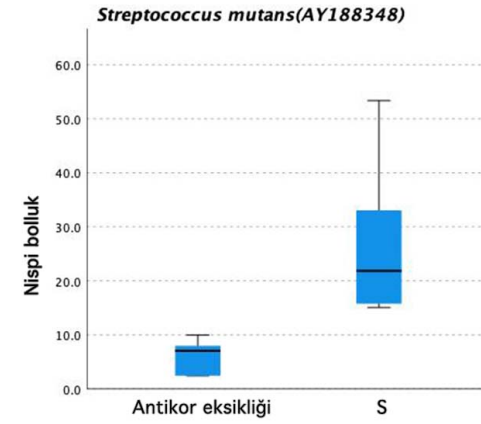
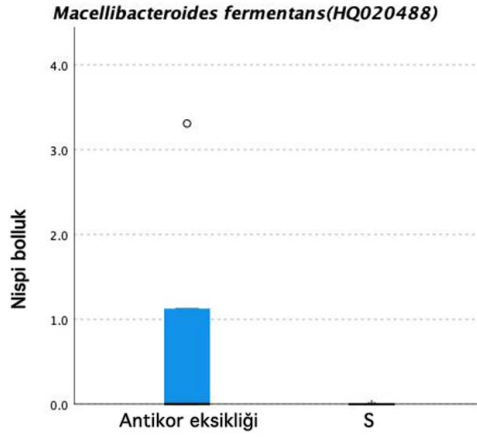
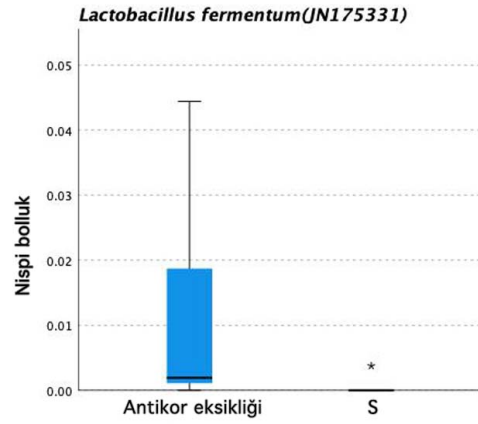


Şekil 4.10. Hasta ve sağlık grupları arasındaki tür düzeyinde farklılıklar. *Prevotella melaninogenica* CP002122 ($p=0.002$) ve *Prevotella salivae* AB108826 ($p=0.004$).

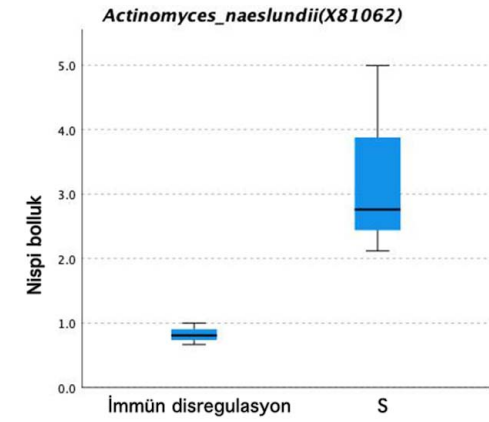
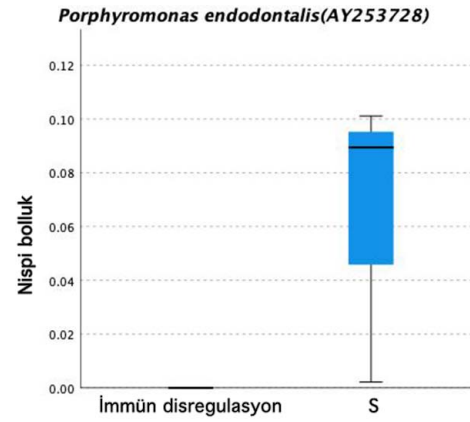
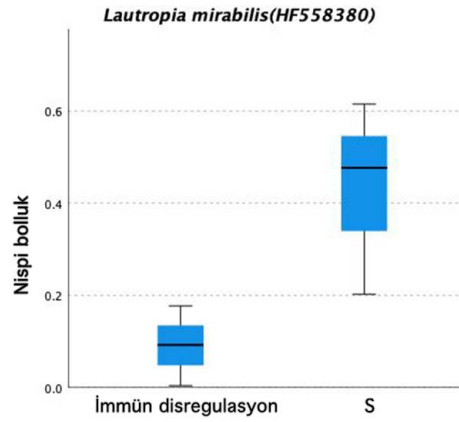
Kontrol (S) grubuna göre hasta grupta (H) anlamlı olarak daha bol bulunan *P. melaninogenica*, klinik olarak önemli anaerobik gram-negatif basillerden (AGNB) biridir. Ağız mikrobiyotasında bulunan ve apse oluşumunun yanı sıra akciğer ile ilgili hastalıkları bilinen türlerden biridir (Brook, 2021). Ayrıca, *P. melaninogenica*'nın çürüklü aktif çocuklarda çürüksüz çocuklara göre daha baskın olduğu bulunmuştur (Qudeimat ve ark., 2021). Bu bulgulara dayanarak, bağışıklık tehlikeye girdiğinde *P. melaninogenica*'nın daha bol hale geldiği görülmektedir. Larsen yüksek *Prevotella* bolluğunun, IL-23 ve IL-1 dahil olmak üzere T yardımcı tip 17 (Th17) üreten antijen sunan hücreler tarafından bağışıklık tepkisini tetikleyen Toll benzeri reseptörleri aktive ettiğini bildirmiştir (Larsen, 2017). Ek olarak, *Prevotella*, epitel hücrelerini nötrofil indükleyen IL-8 ve IL-6 üretmeleri için uyarır (Larsen, 2017; Zheng ve ark., 2020). Nötrofil hücreleri ana antibakteriyel bağışıklık hücreleridir ve lökositlerin %95'i ağız dokularında bulunur (Zenobia ve ark., 2021).

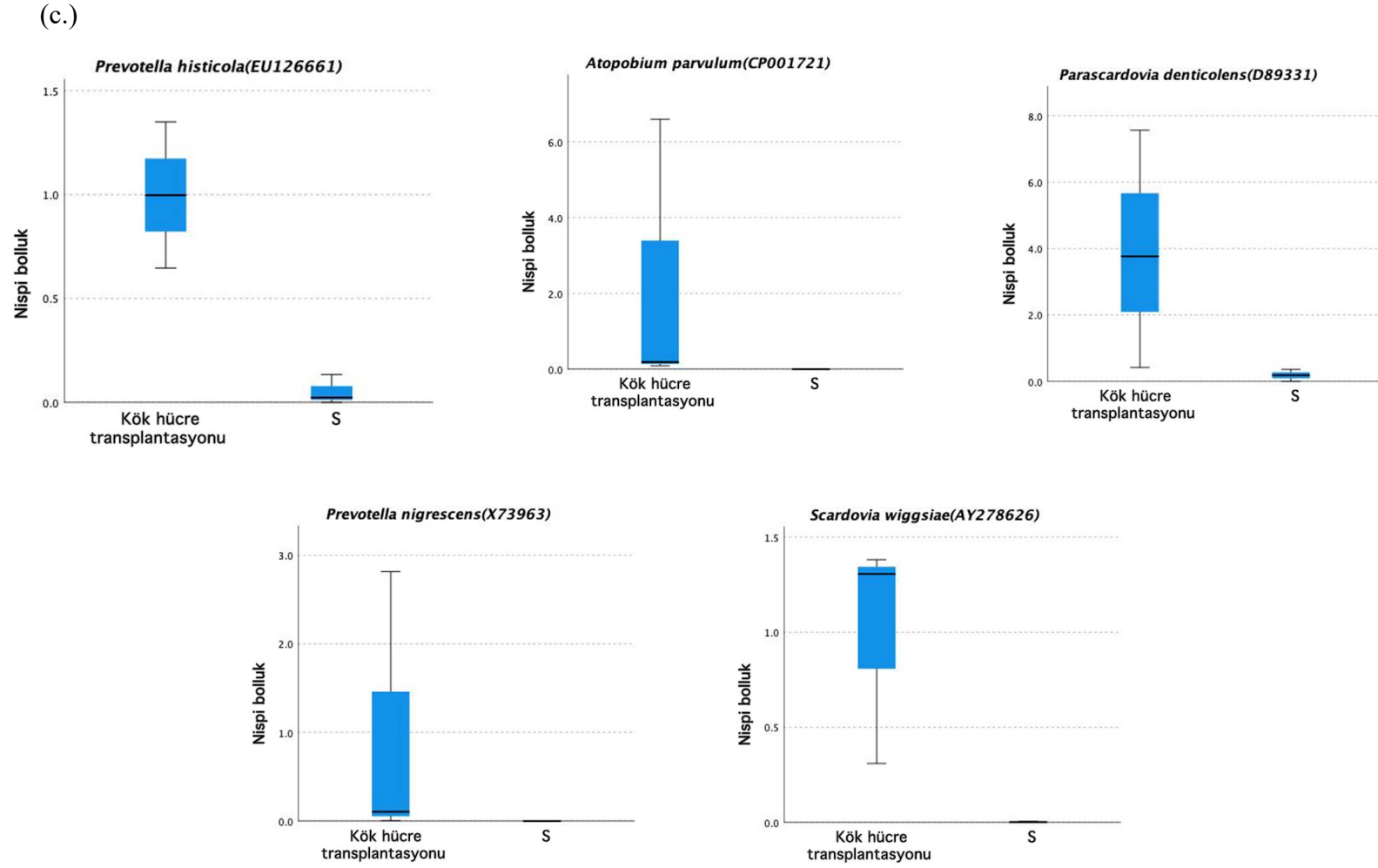
Diş çürüğü mikrobiyal topluluğunu anlamak, çürüklerin bileşiminin ve metabolizmasının ve bunların bağışıklık sistemi ile ilişkisinin araştırılmasıyla başlar. Bu çalışmada, PİYH alt gruplarının her biri kontrol grubuyla karşılaştırılmış ve gruplar arasında anlamlı farklar tespit edilmiştir. *Streptococcus mutans* sağlıklı grupta (kontrol grubu) antikor eksikliği olan hastalara göre daha yüksek oranda bulunurken *Lactobacillus fermentum* ve *Macellibacteroides fermentans* antikor eksikliği olan hastalarda daha yüksek bollukta bulunmuştur. *Actinomyces naeslundii*, *Lautropia mirabiils* ve *Prophyromonas endodontalis* immün disregülasyon grubuna göre sağlıklı grupta önemli ölçüde daha yüksek nisbi bollukta bulunmuştur. Son olarak, kombine immün yetmezliği olan hastalarla sağlıklı grup karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ancak, *Parascardovia denticolens*, *Scardovia wiggsiae*, *Atopobium parvulum*, *Prevotella nigrescens* ve *Prevotella histicola*, kök hücre transplantasyonu gerçekleştirilen SCID hastalarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak daha bol miktarda tespit edilmiştir. (Şekil 4.11).

(a.)



(b.)





Şekil 4.11. PİYH alt gruplarının nisbi bolluk karşılaştırması. (a.) Antikor eksikliği, (b.) Bağışıklık düzensizliği ve (c.) Kök hücre nakli. ($p < 0.05$).

Streptococcus mutans, ilk olarak çürük lezyonlardan izole edilen gram pozitif fakültatif anaerobik bir bakteridir (Clarke, 1924). İyi karakterize edilmiş bir insan patojenidir ve diş plağı ve çürüklerle ilişkilendirilmiştir (Lemos ve ark., 2019; Loesche, 1986). *S. mutans* çok yönlü bir mikroorganizmadır. Yüzeyle tutunmasını sağlayan hücre dışı polimerlerin üretimi, çeşitli karbon kaynaklarından yararlanılması ve zorlu koşullarda yaşayabilmesi, doğal ortamına uygunluğunu artırmaktadır (Loesche, 1986). Bu çalışmada herhangi bir immünolojik hastalığı olmayan çocukların çürüklerinde *S. mutans* bolluğu antikör eksikliği olan hastalara göre daha yüksek bulunmuştur. Bu nedenle *S. mutans*'ın tek başına veya *mutans streptokok* grubu olarak diğer suşlarla birlikte çürüklere neden olduğu ve konağın immün durumundan bağımsız olarak prevalansının değiştiği görülmektedir.

Lactobacillus fermentum, hem mikroaerobik hem de anaerobik ortamlarda üreyebilen gram pozitif heterofermentatif bir bakteridir (Zilmer ve ark., 2009). *L. fermentum*'un hem yetişkin hem de çocukluk çağı çürüklerinde baskın türlerden biri olduğu ileri sürülmüş ve diğer *laktobasillerle* birlikte yaşamaktan ziyade çürük lezyonlarında tek bir *Lactobacillus* olarak yaşadığı bildirilmiştir (Caufield ve ark.,2015). Ayrıca çocukların derin diş çürüklerinde de bulunduğu iddia edilmiştir (Becker ve ark., 2002). Bu çalışmada, antikör eksikliği olan çocukların çürüklerinde *L. fermentum* bolluğunun kontrol grubunun çürüklerine göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Macelibacteroides fermentans, gram pozitif zorunlu anaerobik bir bakteridir (Jabari ve ark., 2012). Diş hastalıkları ile ilişkisi hakkında çok az araştırma vardır. Bu çalışmalardan birinde, kronik periodontitisli hastalarda granülasyon doku örneklerinde *M. fermentans* tespit edilmiştir (Chowdhry ve ark., 2019). Bildiğimiz kadarıyla, bu çalışma ilk kez çocukların çürüklerinde *M. fermentans*'ın yaygınlığını açıkça göstermiştir. Ayrıca antikör eksikliği olan hastalarda *M. fermentans* bolluğu kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Actinomyces naeslundii, insanlarda oral mikrobiyotanın normal bir parçası olarak var olan ve dental biyofilm oluşumunda yer aldığı gösterilen gram pozitif fakültatif anaerobik bir bakteridir (Dige ve ark., 2009). Bu nedenle dental biyofilmin iç kısmında bulunduğu belirtilmiştir. Tang ve arkadaşları *Actinomyces spp.*'yi kök kanal enfeksiyonlarının patojeni olarak rapor etmişlerdir ve *A. naeslundii*'nin enfeksiyonlu kök kanallarındaki prevalansını %9,4 olarak saptamıştır (Tang ve ark., 2003). *A. naeslundii*'nin tek başına oral patogenezdaki rolü uzun yıllardır tartışılmakta, ancak son zamanlarda patojenitesinin oral mikrobiyotanın diğer sakinleri ile etkileşimi üzerine indüklendiği iddia edilmektedir (Rismayuddin ve ark., 2020). Vielkind ve arkadaşları kronik periodontitisli hastalarda *Actinomyces spp.* prevalansını araştırdı ve *A. naeslundii*'nin hem hastalarda hem de sağlıklı kişilerde en yaygın türlerden biri olduğunu buldu (Vielkind ve ark., 2015). Bu çalışmada da, immün disregülasyon grubu ile karşılaştırıldığında, sağlıklı grupta *A. naeslundii*'nin bolluğu önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur. Buradan, *A. naeslundii*'nin tek başına veya diğer bakterilerle birlikte polimikrobiyal etkileşim yoluyla çürüğe neden olduğu ve prevalansının konağın immün durumundan bağımsız olarak değiştiği sonucuna varılabilir. Bu sonuç, bakterilerin diş biyofilmlerinin ve kök kanallarının derin kısımlarında bulunmalarının kendilerini konağın bağışıklık sisteminden gizleyebileceği ve çocukların bağışıklık durumundan bağımsız olarak çoğaldıkları şeklinde yorumlanabilir.

Lautropia mirabilis, insan ağız boşluğunda yaşayan gram negatif fakültatif anaerobik bir bakteridir (Gerner ve ark., 1994). *L. mirabilis* özellikle sağlıklı oral mikrobiyota ile ilişkilendirilmiştir (Baraniya ve ark., 2020; Zhao ve ark., 2017; Qudeimat ve ark., 2021), öyle ki, çürüksüz çocukların supragingival plaklarında en yaygın türlerden biri olduğu bulunmuştur (Qudeimat ve ark., 2021). Dental plaklardaki prevalansları hakkında az sayıda çalışma vardır (Qudeimat ve ark., 2021; Ihara ve ark., 2019), ancak diş çürüğü oluşumundaki rolleri hakkında hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Burada *L. mirabilis*'in immünolojik olarak sağlıklı çocukların diş çürümelerinde baskın türlerden biri olduğu ortaya konmuştur. Ancak diş çürüğü oluşumundaki rolleri hakkında daha fazla araştırma yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Porphyromonas endodontalis, endodontik ve periodontal lezyonlarla ilişkili siyah pigmentli, biyofilm oluşturan anaerobik bir bakteridir (Diaz ve ark., 2019). Minimum besin gereksinimi olan bu zorunlu anaerobik bakteriler, kendilerini konakçının hücresel ve hümmoral bağışıklık sisteminden korudukları kök kanalında bulunur (Diaz ve ark., 2019; Siqueira, 2002). Buna ek olarak, bu bakterilerin biyofilm oluşturma yetenekleri de konukçu organizmanın bağışıklık sisteminden kaçmalarına yardımcı olur. Bu nedenle, yukarıdaki ifadelerden varlıklarının ve zenginliğinin konağın immünolojik durumu ile ilişkili olmayabileceği çıkarılabilir. Bu tez çalışmasında da bu görüşü destekleyecek biçimde, *P. endodontalis*'in bolluğu, immün disregülasyon grubuna göre sağlıklı grupta oldukça yüksek bulunmuştur.

Daha önce *Bifidobacterium denticolens* olarak adlandırılan *Parascardovia denticolens*, gram pozitif, hareketsiz bir anaerobik bakteridir (Dong ve ark., 2002; Crociani ve ark., 1996). Temsilcilerinin çürük (Modesto ve ark., 2006; Crociani ve ark., 1996), dişeti yarıklarından (Maeda, 1980), tükürük (Sanyal ve Russell, 1978) ve diş plağından izole edildiği bildirilen *Bifidobacteriaceae* üyesidir. Prevalansının hem plakta hem de çürüklerde benzer olduğu bildirilmiştir (Modesto ve ark., 2006). Bu çalışmada kök hücre transplantasyonu yapılan SCID hastalarında *P. denticolens* bolluğu sağlıklı gruba göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Tek tür bolluğu her zaman vücuttaki hastalıklar veya kusurlarla ilişkilendirilmeyebilir, ancak olası bağlantılar kurulabilir. Ayrıca, vücut kısımlarındaki mikrobiyal toplulukların göreceli bolluğu da bütüncül bir yaklaşımla değerlendirilebilir. Reyman ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, solunum yolu enfeksiyonlarına (RTI) karşı duyarlılıkta vücudun bölümleri boyunca bulunan mikrobiyal topluluk ağlarının rolü ortaya konmuştur (Reyman ve ark., 2021). Ayrıca, karyojenik *P. denticolens*'in RTI'ya duyarlı gruplarda anahtar türlerden biri olduğu bulunmuştur. Buna göre, bu çalışma ile kök hücre transplantasyonu yapılan SCID hastalarında *P. denticolens* prevalansının yüksek olması bir endikasyon olarak kabul edilebilir ve solunum yolu enfeksiyonlarına yatkınlıklarının değerlendirilmesi için incelenmesi önerilebilir.

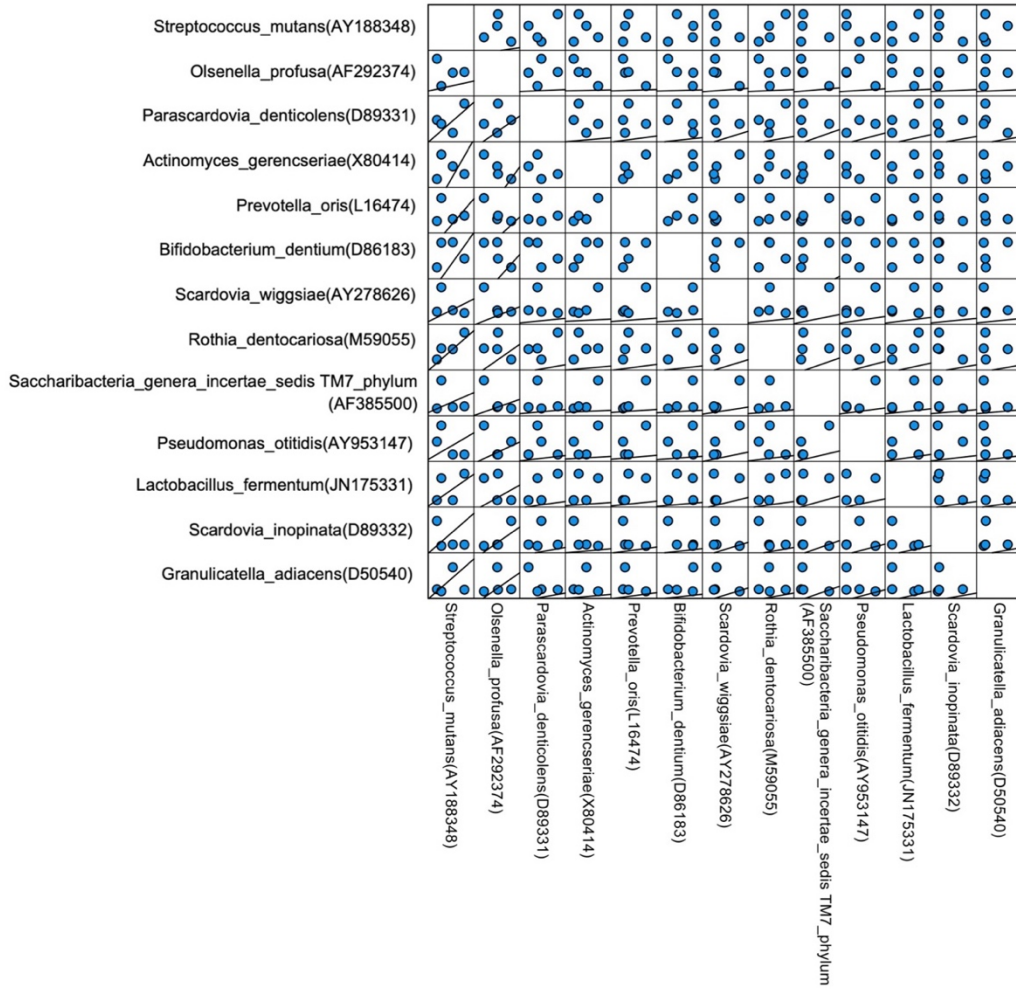
Scardovia wiggisiae, insanın ağız boşluğundan izole edilen gram pozitif, anaerobik, hareketsiz bir basildir (Downes ve ark., 2011). *P. denticolens* gibi *Scardovia wiggisiae* de *Bifidobacteriaceae*'nin bir üyesidir. Glikoz kullanarak ve dışın demineralizasyonuna katkıda bulunan asetik asit üreterek ortamın pH'ını düşürmesiyle bilinir (Kameda ve ark., 2020). Çocuklarda, şiddetli erken çocukluk çağı çürükleri ile güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiş ve erken çocukluk çürükleri için aday çürük patojeni olarak önerilmiştir (Tanner ve ark., 2011). Bu çalışmada, kök hücre transplantasyonu olan SCID hastalarında kontrol grubuna kıyasla yüksek miktarda bulunan bir tür olarak kaydedilmiştir. Ancak bugüne kadar plak ve çürük oluşumu dışında herhangi bir hastalıkla ilişkisine dair bir kanıt bulunamamıştır.

Atopobium parvulum, ağız kokusu ve insan oral enfeksiyonları ile ilişkili gram pozitif, hareketsiz ve zorunlu anaerobik bir bakteridir (Copeland ve ark., 2009). İnsanlarda *A. parvulum* prevalansı yaygın olarak çürük ile bağlantılıdır (Copeland ve ark., 2009; Holgerson ve ark., 2015). Bununla birlikte, bir çalışmada, insan bağırsağında H₂S üreticilerinin merkezindeki anahtar tür olarak atanmış ve göreceli bolluğu, Crohn hastalığının şiddeti ile pozitif olarak ilişkilendirilmiştir (Mottawea ve ark., 2016). Bildiğimiz kadarıyla bu çalışmada elde edilen sonuçlar, kök hücre transplantasyonu yapılan SCID hastalarında sağlıklı gruba kıyasla *A. parvulum*'un anlamlı derecede daha fazla olduğunu gösteren ilk rapordur.

Prevotella nigrescens gram negatif ve zorunlu olarak anaerobik bir bakteridir (Shah ve ark., 1992). Sağlıklı ağız boşluğu (Gharbia ve ark., 1994) ile ilişkilendirilmiştir, ancak aynı zamanda kronik endodontik enfeksiyonlarda (Tomazinho ve ark., 2007) ve periodontal hastalıkta da (Zhang ve ark., 2017) bulunmuştur. *P. nigrescens*'in *P. intermedia* ile birlikte subgingival plakta önemli rolleri olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada, kök hücre transplantasyonu yapılan SCID hastalarında *P. nigrescens* prevalansı, sağlıklı gruba göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

İnsan ağız boşluğundan izole edilen *Prevotella histicola* gram negatif, zorunlu olarak anaerobik ve hareketsiz bir bakteridir (Downes ve ark., 2008). Çürüklü çocuklardan alınan supragingival plak örneklerinde *P. histicola* bolluğunun çürük olmayanlara göre çok daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Xu ve ark., 2014). Benzer şekilde, çürüklü çocukların tükürüğünde çürük olmayan çocuklara göre daha bol olduğu bulunmuştur (Baker ve ark., 2021). *Prevotella*, üyeleri oral ve bağırsak mikrobiyotasında bulunabilen bir cinstir (Xu ve ark., 2014; Baker ve ark., 2021; Mangalam ve ark., 2017). Mangalam ve arkadaşları çalışmalarında, bir insan hastalığının terapisinde bağırsaktan türetilen bir *P. histicola* kullanmıştır (Mangalam ve ark., 2017). Bu çalışmada, klinik öncesi bir hayvan modeli kullanarak multipl sklerozu (MS) baskılamak için *P. histicola*'yı kullanılmışlardır. Bu sonuç, *P. histicola*'nın ağız boşluğunda bir hastalığa yol açabilecekken vücudun diğer bölgelerindeki bir hastalığın tedavisi için terapide kullanılabilmesi ile ikili bir role sahip olabileceğini ortaya koymuştur. Bu çalışmada, kök hücre transplantasyonu yapılan SCID hastalarında *P. nigrescens* prevalansı sağlıklı gruba göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Yukarıda verilen analizlere ek olarak tez kapsamında PİYH alt gruplarındaki türlerin anlamlı korelasyonu için Spearman testi yapılmış olup, *Prevotella oris*'in hem *Scardovia wiggsiae* hem de *Saccharibacteria genera incertae sedis TM7* filumu ile pozitif bir korelasyon ilişkisine sahip olduğunu gösterilmiştir ($p < 0,05$). Ayrıca, *Scardovia wiggsiae* ile *Saccharibacteria genera incertae sedis TM7* filumu arasında pozitif korelasyon görülmektedir ($p < 0,01$) (Şekil 4.12). *Saccharibacteria TM7*, konakçı mikrobiyomu öldürerek veya konakçı bakteri büyümesini engelleyerek konakçının göreceli bolluğunun değişmesine yol açarak oral mikrobiyota yapısını değiştirme potansiyeline sahiptir. Yapılan son çalışmalar, bu filum boyunca memeli konakçısı ile ilişkili üyelerde büyük 16S rRNA çeşitliliğini ortaya çıkarmıştır. Bu çalışmalar, bunların vajinoz ve inflamatuvar barsak hastalığı gibi oral mukozal enfeksiyöz hastalıklarla ilişkisini ortaya koymuştur. Bununla birlikte, TM7'yi, fizyolojilerini, yaşam tarzlarını ve sağlık veya hastalıklardaki rollerini geliştirmenin imkansızlığı belirsizliğini korumaktadır (Bedree ve ark., 2019).

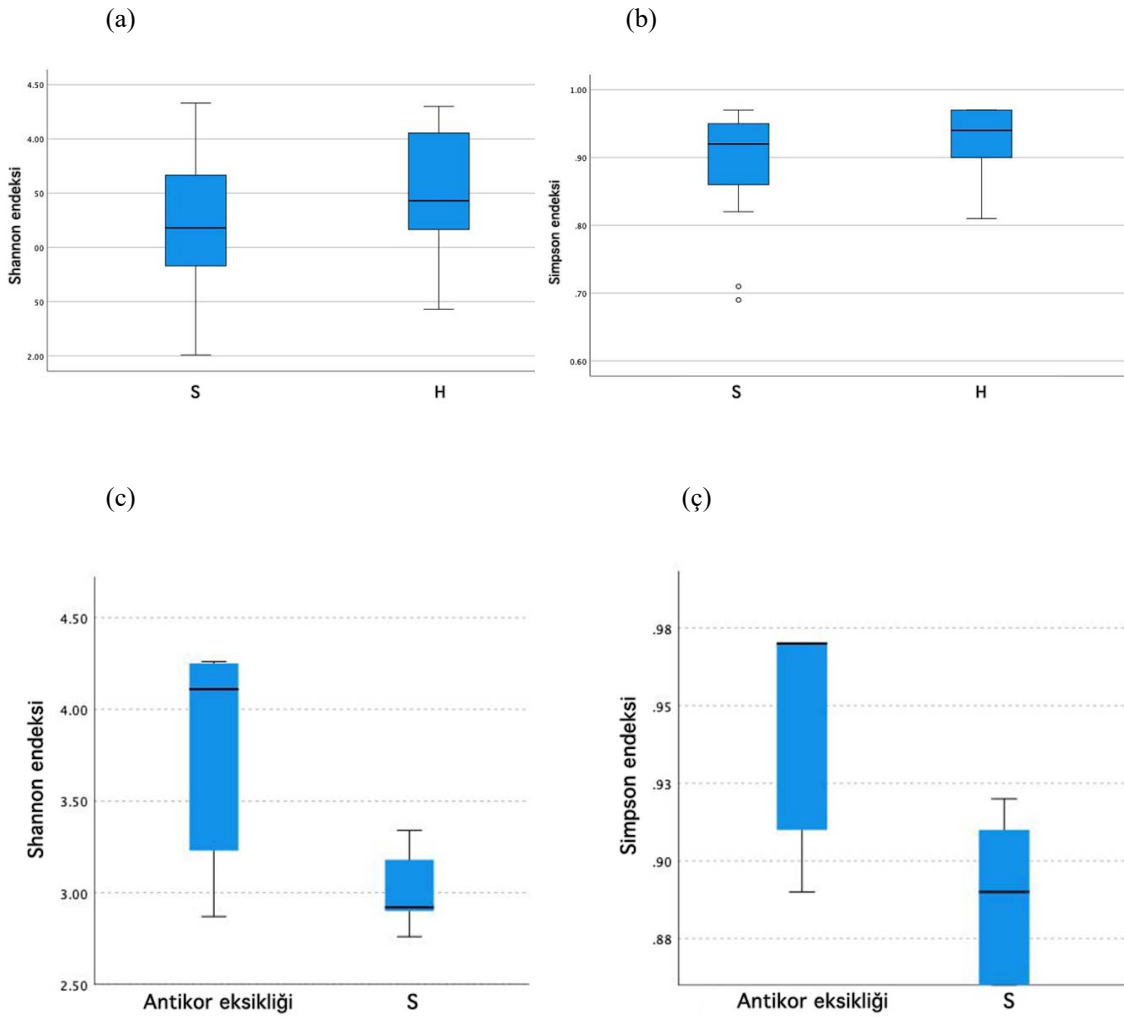


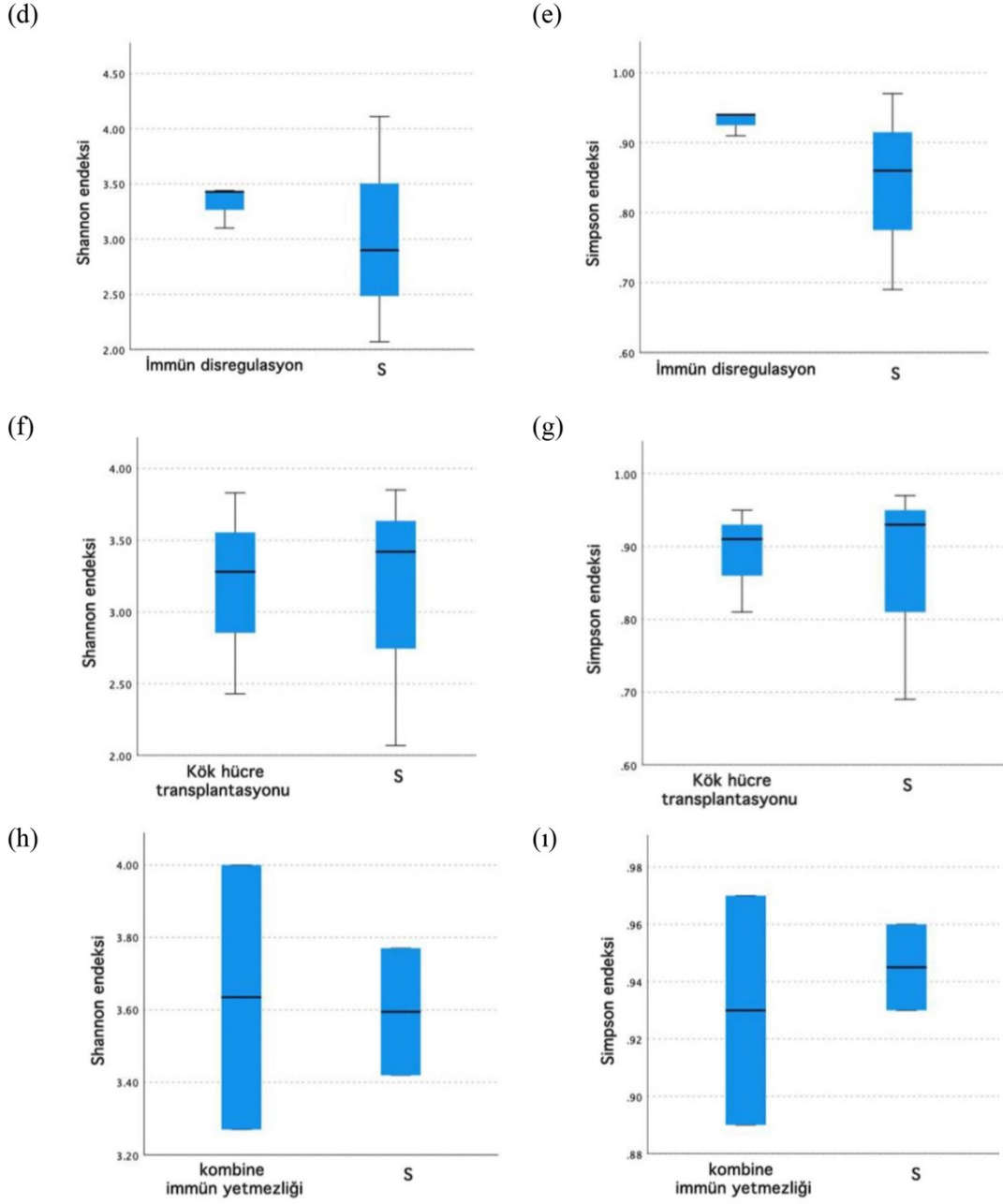
Şekil 4.12. PİYH alt gruplarında tür dağılımı ve bolluk (>3%) arasındaki ilişki.

4.3. Alfa ve Beta Çeşitliliği

Hasta ve sağlıklı grupların çürük mikrobiyota çeşitliliğini ve zenginliğini araştırmak için Shannon-Weiner indeksi ve Simpson indeksi hesaplanmıştır. Analiz sonucunda mikrobiyal çeşitlilik ve zenginliği açısından hasta ve sağlıklı gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Buna ek olarak, tür zenginliği ve alfa çeşitlilik analizleri her bir hasta alt grubu için kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak hesaplanmıştır. Burada yapılan analizler t-Test kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Hasta alt

gruplarının sağlıklı kontrol gruplarıyla karşılaştırılmasında da, Shannon ve Simpson endekslerindeki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur (Şekil 4.13).





Şekil 4.13. Hasta ve sağlıklı grup arasındaki alfa çeşitlilik analizi (a,b). Hasta alt grupları ve kontrol grubu arasındaki çeşitlilik analizi (c-ı) ($p > 0.05$).

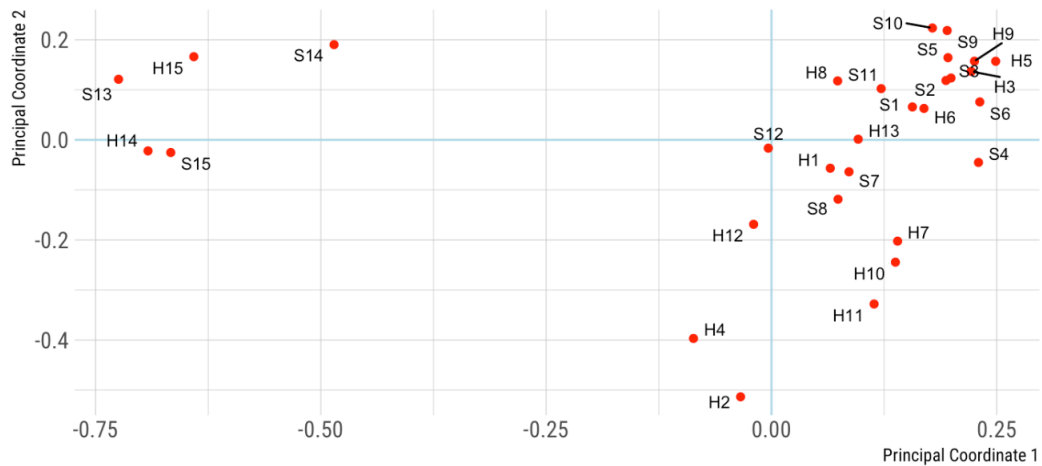
PİYH grubu (Ort= 3.51; SD= 0.58) ile S grubu (Ort= 3.20; SD= 0.68) arasındaki Shannon istatistik indeksi, $t(28) = -1.36$ ve $p=0.19$ olarak bulunduğu için her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). PİYH grubu (Ort= 0.92; SD= 0.05) ve S grubu (Ort= 0.89; SD= 0.09), arasındaki Simpson indeksi ise $t(28) = -1.30$, $p=0.21$ olarak hesaplandığından yine her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 4.3). Ayrıca, her bir alt grup için Shannon ve Simpson endeksleri, Kruskal-Wallis testinde arandığı gibi anlamlı bir farklılığa sahip değildir ($p>0.05$).

Tablo 4.3. Örneklerin Shannon, Simpson ve inverse-Simpson indeksleri ve tür sayısı.

Örnek	Shannon indeksi	Simpson indeksi	Inverse-Simpson indeksi	Tür sayısı
H1	3.23	0.91	11.08	330
H10	3.44	0.94	15.44	340
H11	3.43	0.94	16.83	259
H12	2.87	0.84	6.38	288
H13	3.28	0.91	10.61	367
H14	4.3	0.97	34.72	765
H15	4.25	0.97	32.72	741
H2	2.87	0.89	8.89	336
H3	3.27	0.89	9.33	293
H4	3.1	0.91	10.6	313
H5	3.83	0.95	20.95	306
H6	4	0.97	30.29	358
H7	2.43	0.81	5.36	235
H8	4.26	0.97	37.87	567
H9	4.11	0.97	36.99	436
S1	4.11	0.97	36.1	358
S10	2.01	0.71	3.41	299
S11	2.76	0.86	7.24	356
S12	3.14	0.93	13.85	326
S13	4.33	0.97	30.66	820
S14	3.42	0.93	15.08	628
S15	3.77	0.96	22.34	713
S2	2.92	0.91	10.75	280

S3	2.9	0.86	7.02	314
S4	3.56	0.94	16.97	368
S5	3.85	0.97	30.37	399
S6	2.6	0.82	5.69	239
S7	3.18	0.89	8.76	374
S8	3.34	0.92	12.21	409
S9	2.07	0.69	3.28	269

Temel Bileşen Analizi (Principal Coordinate Analysis - PCoA), tüm numunelerin normalleştirilmiş nispi mikrobiyal çeşitliliğini gösterir. Hesaplama, S ve H grupları arasındaki cins seviyesindeki mikrobiyal profile dayanır. Hem S grubu hem de H grubunun kümelenmiş örnekleri, dağılım içinde benzer mikrobiyal dağılım göstermiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Cins düzeyinde temel koordinat analizi (PCoA).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bağışıklık sistemi, enfeksiyonla (mikroplar) savaşıyor; beyaz kan hücreleri, antikorlar, tamamlayıcı sistem, lenfatik sistem, dalak, timüs ve kemik iliğinden oluşur. İlgili genlerdeki herhangi bir mutasyon, primer immün yetmezliğe yol açabilir. Primer immün yetmezliği olan çocuklar enfeksiyonlara karşı savunmasızdır ve ölüme yol açabilir. Ağız, vücudun enfeksiyonlardan korunmasını sağlayan önemli ortamlardan biridir. Ağızdaki immünoglobulin, mikroorganizmaların neden olduğu herhangi bir enfeksiyona karşı vücudu korur. Oral mikrobiyotada içinde birçok farklı bakteri türü yaşar. Bununla birlikte, insan bağışıklık sistemindeki değişimler sonucunda bakteriler patojenik veya baskılanmış türler haline gelerek yaşamaya devam edebilir. Bu çalışmada, primer immün yetmezliğinin çocukların dış çürüğü mikrobiyotasındaki rolünün tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, primer immün yetersizliği olan çocuklar ile sağlıklı çocukların dış çürüklerindeki mikrobiyota farklılıkları metagenomik yaklaşımla ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca, çalışma gruplarının tükürük parametreleri (tükürük akış hızı, tamponlama kapasitesi ve bakteri yoğunluğu) ile DMFT indeksleri de araştırılmıştır.

Metagenomik çalışmalar öncesinde yapılan DMFT ve tükürük analizlerinde hasta (PİYH) ve sağlıklı kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ayrıca, tükürük akış hızı ve tamponlama kapasitesi ile tür sayısı arasında da istatistiksel olarak bir fark tespit edilmemiştir. PİYH ve kontrol gruplarının çürük mikrobiyotası, PİYH grubunda daha fazla bulunan *Prevotella melaninogenica* CP002122 ve *Prevotella salivae* AB108826 dışında istatistiksel olarak önemli veya anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Bununla birlikte her bir PİYH alt grubunun tür bolluğu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, tür düzeyinde birçok anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir. *Actinomyces naeslundii*, *Lautropia mirabilis* ve *Prophyromonas endodontalis* türleri, kontrol grubunda immün disregülasyon grubuna göre anlamlı derecede yüksek

bulunmuştur. Kombine immün yetmezliği olan çocuklar ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ancak, *Parascardovia denticolens*, *Scardovia wiggsiae*, *Atopobium parvulum*, *Prevotella nigrescens* ve *Prevotella histicola* kombine immün yetmezlik tanısı konulan ve kök hücre nakli tedavisi alan çocuklarda kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. *Streptococcus mutans* bolluğu kontrol grubunda antikor eksikliği olan çocuklara göre daha yüksek tespit edilmiş, ancak *Lactobacillus fermentum* ve *Macellibacteroides fermentans* bolluğu antikor eksikliği olan çocuklarda daha yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak, PİYH ve kontrol gruplarının çürük mikrobiyotasındaki farklılıklar, bakteriyel kompozisyonun değiştirilmesinde bağışıklık sisteminin rolünün olabileceğini göstermektedir. Çürük dişlerden alınan örneklerde bulunan en baskın bakterilerin tamamı, diş çürüğünün başlamasına veya oluşumuna katkıda bulunduğu bilinen bakterilerdendir. Ancak bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda *Prevotella nigrescens* gibi, normalde patojen olmayan bakteriler patojen hale gelebilir. *Parascardovia denticolens* ve *Scardovia wiggsiae*'nin da prevalansları immün yetmezlik ile pozitif ilişkilidir.

Diş çürükleri, çocuklardaki kronik hastalıklardan biridir ve yaşam kalitesini her yönden etkileyen ağrılara neden olur, tedavisi pahalı olabilir ve bazı durumlarda genel anestezi gerektirebilir. Diş çürüklerinin oluşumunun önlenmesinde birçok ürün kullanılmaktadır. Ancak, diş hijyeninde kullanılan ürünler, *Streptococci* ve *Lactobacillus* türleri üzerindeki antimikrobiyal etkiyi test etmeye odaklanmıştır ve bu tez kapsamında elde edilen bulguların değerlendirilmesi ile bir önleme yöntemi olarak bu ürünlerin etkinliğinin artırılması sağlanarak yeni diş hijyeni ürünlerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

Bu çalışmaya, Necmettin Erbakan Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Kliniğine başvuran primer immün yetmezlik hastalıkları (PİYH) ve diş çürüğü olan 15 hasta (yaş ort: 6.5) grubu ile herhangi bir immün yetersizlik hastalığı olmayan diş çürüğü olan 15 sağlıklı çocuk (yaş ort: 6.9) kontrol grubu olarak dahil edilmiştir. Çalışmada primer immün yetmezliği olan çocuklar ile benzer yaşta sağlıklı çocukların diş çürüğü

mikrobiyotaları arasındaki farka odaklanılmıştır. Ancak, her iki grup sonuçları birleştirildiğinde, bu çalışma Konya ilindeki çocukların diş çürüklerindeki bakteri profilinin ortaya çıkarılması açısından literatüre katkı sunmakta ve özgünlük taşımaktadır.

5.2. Öneriler

Aşağıda maddeler halinde öneriler sıralamaktadır.

- ✓ Bu çalışmada diş çürüklerindeki bakteri mikrobiyotası çalışılmıştır. Gelecekte yapılacak bir çalışma ile diğer mikroorganizmalar da (virüs, mantar ve ökaryotik mikroorganizmalar) çalışmaya dahil edilerek daha geniş bir perspektif oluşturulabilir.
- ✓ Gelecek çalışmalarda daha geniş bir katılımcı grup ile spesifik gruplardaki oral mikrobiyota araştırmaları gerçekleştirilebilir. Böylece daha özel çıkarımlar, öneriler ve tespitlerin yapılabilmesi mümkün olacaktır.
- ✓ Bu tez çalışması 15 hasta ve 15 sağlıklı iki grubun katılımıyla gerçekleştirilmiştir. Gelecekteki daha kapsamlı çalışmalar ile tüm Konya ve çevresindeki çürük mikrobiyotası profili çıkarılabilir.

6. KAYNAKLAR

- Alex, Copeland, Johannes, Sikorski, Alla, Lapidus, Matt, Nolan, Tijana, Glavina, Del Rio, Su- san, Lucas, Feng, Chen, Hope, Tice, Sam, Pitluck, Jan-Fang, Cheng, Rüdiger, Pukall, Olga, Chertkov, Thomas, Brettin, Cliff, Han, John, C., Detter, Cheryl, Kuske, David, Bruce, ve Lyn, 2009, Complete genome sequence of *Atopobium parvulum* type strain (IPP 1246 T), *Standards in Genomic Sciences*, 1 (2), 166-173.
- Altschul, Stephen, F., Gish, Warren, Miller, Webb, Myers, Eugene, W., Lipman, David, J., 1990, Basic local alignment search tool, *Journal of molecular biology*, 215(3), 403– 410.
- Animireddy, D., Bekkem, V., T., Vallala, P., Kotha, S., B., Ankireddy, S., ve Mohammad, N., 2014, Evaluation of pH, buffering capacity, viscosity and flow rate levels of saliva in caries-free, minimal caries and nursing caries children: An in vivo study, *Contemporary Clinical Dentistry*, 5(3), 324–328.
- Aronesty, Erik, 2013, Comparison of Sequencing Utility Programs, *The Open Bioinformatics Journal*, 7 (1), 1-8.
- Baker, J., L., Morton, J., T., Dinis, M., Alvarez, R., Tran, N., C., Knight, R., Edlund, A., 2019, Deep metagenomics examines the oral microbiome during dental caries, revealing novel taxa and co-occurrences with host molecules, *BioRxiv*.
- Baker, Jonathon, L., James, T., Morton, Márcia, Dinis, Ruth, Alvarez, Nini, C., Tran, Rob, Knight, ve Edlund, Anna, 2021, Deep metagenomics examines the oral microbiome during dental caries, revealing novel taxa and co-occurrences with host molecules, *Genome Research*, 31 (1), 64-74.
- Ballou, Mark, 2002, Primary immunodeficiency disorders: Antibody deficiency, *Current reviews of allergy and clinical immunology*, 109 (4), 581-591.
- Baraniya, Divyashri, Vinay, Jain, Ronald, Lucarelli, Vincent, Tam, Lisa, Vanderveer, Sumant, Puri, Maobin, Yang ve Nezar Noor, Al-hebshi, 2020, Screening of Health-Associated Oral Bacteria for Anticancer Properties in vitro, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10.
- Battino, M., Ferreiro, M., S., Gallardo, I., Newman, H., N., Bullon, P., 2002, The antioxidant capacity of saliva, *J Clin Periodontol*, (29)189–94.
- Bedree, J., K., Bor, B., Shi, W., McLean, J., S., ve He, X., 2019, Saccharibacteria (TM7) in the Human Oral Microbiome, *Journal of Dental Research* 98 (5), 500–509.

- Belstrom, D., Constancias, F., Liu, Y., Yang, L., Drautz-Moses, D., I., Schuster, S., C., Givskov, M., 2017, Metagenomic and metatranscriptomic analysis of saliva reveals disease-associated microbiota in patients with periodontitis and dental caries, *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 3, 23.
- Bolger, Anthony, M., Marc, Lohse, ve Bjoern, Usadel, 2014, Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data, *Bioinformatics*, 30 (15), 2114–2120.
- Brook, Itzhak, 2021, Bacteroides and Prevotella Species and Other Anaerobic Gram-Negative Bacilli, *In Red Book*, 1012-1014.
- Caporaso, J., Gregory, Justin, Kuczynski, Jesse, Stombaugh, Kyle, Bittinger, Frederic, D., Bushman, ve Elizabeth, K., Costello, 2010, QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data, *Nature method*, 7 (5), 335–336.
- Catharina, Schuetz, Neven, Benedicte, Dvorak, Christopher, Leroy, Sandrine, Ege, Markus, Pannicke, Ulrich, Schwarz, Klaus, 2013, SCID patients with ARTEMIS vs RAG deficiencies following HCT: increased risk of late toxicity in ARTEMIS-deficient SCID, *Blood journal*, 123 (2), 281-289.
- Caufield, P.,W., Schön, C., N., Saraithong, P., Li, Y., ve Argimón, S., 2015, Oral Lactobacilli and Dental Caries: A Model for Niche Adaptation in Humans, *Journal of Dental Research*, 94, 110S-118S.
- Chen, T., Shi, Y., Wang, X., Wang, X., Meng, F., Yang, S., Xin, H., 2017, High-throughput sequencing analyses of oral microbial diversity in healthy people and patients with dental caries and periodontal disease, *Molecular Medicine Reports*, 16(1), 127–132.
- Chowdhry, Rebecca, Singh, Neetu, Sahu, Dinesh, Kumar, Tripathi, Ratnesh, Kumar, Mishra, Archana, Singh, Anjana, Mukerjee, Indrashis, Lal, Nand, Bhatt, Madan, Lal Brahma, ve Kant, Ravi, 2019, Dysbiosis and Variation in Predicted Functions of the Granulation Tissue Microbiome in HPV Positive and Negative Severe Chronic Periodontitis, *BioMed Research International*.
- Clarke, J., Kilian, 1924, On The Bacterial Factor In The Aetiology Of Dental Caries, *Br J Exp Pathol.*, 5 (3), 141–147.
- Cole, Cole, R., Qiong, Wang, Jordan, A., Fish, Benli, Chai, Donna, M., Mcgarrell, ve Yanni, Sun, 2014, Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis, *Nucleic Acids Research*, 42 (D1), D633–D642.
- Crociani, F., Biavati, B., Alessandrini, A., Chiarini, C., ve Scardov, V., 1996, Bifidobacterium inopinatum sp. nov. and Bifidobacterium denticolens sp. nov., Two

- New Species Isolated from Human Dental Caries, *International Union of Microbiological Societies*, 46 (2), 564-571.
- Diaz, Alma, Daniela, Blade, Lizeth, Edith, Quintanilla, Rodriguez, Nemesio, Elizondo, Garza, Karen, Melissa, Garcia, Chavez, Arturo, Santoy, Lozano, Jose, Elizondo, Sergio, Eduardo, Nakagoshi, Cepeda, ve Juan, Manuel, Solis, Soto, 2019, *Porphyromonas endodontalis*, its virulence factor, nutrition, detection, epidemiology and treatment, *International Journal of Applied Dental Sciences*, 5 (3), 366-369.
- Dige, M., K., Raarup, J., R., Nyengaard, M., Kilian, ve Nyvad, B., 2009, *Actinomyces naeslundii* in initial dental biofilm formation, *Microbiology*, 155 (7), 2116-2126.
- Divaris, K., Shungin, D., Rodríguez-Cortés, A., Basta, P. V., Roach, J., Cho, H., Azcarate-Peril, M. A., 2019, The supragingival biofilm in early childhood caries: clinical and laboratory protocols and bioinformatics pipelines supporting oral metagenomics, metatranscriptomics and metabolomics studies of the oral microbiome, *HHS Public Access*, 1922, 525–548.
- Dong, Wenying, Jian, ve Xiuzhu, 2002, Transfer of *Bifidobacterium inopinatum* and *Bifidobacterium denticolens* to *Scardovia inopinata* gen. nov., comb. nov., and *Parascardovia denticolens* gen. nov., comb. nov., respectively, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52 (3), 809-812.
- Downes, Julia, Maria, Mantzourani, David, Beighton, Samuel, Hooper, Melanie, J., Wilson, Ainsley, Nicholson, ve William, G., Wade, 2011, *Scardovia wiggsiae* sp. nov., isolated from the human oral cavity and clinical material, and emended descriptions of the genus *Scardovia* and *Scardovia inopinata*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61 (1), 25-29.
- Downes, Julia, Samuel, J., Hooper, Melanie, J., Wilson, ve William, G., Wade, 2008, *Prevotella histicola* sp. nov., isolated from the human oral cavity, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58 (8), 1788–1791.
- Edgar, Robert, C., 2010, Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST, *Bioinformatics*, 26 (19), 2460–2461.
- Ewels, Philip, Mans, Magnusson, Sverker, Lundin, ve Max, Kaller, 2016, MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report, *Bioinformatics*, 32 (19), 3047–3048.
- Ferrer, M., Abarca, Martínez, F. ve Golyshin, P. N., 2005, Mining genomes and 'metagenomes' for novel catalysts, *Curr Opin Biotechnol*, (16), 588-593.

- Fischer, A., 1992, Severe combined immunodeficiencies, *Immunodeficiency Review*, 3 (2), 83-100.
- Flinn, Aisling, M., ve Gennery, R. Andrew, 2018, Adenosine deaminase deficiency: a review, *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 13 (65).
- Gaspar, Hubert, B., Whitmore, Kathryn, V., 2016, Adenosine Deaminase Deficiency – More Than Just an Immunodeficiency, *Frontiers in Immunology*, 7(314).
- Gerzova, Lenka, Vladimir, Babak, Karel, Sedlar, Marcela, Faldynova, Petra, Videnska, ve Darina, Cejkova, 2015, Characterization of antibiotic resistance gene abundance and microbiota composition in feces of organic and conventional pigs from four EU countries, *PLoS ONE*, 10 (7), e0132892.
- Gharbia, S., E., Haapasalo, M., Shah, H., N., Kotiranta, A., Lounatmaa, K., Pearce, M., A., Devine, D., A., 1994, Characterization of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates from periodontic and endodontic infections, *J Periodontol*, 65 (1), 56-61.
- Gharbia, Saheer, E., ve Shah, Haroun, N., 1992, Biochemical and Chemical Studies on Strains Designated *Prevotella intermedia* and Proposal of a New Pigmented Species, *Prevotella nigrescens* sp. Nov, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42 (4), 542-546.
- Gower, J., C., 1966, Some Distance Properties of Latent Root and Vector Methods Used in Multivariate Analysis, *Biometrika*, 53 (3-4), 325–338.
- Gregory, Dick, J., Andersson, Anders, F., Baker, Brett, J., Simmons, Sheri, L., Thomas, Brian, C., Yelton, A., Pepper, 2009, Community-wide analysis of microbial genome sequence signatures, *Genome Biology*, 10(8), R85.
- Gross, E., L., Beall, C., J., Kutsch, S., R., Firestone, N., D., Leys, E., J., ve Griffen, A., L., 2012, Beyond *Streptococcus mutans*: Dental Caries Onset Linked to Multiple Species by 16S rRNA Community Analysis, *PLoS One*, 7(10), e47722.
- Handelsman, J., 2004, Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms, *Microbiol Mol Biol Rev*, (68), 669-685.
- Holgerson, Pernilla, Lif, Carina, Öhman, Agneta, Rönnlund, Ingegerd, Johansson, 2015, Maturation of Oral Microbiota in Children with or without Dental Caries, *PLoS ONE*, 10 (5).
- Hughes, Jennifer, B., Jessica, J., Hellmann, Taylor, H., Ricketts, ve Brendan, J., M., ve Bohannon, 2001, Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating

- Microbial Diversity, *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (10), 4399–4406.
- Ihara, Yukari, Toru, Takeshita, Shinya, Kageyama, Rie, Matsumi, Mikari, Asakawa, Yukie, Shibata, Yuki, Sugiura, Kunio, Ishikawa, Ichiro, Takahashi, Yoshihisa, Yamashita, 2019, Identification of Initial Colonizing Bacteria in Dental Plaques from Young Adults Using Full-Length 16S rRNA Gene Sequencing, *mSystems*, 4 (5).
- Islas-Granillo, H., Borges-Yañez, S., Medina-Solís, C., Galan-Vidal, C., Navarrete-Hernández, J., Escoffié-Ramirez, M., ve Maupomé, G., 2015, Salivary Parameters: Salivary Flow, pH and Buffering Capacity, in Stimulated Saliva of Mexican Elders 60 Years Old and Older, *West Indian Medical Journal*, 63(7), 758–765.
- Jabari, Linda, Gannoun, Hana, Cayol, Jean-Luc, Hedi, Abdeljabbar, Sakamoto, Mitsuo, Enevold, Falsen, Moriya, Ohkuma, Moktar, Hamdi, Guy, Fauque, Bernard, Ollivier, ve Fardeau, Marie-Laure, 2012, *Macelibacteroides fermentans* gen. nov., sp. nov., a member of the family Porphyromonadaceae isolated from an upflow anaerobic filter treating abattoir wastewaters, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62 (10), 2522-2527.
- Jacques, Izard, ve Rivera, Maria, Amélia, Amado, 2014, Metagenomics for microbiology, *Elsevier Science*.
- Jagathrakshakan, Sri, Nisha, Raghavendra, Jayesh, Sethumadhava, Dhaval, Tushar, Mehta, ve Arvind, Ramanathan, 2015, 16S rRNA gene-based metagenomic analysis identifies a novel bacterial co-prevalence pattern in dental caries, *European Journal of Dentistry*, 9 (1), 127-132.
- Jay, D., Shulman, David, P., Cappelli, 2008, Epidemiology of Dental Caries, in *Prevention in Clinical Oral Health Care*.
- Kameda, Mai, Yuki, Abiko, Jumpei, Washio, Anne, C., R., Tanner, Christine, A., Kressirer, Itaru, Mizoguchi, ve Nobuhiro, Takahashi, 2020, Sugar Metabolism of *Scardovia wiggisiae*, a Novel Caries-Associated Bacterium, *Frontiers in Microbiology*, 11.
- Karlsson, Fredrik, Tremaroli, Valentina, Nielsen, Jens, Backhed, ve Fredrik, 2013, Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases, *Diabetes*, 62 (10), 3341–3349.
- Klindworth, Anna, Elmar, Pruesse, Timmy, Schweer, Jorg, Peplies, Christian, Quast, Matthias, Horn, ve Frank, Oliver, Glockner, 2013, Evaluation of general 16S

ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies, *Nucleic Acids Research*, 41 (1).

- Kostel, Sevgi, Bal, Haskologlu, Sule, Serwas, Nina, K., Islamoglu, Candan, Aytekin, Caner, Kendirli, Tanil, ve Kuloglu, Zarife, 2017, Multiple Presentations of LRBA Deficiency: a Single-Center Experience, *Journal of Clinical Immunology*, 37 (8), 790–800.
- Laczny, Cedric, C., Sternal, Tomasz, Plugaru, Valentin, Gawron, Piotr, Atashpendar, Arash, Margossian, Houry, H., 2015, An application for reference independent visualization and human-augmented binning of metagenomic data, *Microbiome*, 3(1), 1.
- Lander, Eric, S., Waterman, Michael, S., Gu, Hongcang, Gnirke, Andreas, Meissner, Alexander, Lowe, Cb, 1988, Genomic mapping by fingerprinting random clones: A mathematical analysis, *Genomics*, 2(3), 231–239.
- Larsen, Jeppe, Madura, 2017, The immune response toPrevotellabacteria in chronic inflammatory disease, *Immunology*, 151 (4), 363-374.
- Lemos, J. A., Palmer, S. R., Zeng, L., Wen, Z. T., Kajfasz, J., K., Freires, I. A., Abranches, J., ve Brady, L. J., 2019, The Biology of Streptococcus mutans, *Microbiology Spectrum*, 7 (1).
- Lin, Hsin, Hung, ve Liao, Yu, Chieh, 2016, Accurate binning of metagenomic contigs via automated clustering sequences using information of genomic signatures and marker genes, *Scientific Reports*, 6(1), 24175.
- Loesche, Walter, J., 1986, Role of Streptococcus mutans in Human Dental Decay, *American Society for Microbiology*, 50 (4), 353-380.
- Lozupone, Catherine, A., Micah, Hamady, Scott, T., Kelley, ve Rob, Knight, 2007, Quantitative and qualitative β diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities, *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (5), 1576–1585.
- Lozupone, Catherine, ve Rob, Knight, 2005, UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities, *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (12), 8228–8235.
- Maeda, N., 1980, Anaerobic, gram-positive, pleomorphic rods in human gingival crevice, *Bull Tokyo Med Dent Univ*, 27 (1), 63-70.

- Magurran, Anne, E., 2004, Measuring biological diversity, *Blackwell Pub*, ISBN 978-0-632-05633-0).
- Mahé, Frédéric, Torbjørn, Rognes, Christopher, Quince, Colomban, De Vargas, ve Micah, Dunthorn, 2014, Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies, *PeerJ*, 2, e593.
- Mande, Sharmila, S., Mohammed, Monzoorul, Haque, Ghosh, Tarini, Shankar, 2012, Classification of metagenomic sequences: Methods and challenges, *Briefings in Bioinformatics*, 13(6), 669–681.
- Mangalam, Ashutosh, Shailesh, K., Shahi, David, Luckey, Melissa, Karau, Eric, Marietta, Ningling, Luo, Rok, Seon, Choung, Josephine, Ju, Ramakrishna, Sompallae, Katherine, Gibson-Corley, Robin, Patel, Moses, Rodriguez, Chella, David, Veena, ve Taneja, Joseph, Murray, 2017, Human Gut-Derived Commensal Bacteria Suppress CNS Inflammatory and Demyelinating Disease, *Cell Reports*, 20 (6), 1269-1277.
- Marc, Fakhoury, Negrulj, Rebecca, Mooranian, Armin, ve Al-Salami, Hani, 2014, Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments, *Journal of inflammation research*, 4 (7), 113–120.
- Marchesi, Julian, R., Ravel, Jacques, 2015, The vocabulary of microbiome research: a proposal, *Microbiome*, 3(1), 31.
- Marita, Bosticardo, Pala, Francesca, ve Notarangelo, Luigi, D., 2021, RAG deficiencies: Recent advances in disease pathogenesis and novel therapeutic approaches, *European Journal of Immunology*, 51 (5), 1028–1038.
- Marta, Reyman, Melanie, Clerc, Marlies, A., van Houten, Kayleigh, Arp, Mei, Ling, J., N., Chu, Raiza, Hasrat, Elisabeth, A., M., Sanders, ve Debby, Bogaert, 2021, Microbial community networks across body sites are associated with susceptibility to respiratory infections in infants, *Communications Biology*, 4 (1), 1233.
- McCusker, Christine, ve Warrington, Richard, 2011, Primary immunodeficiency, *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 7 (S1).
- Mcdonald, Daniel, Morgan, N., Price, Julia, Goodrich, Eric, P., Nawrocki, Todd, Z., Desantis, ve Alexander, Probst, 2012, An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea, *The ISME Journal*, 6 (3), 610–618.
- McDowell, C., U., Farooq, ve M., Haseeb, 2021, Inflammatory Bowel Disease, *Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*.

- McGinness, Jamie, Bivens, Mary-Margaret, C., Greer, Kenneth, E., Patterson, James, W., ve Saulsbury, MD Frank, T., 2006, Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) associated with pemphigoid nodularis: A case report and review of the literature, *Journal of the American academy of dermatology*, 55 (1), 143-148.
- Mitzi, R., Becker, Bruce, J., Paster, Eugene, J., Leys, Melvin, L., Moeschberger, Sarah, G., Kenyon, Jamie, L., Galvin, Susan, K., Boches, Floyd, E., Dewhirst, ve Ann, L., Griffen, 2002, Molecular Analysis of Bacterial Species Associated with Childhood Caries, *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (3), 1001-1009.
- Modesto, M., Biavati, B., ve Mattarelli, P., 2006, Occurrence of the family Bifidobacteriaceae in human dental caries and plaque, *Caries Research*, 40 (3), 271-276.
- Mottawea, Walid, Cheng-Kang, Chiang, Marcus, Mu hlbauer, Amanda, E., Starr, James, Butcher, Turki, Abujamel, Shelley, A., Deeke, Annette, Brandel, Hu, Zhou, Shadi, Shokralla, Mehrdad, Hajibabaei, Ruth, Singleton, Eric, I., Benchimol, Christian, Jobin, David, R., Mack, Dani, 2016, Altered intestinal microbiota–host mitochondria crosstalk in new-onset Crohn’s disease, *Nature Communications*, 7.
- Muawia, A., Qudeimat, Asma, Alyahya, Maribasappa, Karched, Jawad, Behbehani, ve Nathanael, O., Salako, 2021, Dental plaque microbiota profiles of children with caries-free and caries-active dentition, *Journal of Dentistry*, 104.
- Nielsen, H., Bjørn, Almeida, Mathieu, Juncker, Agnieszka, Sierakowska, Rasmussen, Simon, Li, Junhua, Sunagawa, Shinichi, 2014, Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes, *Nature Biotechnology*, 32(8), 822–828.
- Ochs, H., D., Smith, CIE, Puck, J., M., 2007, Primary Immunodeficiency Diseases: A Molecular and Genetic Approach, *New York: Oxford University*, 454-69.
- Ottavia, M., Delmonte, Schuetz, Catharina, ve D., Notarangelo, Luigi, 2019, RAG Deficiency: Two Genes, Many Diseases, *Journal of Clinical Immunology*, 38 (6), 646–655.
- Oviatt, Cynthia, Rothblum, Jennifer, Wright, Maureen, A., Lefton-Greif, Sharon, A., McGrath-Morrow, Thomas, O., Crawford, ve Howard, M., Lederman, 2016, Ataxia-telangiectasia: a review, *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 11 (159).

- Pace, N., R., Stahl, D., A., Lane, D., L., ve Olsen, G., J., 1986, The analysis of natural microbial populations by rRNA sequences, *Advances in microbial ecology*, 9 (5), 1-55.
- Pallavi, Pandey, N., Venugopal, Reddy, V., Arun, Prasad, Rao, Aditya, Saxena, ve C., P., Chaudhary, 2015, Estimation of salivary flow rate, pH, buffer capacity, calcium, total protein content and total antioxidant capacity in relation to dental caries severity, age, and gender, *Contemporary Clinical Dentistry*, 6(1) S65-S71.
- Parro, Víctor, Moreno-Paz, Mercedes, González-Toril, Elena, 2007, Analysis of environmental transcriptomes by DNA microarrays, *Environmental Microbiology*, 9(2), 453–464.
- Quast, Christian, Elmar, Pruesse, Pelin, Yilmaz, Jan, Gerken, Timmy, Schweer, ve Pablo, Yarza, 2013, The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools, *Nucleic Acids Research*, 41 (D1), D590–D596.
- Riesenfeld , C. S., Schloss, P. D. ve J. Handelsman, 2004, Metagenomics: Genomic analysis of microbial communities, *Annu Rev Genet*, (38), 525-552.
- Rismayuddin, Nurul, Alia, Risma-Wan, Nur, Fatihah-Wan, Mohd, Kamaluddin, Mohd, Hafiz, Arzmi, Ahmad, Faisal, Ismail, Edre, Mohammad, Aidid, Noratikah, Othman, 2020, The Pathogenicity of *Actinomyces naeslundii* Is Associated with Polymicrobial Interactions: A Systematic Review, *Scientific Dental Journal*, 4 (3), 73.
- Sanyal, B., Russell, C., 1978, Nonsporing, anaerobic, gram-positive rods in saliva and the gingival crevice of humans, *Applied and Environmental Microbiology*, 35 (4), 670-678.
- Schoch, Conrad, L., Keith, A., Seifert, Sabine, Huhndorf, Vincent, Robert, John, L., Spouge, ve C André, Levesque, 2012, Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (16), 6241–6246.
- Sedlar, Karel, Kupkova, Kristyna ve Provaznik, Ivo, 2017, Bioinformatics strategies for taxonomy independent binning and visualization of sequences in shotgun metagenomics, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 15, 48–55.
- Siqueira, Jose, F., 2002, Endodontic infections: Concepts, paradigms, and perspectives, *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 94 (3), 281-293.

- Stackebrandt, E., P., Gerner-Smidt, H., Keiser-Nielsen, M., Dorsch, J., Ursing, J., Blom, A., C., Christensen, J., Christensen, W., Frederiksen, S., Hoffmann, W., Holten-Andersen, ve Y., T., Ying, 1994, *Lautropia mirabilis* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative motile coccus with unusual morphology isolated from the human mouth, *Microbiology*, (140), 1787-1797.
- Stackebrandt, Erko, Brett, M., ve Goebel, 1994, Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation ve 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44 (4), 846–849.
- Stackebrandt, Erko, ve Jonas, Ebers, 2006, Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards, *Microbiol Today*, 33 (4), 152–155.
- Suenaga, Hikaru, Ohnuki, Tsutomu, ve Miyazaki, 2007, Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds, *Environmental Microbiology*, 9 (9), 2289–2297.
- Tang, Gaoyan, Lakshman, P., Samaranayake, Hak-Kong, Yip, Frederick, C., S., Chu, Peter, C., S., Tsang, Becky, ve P., K., Cheung, 2003, Direct detection of *Actinomyces* spp. from infected root canals in a Chinese population: a study using PCR-based, oligonucleotide-DNA hybridization technique, *Journal of Dentistry*, 31 (8), 559-568.
- Tanner, C., R., Mathney, J., M., Kent, R., L., Chalmers Jr., N., I., Hughes, C., V., Loo, C., Y., Pradhan, N., Kanasi, E., Hwang, J., Dahlan, M., A., Papadopoulou, E., ve Dewhirst, F., E., 2011, Cultivable anaerobic microbiota of severe early childhood caries, *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (4), 1464-1474.
- The National Academies Press, 2007, *The New Science of Metagenomics: Revealing the Secrets of Our Microbial Planet*. Washington, DC., <https://doi.org/10.17226/11902>.
- Thomas, Torsten, Gilbert, Jack, ve Meyer, Folker, 2012, Metagenomics - a guide from sampling to data analysis, *Microbial Informatics and Experimentation*, 2 (1), 3.
- Tomazinho, Luiz, Fernando, ve Mario, J., Avila-Campos, 2007, Detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in chronic endodontic infection, *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 103 (2), 285-288.
- Tringe, S. G. ve Rubin, E. M., 2005, Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples, *Nat Rev Genet*, (6), 805-814.

- Tringe, Susannah, Green, ve Rubin, M., Edward, 2005, Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples, *Nature reviews*, 6 (11), 805–14.
- Vielkind, Paul, Holger, Jentsch, Klaus, Eschrich, Arne, C., Rodloff, ve Catalina-Suzana, Stingu, 2015, Prevalence of Actinomyces spp. in patients with chronic periodontitis, *International Journal of Medical Microbiology*, 305 (7), 682-688.
- Wang, Qiong, George, M., Garrity, James, M., Tiedje, James, ve R., Cole, 2007, Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy, *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (16), 5261–5267.
- Warren, René L., Sutton, Granger G., Jones, Steven, J., M., Holt, Robert, A., 2007, Assembling millions of short DNA sequences using S sake, *Bioinformatics*, 23(4), 500– 501.
- Weizhong, Li, ve Adam, Godzik, 2006, Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences, *Bioinformatics*, 22 (13), 1658–1659.
- Woese, Carl, R., Fox, ve E., George, N., D., 1977, Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74 (11), 5088–5090.
- Xu, He, Wenjing, Hao, Qiong, Zhou, Wenhong, Wang, Zhongkui, Xia, Chuan, Liu, Xiaochi, Chen, Man, Qin, Feng, Chen, 2014, Plaque Bacterial Microbiome Diversity in Children Younger than 30 Months with or without Caries Prior to Eruption of Second Primary Molars, *PLoS ONE*, 9 (2).
- Zenobia, Camille, Karla-Luise, Herpoldt, ve Marcelo, Freire, 2021, Is the oral microbiome a source to enhance mucosal immunity against infectious diseases?, *npj Vaccines*, 6 (1).
- Zhang, Yifei, Min, Zhen, Yalin, Zhan, Yeqing, Song, Qian, Zhang ve Jinfeng, Wang, 2017, Population-Genomic Insights into Variation in *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* Isolates and Its Association with Periodontal Disease, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7 (9).
- Zhao, Hongsen, Min, Chu, Zhengwei, Huang, Xi, Yang, Shujun, Ran, Bin, Hu, Chenping, Zhang ve Jingping, Liang, 2017, Variations in oral microbiota associated with oral cancer, *Scientific Reports*, 7 (1).
- Zheng, Danping, Timur, Liwinski, ve Eran, Elinav, 2020, Interaction between microbiota and immunity in health and disease, *Cell Research*, 30 (6), 492-506.

Zhenyu, LI, Chen, Yanxiang, Mu, Desheng, Yuan, Jianying, SHI, Yujian, Zhang, Hao, 2012, Comparison of the two major classes of assembly algorithms: Overlap-layout-consensus and debruijn-graph, *Briefings in Functional Genomics*, 11(1), 25–37.

Zilmer, Marika, Mikelsaar, ve Mihkel, 2009, Lactobacillus fermentum ME-3 – an antimicrobial and antioxidative probiotic, *Microbial Ecology in Health and Disease*, 21 (1), 1-27.