



T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
İMMÜNÖLOJİ ANABİLİM DALI



**RAW 264.7 HÜCRE HATTINDA CD80 ve CD86 EKSPRESYONUN  
CRISPR/Cas9 GEN DÜZENLEME SİSTEMİ KULLANILARAK  
BASKILANMASI**

**ELİF ARDAHANLI**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**BURSA-2019**





T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI



**RAW 264.7 HÜCRE HATTINDA CD80 ve CD86 EKSPRESYONUN  
CRISPR/Cas9 GEN DÜZENLEME SİSTEMİ KULLANILARAK  
BASKILANMASI**

**Elif ARDAHANLI**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**DANIŞMAN:**

**Prof. Dr. H. Barbaros ORAL**

**BURSA-2019**

**T.C.**  
**ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ETİK BEYANI**

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum

“Raw 264.7 Hücre Hattında CD80 ve CD86 Ekspresyonunun CRISPR/Cas9 Gen Düzenleme Sistemi Kullanılarak Baskılanması” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

**Elif Ardahanlı**

**29/08/2019**

## SAGLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

İmmünoloji Anabilimdalı Yüksek Lisans öğrencisi Elif Ardahanlı tarafından hazırlanan Raw 264.7 Hücre Hattında CD80 ve CD86 Ekspresyonunun CRISPR/Cas9 Gen Düzenleme Sistemi Kullanılarak Baskılanması konulu Yüksek Lisans tezi 29/08/2019 günü, 11:00-13:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
<b>Tez Danışmanı</b>	<b>Prof. Dr. H. Barbaros Oral</b>	
<b>Üye</b>	<b>Prof. Dr. Ferah Budak</b>	
<b>Üye</b>	<b>Doç. Dr. Ahmet Ata Özçimen</b>	
<b>Üye</b>		
<b>Üye</b>		

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı toplantısında alınan ..... numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER  
Enstitü Müdürü

## TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

29/08/2019

**Adı Soyadı:** Elif Ardahanlı

**Anabilim Dalı:** İmmünoloji

**Tez Konusu:** Raw 264.7 Hücre Hattında CD80 ve CD86 Ekspresyonunun CRISPR/Cas9 Gen Düzenleme Sistemi Kullanılarak Baskılanması

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>AÇIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

### DANIŞMAN ONAYI

**Unvanı Adı Soyadı:** Prof. Dr. H. Barbaros Oral

**İmza:**

## İÇİNDEKİLER

Dış Kapak	
İç Kapak	
ETİK BEYAN.....	II
KABUL ONAY.....	III
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
TÜRKÇE ÖZET.....	VIII
İNGİLİZCE ÖZET.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İmmün Sisteme Giriş.....	3
2.2. Antijen Sunan Hücreler.....	6
2.2.1. Dendritik Hücreler.....	7
2.2.2. Makrofajlar.....	9
2.2.2.1. İmmün Sistemde Makrofajlar.....	11
2.2.2.2. Makrofajların Aktivasyonu.....	13
2.3. Tolerans ve Otoimmünite.....	15
2.3.1. İmmünolojik Tolerans.....	15
2.3.1.1. Merkezi Tolerans.....	17
2.3.1.2. Periferik Tolerans.....	18
2.3.2. Otoimmünite.....	19
2.4. Potansiyel Tolerans İndükleyici Stratejiler.....	20
2.5. Yeni Nesil Genom Düzenleme Teknikleri.....	22
2.5.1. CRISPR/Cas Sistemi.....	24
2.5.1.1. CRISPR/Cas9 Çalışma Mekanizması.....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. LentiCRISPRv2 Vektörünün Hazırlanması.....	27
3.2. CD80 ve CD86 Genlerine Özgü CRISPR Primerlerinin Hazırlanması.....	29
3.3. LentiCRISPRv2 Vektörü ile Oligonükleotitlerin Ligasyonu.....	30

3.3.1. Ligasyon Ürününün <i>E. coli</i> Kompetan Hücrelerine Aktarılması.....	30
3.3.2. Plazmit İzolasyonu .....	31
3.3.2.1. Miniprep ile Plazmit İzolasyonu.....	31
3.3.2.2. Midiprep ile Plazmit İzolasyonu.....	32
3.3.3. İzole Edilen Plazmitlerin Görüntülenmesi.....	33
3.4. Hücre Kültürü.....	33
3.4.1. Hücre Materyali .....	33
3.4.2. Donmuş HEK293FT ve Raw 264.7 Hücrelerinden Kültür Yapılması.....	33
3.4.3. Hücrelerin Pasajlanması .....	34
3.4.3.1. HEK293FT Hücrelerinin Pasajlanması .....	34
3.4.3.2. Raw 264.7 Hücrelerinin Pasajlanması.....	35
3.4.4. Hücrelerin Sayılması .....	36
3.5. Virüs Üretimi.....	37
3.5.1. Virüs Üretiminde Kullanılacak Petrilerin Poly-L-lysin ile Kaplanması...37	
3.5.2. Poly-L-lysin ile Kaplı Petrilere Hücre Ekimi.....	38
3.6. Plazmitlerin Hazırlanması ve Virüs Üretimi.....	38
3.6.1. Küçük Ölçekli Virüs Üretimi .....	39
3.6.2. Büyük Ölçekli Virüs Üretimi.....	39
3.7. Üretilen Virüslerin Toplanıp Saklanması.....	40
3.8. Üretilen Virüs Partikülü Sayısının Hesaplanması.....	41
3.8.1. Virüs Titrasyonu.....	41
3.8.2. Akan Hücre Ölçer Analizi ile Üretilen Virüs Partikülü Sayısı ve MOI Hesaplaması .....	42
3.9. CRISPR Virüslerinin Raw 264.7 Hücrelerine Aktarılması.....	44
3.10. Seleksiyon.....	45
3.11. Akan Hücre Ölçer ile CD80 - CD86 Taraması Yapılması.....	45
3.11.1. Raw 264.7 Hücrelerin IFN- $\gamma$ ile Uyarılması.....	45
3.11.2. Akan Hücre Ölçer Analizi.....	46
4. BULGULAR.....	48
4.1. LentiCRISPRv2 Vektörünün Ligasyona Hazırlanması.....	48

<b>4.2. CD80 ve CD86 Genlerine Özgü CRISPR Primerlerinin Dupleks Haline Getirilmesi.....</b>	<b>48</b>
<b>4.3. LentiCRISPRv2 Vektörü ile Oligonükleotitlerin Ligasyonu.....</b>	<b>49</b>
<b>4.4. Virüs Üretimi ve Akan Hücre Ölçer Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....</b>	<b>51</b>
<b>4.5. Raw 264.7 Hücrelerine Gen Transfeksiyon Etkinliğinin Saptanması.....</b>	<b>52</b>
<b>4.6. CD80 ve CD86 Susturulmasının Akan Hücre Ölçer ile Değerlendirilmesi...53</b>	
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>58</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>63</b>
<b>7. SİMGELER VE KISALTMALAR .....</b>	<b>68</b>
<b>8. EKLER.....</b>	<b>69</b>
<b>9. TEŞEKKÜR.....</b>	<b>98</b>
<b>10. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>99</b>



## TÜRKÇE ÖZET

İmmünolojik tolerans, bağışıklık sisteminin bir antijene yanıt vermemesi durumudur. İmmünolojik toleransın başarısızlığı otoimmünite ve otoimmün hastalıklarla sonuçlanır. Son yıllarda otoimmün hastalıkların görülme sıklığı ve prevalansında rahatsız edici bir artış vardır. Bu hastalıklar kronik yapıları, ilgili sağlık hizmetleri maliyetleri ve genç nüfuslardaki prevalansı sebebiyle önemli bir klinik problemdir. Bu çalışmada T hücrelerini uyaran profesyonel antijen sunan hücrelerden makrofajlarda, CD80 ve CD86 genlerinin susturularak, T hücrelerinde anerji oluşturulup tolerans mekanizmasının geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada, mouse CRISPR Knockout Pooled Library kullanılarak seçilen CD80 ve CD86 genlerine özgü oligonükleotitler, LentiCRISPRv2 vektörüne klonlandı. Ligasyon yapılan CRISPR vektörlerinin virüsleri üretildi ve Raw 264.7 hücreleri bu virüslerle transdükte edildi. Bu hücreler daha sonra puromisin seleksiyonuna tabi tutuldu ve hayatta kalan hücreler, de novo sentezin baskılanıp baskılanmadığını göstermek için IFN- $\gamma$  ile uyarıldı. Ardından bu hücreler CD80 ve CD86 monoklonal antikolarıyla muamele edilerek akan hücre ölçerinde okutulup analizleri yapıldı. IFN- $\gamma$  ile uyarımı takiben yapılan akan hücre ölçer sonuçlarında, kontrol vektörüyle transdükte edilen hücrelerle benzer şekilde gen düzenlemesi yapılan makrofajlarda CD80 ve CD86 ekspresyonlarında artış görülmüş olup, beklenen CD80-CD86 susturulması gerçekleşmemiştir.

Otoimmün hastalıklara karşı tolerans mekanizmalarının tetiklenmesine yönelik tedavi denemeleri yapılmakta ve olumlu sonuçlar alınmaktadır. Özellikle CD80 ve CD86 ekspresyonunu baskılanması üzerine yapılmış çalışmalar yeni olup bizim çalışmamız da bu denemelere örnektir. Çalışmamızda CD80-CD86 genleri susturulmasa da, sorunu çözmeye yönelik ileri çalışmalarda, CRISPR/Cas9 sistemi ile eş uyaran sinyalini baskılamaya yönelik yaklaşımlar alternatif tedavi yöntemi olarak yerini alabilir.

**Anahtar Kelimeler:** CRISPR/Cas9, Otoimmün Hastalıklar, İmmün Tolerans, Eş uyaran molekülleri

## İNGİLİZCE ÖZET

### **SUPPRESSION of CD80 and CD86 EXPRESSION RAW 264.7 CELL LINE BY USING CRISPR/Cas9 GENE EDITING SYSTEM**

Immunological tolerance is a condition in which the immune system does not respond to an antigen. Failure of immunological tolerance results in autoimmunity and autoimmune diseases. There has been a disturbing increase in the incidence and prevalence of autoimmune diseases in recent years. These diseases are important clinical problems due to their chronic structure, related health care costs and prevalence in young populations. In this study, it was aimed to improve tolerance mechanism by forming anergy in T cells by silencing CD80 and CD86 genes in macrophages which are one of professional antigen presenting cells that stimulate T cells.

In study, the oligonucleotides specific to CD80 and CD86 genes selected by using Mouse CRISPR Knockout Pooled Library were cloned into LentiCRISPRv2 vector. Viruses of ligated CRISPR vectors were generated and Raw 264.7 cells were transduced with these viruses. These cells were then subjected to puromycin selection and the surviving cells were stimulated with IFN- $\gamma$  to show whether de nova synthesis was suppressed. These cells were then threated with CD80 and CD86 monoclonal antibodies and read and analyzed by flow cytometry. In flow cytometry results following IFN- $\gamma$  stimulation showed an increase in CD80 and CD86 expression in macrophages transduced with CRISPR vector similar to cells transduced with the control vector, expected CD80-CD86 silencing did not occur.

Treatment attempts are being made to trigger tolerance mechanisms against autoimmune diseases and positive results are obtained. In particular studies on the suppression of CD80 and CD86 expression are new and our study is an example of these attempts. Although CD80-CD86 genes could not be silenced in our study, in further studies aimed at solving the problem, approaches to suppress the co-stimulatory signal with CRISPR/Cas9 system may be used as an alternative treatment method.

**Keywords:** CRISPR/Cas9, Autoimmun Disease, Immune Tolerance, Co-stimulatory Molecules

## 1. GİRİŞ

Bağıışıklık sistemi vücudu bakteri, virüs, mantar ve parazitler gibi mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlara karşı koruyan sistemdir (Levinson, 2010). Bağıışıklık sistemi, bir yandan patojen mikropları, toksik veya alerjik proteinleri ortadan kaldırırken, diğer yandan da kendi doku ve antijenlerine karşı yanıt vermekten kaçınması gerekir. Bu durum öz antijenlere yönelik immün yanıtları önleyecek mekanizmaların olmasını zorunlu kılmaktadır.

Bazı durumlarda antijene özgül lenfositler hiçbir şekilde yanıt vermezler antijeni yok sayarlar, bu durum immünolojik tolerans olarak tanımlanır. İmmün tolerans mekanizmaları öz antijenlere yönelik immün yanıtları önler. Bu mekanizmalardan biri de anerjidir.

Anerji T hücrelerinin tam etkinleşmesi için gereken eş uyaran sinyalinin yetersiz olduğu durumda gerçekleşir. T hücrelerin çok büyük bir bölümü antijen sunan hücrelerde (ASH) doku uyumluluk kompleksi (Major Histocompatibility Complex; MHC) moleküllerine bağlanan ve bu moleküllerce sunulan peptid antijenlerini tanır (Abbas ve ark., 2014).

Antijen sunan hücreler aynı zamanda T hücrelerinin aktifleşmesi için gerekli olan eş uyaran adı verilen B7 moleküllerini eksprese eder ve yüzeylerinde sergiler (Hekim ve Alkan, 2017). Anerji durumunda ise T hücreleri antijen sunan hücrelerce sunulan antijenleri tanır ancak beraberinde eş uyaran sinyali alamazlar ve böylece T hücreleri yaşamlarını devam ettirirler bile aktif hale geçip antijene yanıt vermezler. Böylece T hücreleri tanıdıkları öz antijene karşı yanıtsız kalırlar. Bu ve diğer tolerans mekanizmalarında bir bozukluk ya da yetersizlik olursa, immün sistem bireyin kendi hücre ve dokularına saldırabilir. Gerçekleşen bu duruma otoimmünite, neden olduğu hastalıklara ise otoimmün hastalıklar denir (Abbas ve ark., 2014).

Son 30 yılda otoimmün hastalıkların görülme sıklığında ciddi bir artış vardır (Lerner ve ark., 2016). Otoimmün hastalıklar, sistem, organ veya doku tipine bağlı olarak yaklaşık 80 farklı tipte sınıflandırılır. Batı nüfusunun yaklaşık %5'i bu anomaliden etkilenir, ancak dünya çapında görülme sıklığı bilinmemektedir. Otoimmün hastalıklar doğada heterojendir ve klinik belirtileri tehlike yaratmayan anomalilerden hayatı tehdit edici koşullara kadar değişir (Laxminarayana, 2017).

Tedavide kullanılan ajanlar umut verici olsa da, mevcut terapötik ajanların çoğu devam eden ve bazen de yaşam boyu süren tedaviyi gerekli kılarak, malignite enfeksiyon hastalıklarının gelişmesinde yatkınlığa sebep olur. (Rosenblum ve ark., 2015).

Günümüzde otoimmün hastalıkların tedavisinde hedeflenen, spesifik otoimmün hastalığın, selektif olarak baskılanması ve bağışıklık sisteminin geri kalanının bulaşıcı hastalıkların ve kanserin kontrolü için fonksiyonel olarak aktif kalmasının bir yolunu keşfetmektir. Amaç, potansiyel yan etki riskini azaltmak için hastalığa özgüllüğü artıran tedaviler geliştirmektir (Wraith, 2017).

Potansiyel Tolerans indükleyici stratejiler temelde dendritik hücreler üzerinden geliştirilir. Bu stratejilerden biri tolerojenik dendritik hücrelerdir. Bu hücrelerin kullanımı ve nakli otoimmün hastalıklar için umut verici bir terapötik stratejidir (Hirsch ve Ponda, 2015).

Otoimmüniteye karşı geliştirilmek istenen diğer bir stratejide, CD80/86'nın ekspresyonunu önlemek için dendritik hücreleri ve diğer ASH'leri genetik olarak değiştirmektir (Tan ve ark., 2005)

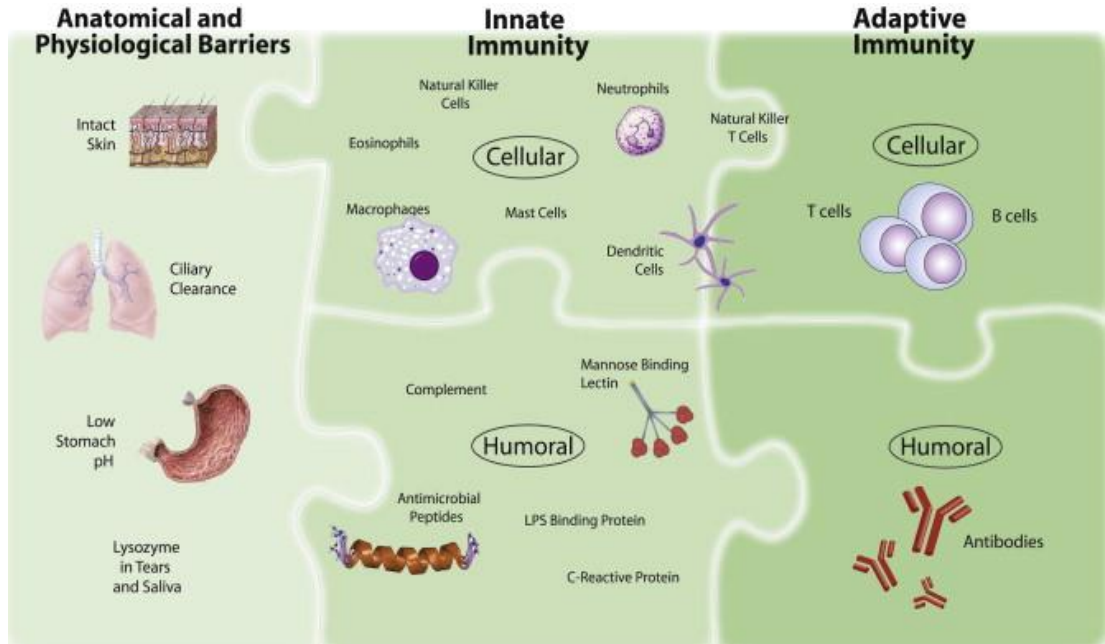
Bu tez çalışmasında da profesyonel antijen sunan hücrelerden biri olan makrofajlarda, eş uyaran molekülleri CD80 ve CD86 genleri susturulup, T hücrelerinde anerjinin tetiklenerek otoimmün hastalıklara karşı tolerans geliştirilmesi amaçlanmıştır. Aynı stratejinin transplantasyon toleransını sağlamak amacıyla kullanılabilme potansiyeli söz konusudur.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İmmün Sisteme Giriş

İmmünite, temelde enfeksiyon hastalıkları olmak üzere birçok farklı hastalığa karşı gösterilen dirençtir. İmmün yanıt ise bu hastalık etmenlerine karşı, kişide immün sistemi oluşturan hücre ve moleküller aracılığıyla gelişen koordineli ve kollektif yanıttır. İmmün sistem sadece enfeksiyon ve kanser gibi hastalıklara karşı yanıtta rol almaz. Aynı zamanda vücudumuzdaki ölü hücrelerden arınma ve doku onarımını başlatma gibi önemli işlemlere de katılır (Abbas ve ark., 2014). Bir başka önemli fonksiyonuda vücudumuza mukozal yüzeylerden giren toksik veya alerjik maddeleri ortadan kaldırmasıdır (Chaplin, 2010). Ancak, bağışıklık sisteminin en önemli ve temel işlevi esasında, bakteri, virüs, mantar ve parazitler gibi mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonları önlemek veya sınırlamaktır (Levinson, 2010).

İnsan mikrobiyal savunma sistemi şekil 1’de görüldüğü gibi 3 seviyeden oluşur. Bunlar anatomik ve fizyolojik engeller, doğal bağışıklık ve edinsel bağışıklıktır (Turvey ve Broide, 2010b).



Şekil 1. İnsanda mikrobiyal savunma sistemi (Turvey ve Broide, 2010).

Mikroorganizmalara karşı ilk savunma hattı, cilt ve mukoza tabakasıdır. Mikroorganizmalar bu hattı kırar ve vücuda girerse, bağışıklık sisteminin doğuştan gelen kolu işgalcileri yok etmek için devreye girer. İkinci savunma hattı olan doğal bağışıklığa ait bileşenler her zaman aktif bir şekilde hazır beklerler ve bu sayede mikroorganizmaların vücuda girmesi üzerine hemen yanıt verirler (Levinson, 2010). Bağışıklık sisteminin istilacı bir patojene, toksine veya alerjene yanıt verme kabiliyetinin merkezinde, patojen mikroorganizmaları tanıyıp ayırt edebilmesi yatar (Chaplin, 2010).

Doğuştan sahip olduğumuz doğal bağışıklık sisteminin mikroorganizmaları öldürme yeteneği edinsel bağışıklık gibi etkene özgül değildir. Doğal bağışıklık sistemi, konak hücrede bulunmayan, sadece farklı mikroorganizmalarda bulunan ortak yapıları tanıyarak yanıt verebilme yeteneğine sahiptir (Abbas ve ark., 2014). Örneğin, bir nötrofil birçok farklı bakteri türünü tanıyıp yanıt verebilir. Sistem bu şekilde ilk savunma hattını geçen patojen mikroorganizmaları ortadan kaldırmaya çalışır.

Doğal bağışıklığın da yetersiz kaldığı durumda devreye üçüncü savunma hattı olan edinsel bağışıklık girer. Doğuştan var olmayan, sonradan kazanılan bu bağışıklık türü çok spesifik bir koruma sağlar, ancak bu kolun tamamen işlevsel hale gelmesi birkaç gün alır. Edinsel bağışıklığın iki bileşeni, hücre aracılı (hücreyel) bağışıklık ve antikor aracılı (sıvısal) bağışıklıktır (Levinson, 2010).

Hücreyel bağışıklık T lenfositlerden (yardımcı T hücreleri ve sitotoksik T hücreleri), hümmoral bağışıklık ise antikorlardan (immünoglobulinler) ve B lenfositlerinden (plazma hücrelerinden) oluşur. Antikorların, toksinleri ve virüsleri nötralle etmek, bakterileri opsonize ederek fagositozu kolaylaştırmak, antikor bağımlı hücreyel sitotoksikite mekanizmasını tetiklemek, komplemen sistemini uyarmak, mukozal bağışıklıkta da görev almak ve bazı özel parazitlere karşı gelişen spesifik immün yanıtları başlatmak gibi birçok önemli fonksiyonları vardır. Öte yandan, hücre aracılı bağışıklık, mantarlar, parazitler ve *Mycobacterium tuberculosis* gibi bazı hücre içi bakterileri; ayrıca virüs bulaşmış hücreleri ve tümör hücrelerini de öldürmede görev alır.

Hem hücre aracılı hem de antikor aracılı yanıtlar, üç önemli özellik ile karakterize edilir. Bunlar;

- I. Milyonlarca farklı antijene cevap verebilme
- II. Bellek oluşturabilme (ilk immün yanıtın ardından oluşan bellek B ve bellek T hücreleri sayesinde, ilk yanıtın yıllar sonra bile ilk günkü gibi yanıt verebilme)
- III. Özgüllük (farklı mikroorganizmalara karşı gelişen farklı yanıtlar)

İmmün sistemin, hemen hemen tüm vücut üzerinde karşılaşmış olduğu milyonlarca yabancı antijene karşı savunma yapmak zorunda olmasından dolayı immün sistemi oluşturan hücreler kan, lenf ve dokular arasında dolaşarak, gerekli bölgelere yerleşebilme özellikleri vardır. Bu dolaşım ve yerleşim özellikleri savunmada dinamik bir ağ oluşturur (Akira ve ark., 2006).

İmmün yanıt antijenin vücuda giriş yerine göre değişir. Deri yoluyla alınan antijenler, bu dokudaki makrofajlar (Langerhans hücre) ile tanınır ve lenfatik yoldan bölgesel lenf düğümlerine taşınır ve immün yanıt hem antijenin giriş yerinde hem de ilişkili lenf bezinde başlar. Kan dolaşımı ile giren antijenler dalaktaki makrofajlarca tanınır. Solunum yolu, gastrointestinal kanal mukozasından girenler ise bölgedeki mukoza ilişkili lenfoid doku ile temas eder ve burada gerekli immün yanıt gelişir. İmmün yanıt nerede başlamış olursa olsun kan ve lenf yolu ile diğer bölgelere ulaşır (Abbas ve ark., 2014).

Bağışıklık sistemi, bir yandan patojen mikropları, toksik veya alerjik proteinleri ortadan kaldırırken, diğer yandan da kendi dokularına veya vücudumuzda yaşayan simbiyotik bakterilere karşı yanıt vermekten kaçınması gerekir.

## 2.2. Antijen Sunan Hücreler

Edinsel immün yanıt, lenfositlerin antijen reseptörü ile antijeni tanınması ile başlar. B ve T lenfositleri tanıdıkları antijenler açısından farklılıklar gösterirler. B hücrelerinin antijen reseptörleri, yani zara bağlı antikolar, birçok farklı makromolekülü (protein, polisakkarid, lipid ve nükleik asit gibi) veya küçük molekülleri tanıyıp yanıt verebilir.

T hücrelerin çok büyük bir bölümü ise antijen sunan hücrelerde doku uyumluluk kompleksi moleküllerine bağlanan ve bu moleküllerce sunulan peptid antijenlerini tanır.

Mikrobiyal antijenleri yakalayıp T lenfositlerinin tanınması için gösteren özelleşmiş bu hücrelere antijen sunan hücreler denir (Abbas ve ark., 2014).

ASH'ler “profesyonel” ve “amatör” olarak ikiye ayrılır.

Profesyonel antijen sunan hücreler, başta dendritik hücreler olmak üzere makrofajlar ve B hücrelerinden oluşur. Bu hücreler, immün yanıtın oluşmasında rol alan en önemli hücrelerdendir. Amatör antijen sunan hücreler ise; endotel hücreleri, fibroblastlar, glial hücreler, pankreas  $\beta$ -hücreleri, keratinositler ve tiroid hücreleridir. Bu hücreler sadece belli koşullarda antijenleri sunar (Flaherty, 2012).

Olgun T hücrelerinin uyarılması genellikle makrofajlar ve dendritik hücreler gibi özel antijen sunan hücrelerin varlığını gerektirir (Sprent, 1995). T hücrelerinin antijeni tanınması ve aktive olması için gerekli olan ASH'ler üç temel işlevi yerine getirir;

- 1) ASH'ler protein antijenleri, antijen işlenmesi (antigen processing) adı verilen işlem süreci ile küçük peptid parçacıklarına böler, bölünen küçük peptid parçalarını MHC molekülleri üzerinde sunmak üzere lenf bezlerini dolaşır.



- 2) ASH'ler, yüzeylerindeki peptid-MHC kompleksi ile T hücre reseptörünü karşı karşıya getirmenin ötesinde, T hücresinin aktive olup yanıt potansiyelinin tümüyle ortaya çıkarılması için eş uyarılar adı verilen B7 moleküllerini eksprese eder ve yüzeylerinde sergiler (Hekim ve Alkan, 2017). Eş uyarıcı molekülleri (Co-stimulatory molecules), T hücre uyarımı için temel olan moleküllerdir. Antijen sunucu hücre yüzeyindeki B7 molekülleri (CD80/CD86) gibi moleküller, T hücre yüzeyindeki CD28 molekülüne bağlanarak, T hücre uyarımına yol açar. Eş uyarıcı olmadan sunulan antijenler, T hücre enerjisine neden olur (Male ve ark., 2008).
- 3) T lenfositlerine antijen sunan bu hücreler, eş uyarıcıların yanı sıra, salgıladıkları sitokinlerle de T lenfositlerini çoğalmaları ve aktif hale gelmeleri için uyarır (Hekim ve Alkan, 2017).

### 2.2.1. Dendritik Hücreler

Dendritik hücreler (DH), immün sistemin en güçlü antijen sunan hücreleridir. Dendritik hücreler bağışıklığın düzenlenmesinde anahtar rol oynar. Çevresindeki antijenleri yakalayan, onları peptidlere işleyen ve bunları lenf düğümlerinde lenfositlere sunan nöbetçi hücreler olarak görev yaparlar (Adema, 2009). Bu hücreler, birincil immün yanıtları uyarma konusunda eşsiz bir kabiliyettir. Aynı zamanda immünolojik toleransın indüksiyonu ve T hücresi aracılı immün cevap tipinin düzenlenmesi için de önemlidirler (Banchereau ve ark., 2000).

Dendritik hücreler, sadece T ve B lenfositlerine talimat vermekle kalmaz, aynı zamanda doğal katil hücrelerini aktive eder ve interferonlar üretir, böylece doğal ve adaptif bağışıklık sistemini birleştirir.

Dendritik hücreler 3 alt gruba ayrılır;

- Miyeloid dendritik hücreler
- Plazmasitoid dendritik hücreler
- Langerhans hücreleri

Enflamatuvar mediatörlerin ve özellikle de Toll benzeri reseptör (Toll Like Receptors; TLR) protein ailesinin, dendritik hücrelerde immün aktivasyon programının indüklenmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. TLR'ler, lipopolisakkarit veya flagellin gibi patojenle ilişkili moleküler kalıpları (Pathogen Associated Molecular Patterns; PAMPS) tanır ve genel olarak immün hücreleri ve özellikle dendritik hücreyi uyarmak için sinyal verir. Dendritik hücre olgunlaşması olarak da adlandırılan bu süreç, immün yanıt ile sonuçlanır (Adema, 2009).

Öte yandan, dendritik hücreler normal şartlar altında efektör T hücrelerinin konakçı hücrelerin ve dokuların kendi antijenlerine karşı yanıt vermemesini sağlayan bağışıklık toleransını korumakla da yükümlüdür. Enfeksiyonun yokluğunda, dendritik hücreler sürekli olarak kendi doku antijenlerini ve patojenik olmayan çevresel antijenleri T hücrelerine sunarlar. Bu koşullar altında, efektör T hücreleri yerine immünoşüpresif düzenleyici T hücreleri (Treg'ler) üretilir (Mellman, 2013). Bu nedenle, dendritik hücreler bağışıklık ve çevresel tolerans ara yüzünde de oldukça etkilidir (Adema, 2009).

Farklı ASH tipleri T hücreye bağımlı immün yanıtta ayrı işlevlere hizmet ederler. Dendritik hücreler bu tür yanıtları uyaran ana hücrelerdir, çünkü dendritik hücreler naif T hücrelerini aktive edebilen en güçlü ASH grubudur. Diğer bir önemli ASH, her dokuda bolca bulunan makrofajlardır. Hücre aracılı immün reaksiyonda, makrofajlar mikropları fagosite eder ve bu mikropların antijenlerini etkin T hücrelerine sunar. Bu T hücreleri de makrofajların mikropları öldürmelerini uyarır (Abbas ve ark., 2014).

Bu tez çalışmasında CD80 ve CD86 genlerinin susturulması, gen transferinin kolaylığı nedeniyle fare makrofaj hattı (Raw 264.7) üzerinde denenmiştir. İleri ki süreçte hedef, en güçlü antijen sunan hücreler olan dendritik hücrelerde CD80 ve CD86'nın susturulmasıdır. Tez çalışmamızda makrofaj hücreleri kullanıldığımız için aşağıda makrofajlar hakkında bilgi verilmektedir.

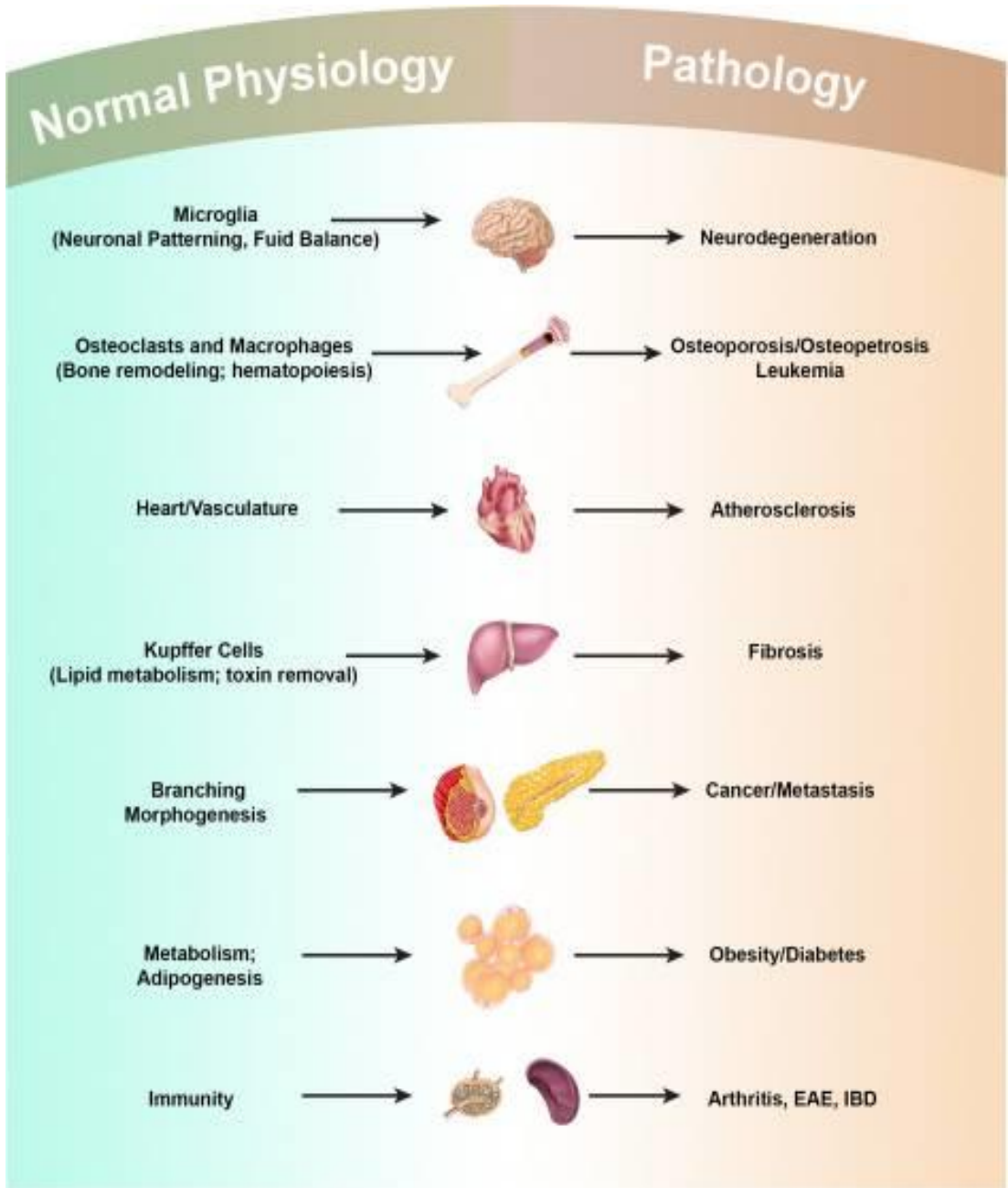
### 2.2.2. Makrofajlar

Makrofajlar, periferik kandaki kemik iliği öncülerinden ve ana monositlerden türetilmiş profesyonel fagositik hücre fenotiplerinden biridir (Verschoor ve ark., 2012). Tüm dokularda bulunur ve mükemmel fonksiyonel çeşitlilik gösterirler.

Makrofajlar, bir organizmanın biyolojisinin hemen hemen tüm yönlerinde gelişimden homeostaza, onarımdan patojene karşı immün yanıtlara kadar birçok önemli olayda rol oynarlar. Malesef bazen, bu homeostatik ve onarıcı işlevlerde bozukluklar görülebilir; bu da makrofajların fibrozis, obezite ve kanser gibi hastalık durumlarını tetiklemesine neden olur (Wynn ve ark., 2013).

Makrofajlar, bağışıklık tepkilerinde de önemli bir rol oynar. Makrofajlar antijen sunan hücreler olmaları sebebiyle lenfosit aktivasyonunda da oldukça etkilidirler. Ayrıca salgıladıkları birtakım sitokinlerle lenfositlerin proliferasyonunu da düzenlerler (Elhelu, 1983).

Makrofajlar Şekil 2’de de görüldüğü gibi buldukları dokulara göre farklı isimlerde karşımıza çıkarlar. Merkezi sinir sistemine yerleşen makrofajlar mikrogial hücre, karaciğerin vasküler sinüzoidlerine yapışarak karaciğere yerleşen makrofajlar Kupffer hücreleri adını alırken, akciğere yerleşen makrofajlar alveolar makrofajlar, kemiklere yerleşenler osteoklast, deriye yerleşenler ise Langerhans hücreleri adını alır. Bu hücreler görevlerini yerine getiremediğinde birçok hastalığa ortam hazırlanmış olur (Wynn ve ark., 2013).



**Şekil 2.** Makrofajların fizyolojisi ve patolojisi. Makrofajlar, beyinden kemiğe ve kalbe kadar değişen dokuların mimarisini şekillendiren birçok gelişimsel rol oynar. Gelişimleri tamamlandıktan sonra makrofajlar metabolizma ve sinirsel bağlanma dahil çeşitli aktiviteleri düzenleyerek ve hasarı tespit ederek homeostazi ve normal fizyolojiyi düzenler. Ayrıca immün yanıtın oluşmasında lenfosit aktivasyonu ve proliferasyonunu sağlayarak oldukça önemli görevler üstlenir. Bununla birlikte, bu işlevlerini yerine getiremediğinde veya işlev bozukluğu gösterdiğinde ise birçok hastalığın gelişmesine sebep olabilir. (Wynn ve ark., 2013)

### 2.2.2.1. İmmün Sistemde Makrofajlar

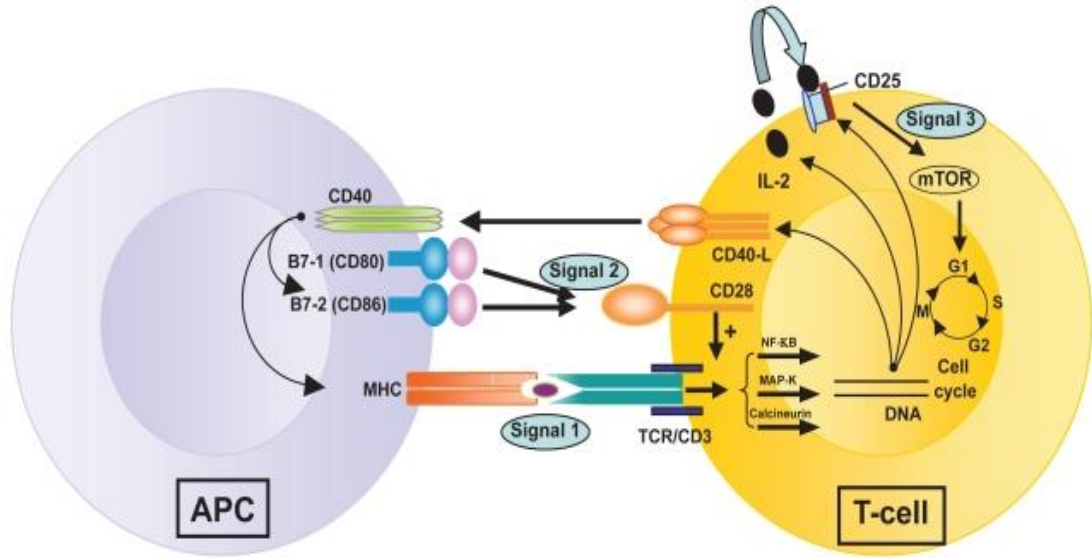
Makrofajlar mikroplara karşı hem doğal bağışıklığın bir elemanı gibi tepki gösterir hem de mikroplar için özgül olan edinsel bağışıklık elemanları olan lenfositlerin yanıtlarını tetikler. Bu nedenle makrofajlar edinsel bağışıklığı düzenleyen doğal bağışıklığa ait hücreler olarak bilinir (Hekim ve Alkan, 2017).

Makrofajların 3 ana işlevi vardır: fagositoz, antijen sunumu ve sitokin üretimi (Levinson, 2010). Bu işlevleri ile doğal bağışıklık ve edinsel bağışıklıkta önemli rollerde görev alır. Makrofajların doğal bağışıklıktaki işlevleri birkaç madde halinde özetlenebilir:

- 1) Makrofajlar taşıdıkları reseptörlerle yabancı maddeleri, hasar görmüş, yaşlanmış ya da apoptozla ölmüş hücre artıklarını tanır ve bu hücreleri fagosite ederek parçalar. Makrofajlar doğaldır ki her hücreyi fagosite edip öldüremezler (Hekim ve Alkan, 2017). Yüzey özellikleri değişmiş, özellikle antikor ya da kompleman fragmanları (C3b) ile kaplanmış yani opsonize olmuş mikropları yüzeylerinde taşıdıkları reseptörlerle tanıyıp fagozom yardımıyla hücre içine alırlar. Sonrasında bu fagozom bir lizozomla kaynaşır ve mikrop reaktif oksijen, reaktif azot bileşikleri ve lizozomal enzimler tarafından öldürülür (Levinson, 2010).
- 2) Makrofajlar lipopolisakkaritler gibi, patojenlere ait moleküllerle temas edince uyarılır ve bir yandan yüzeylerinde eş uyarıcılar adı verilen CD80 ve CD86 gibi molekülleri üretir. Üretilen eş uyarıcı molekülleri T hücrelerinin aktive edilmesini sağlayan en önemli moleküllerden biridir (Hekim ve Alkan, 2017). Aynı zamanda makrofajlar, en önemlileri IL-1 ve TNF olan birkaç sitokin (makrokinler, monokinler) üretir. IL-1 yardımcı T hücrelerinin aktivasyonunda rol oynar ve TNF önemli bir enflamatuvar mediatördür. Makrofajlar, nötrofilleri ve T hücrelerini enfeksiyon bölgesine çeken önemli bir kemokin olan IL-8'i de üretir (Levinson, 2010).

Makrofajların edinsel bağışıkadaki işlevleri de şöyle özetlenebilir:

- 1) Makrofajlarda hücre içerisine alınan yabancı antijenler, küçük peptit parçalarına ayrılıp, antijene özgül T lenfositleri tarafından tanınabilecek bir şekilde MHC moleküllerine bağlanarak hücre yüzeyinde sergilenir. Bu sayede hücre üzerinde MHC moleküllerince sunulan peptidler, bu peptidlere özgü spesifik T hücreleri tarafından tanınır ve bu tanınma, T hücrelerinin aktifleşme sürecini başlatır. Makrofajlar ayrıca, T lenfositlerinin proliferasyonu ve farklılaşmasına katkıda bulunan sitokinleride salgılar. Bunlardan biri hücrel bağışıklığın oluşumunda önemli rol oynayan IL-12'dir. Ayrıca aktive olan makrofajlar yukarıda da değinildiği gibi, enflamasyon bölgesinde T hücre yanıtını arttıran ve kostimülator denilen yüzey proteinlerini üretir ve bunları yüzeylerinde sergileyerek lenfosit aktivasyonunda rol oynarlar.



**Şekil 3.** T hücrelerine antijen sunumu. Temelde 3 sinyal üzerinden T hücre aktivasyonu gerçekleşir. İlk sinyalde antijen sunan hücreler üzerinde MHC tarafından sunulan antijen T hücreleri tarafından tanınır. Burada hem sunulan antijen hemde MHC molekülüyle bir bağlanma gerçekleşir. Sonrasında eş uyaran molekülleri olan CD80 ve CD86 T hücre üzerinde bulunan CD28 molekülüne bağlanırlar ve böylece 2. sinyali başlatmış olurlar. 1. ve 2. sinyallerin hücre içerisine ilettiği sinyaller sonucunda IL-2 üretimi gerçekleşir ve CD40-L ekspresyonu indüklenir. T hücre üzerinde bulunan CD40L antijen sunan hücreler üzerinde CD40'a bağlanıp, eş uyaran ve MHC molekülü ekspresyonunu indükler. T hücrede üretilen IL-2 de yine T hücre üzerinde bulunan reseptörüne bağlanarak T hücre bölünmesini başlatır. Böylece, T hücre uyarımı ve proliferasyonu gerçekleşmiş olur (Yale University).

- 2) Gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonun etkili olduğu evrede antijen tarafından uyarılan T lenfositleri, makrofajları aktive eden sitokinleri, örneğin IFN- $\gamma$ 'yı salgılar. Uyarılan makrofajlar uyarılmamışlara oranla mikropları daha iyi parçalarlar. Bu yol ile makrofajlar hücresel bağışıklığın etkinliğine katkıda bulunur.
- 3) Hümmoral bağışıklığın etkili olması için yabancı antijenler, örneğin mikroplar, yukarıda da bahsedildiği gibi komplemana ait bileşenler ve antikor molekülleri ile kaplanır yani opsonize olurlar. Makrofajlar yüzeylerinde antikorlar için Fc ve C3b gibi kompleman komponentlerine ait bileşenler için özel reseptörler taşır. Bu reseptörler, opsonize olmuş bu bakteri ya da parazitleri opsonize olmayanlara oranla daha kuvvetle bağlar ve daha öncede bahsedildiği gibi onları fagosite edip yok eder. Böylece de humoral bağışıklığın yabancı antijenleri yok etme çabasına katkıda bulunur (Hekim ve Alkan, 2017)

#### **2.2.2.2. Makrofajların Aktivasyonu**

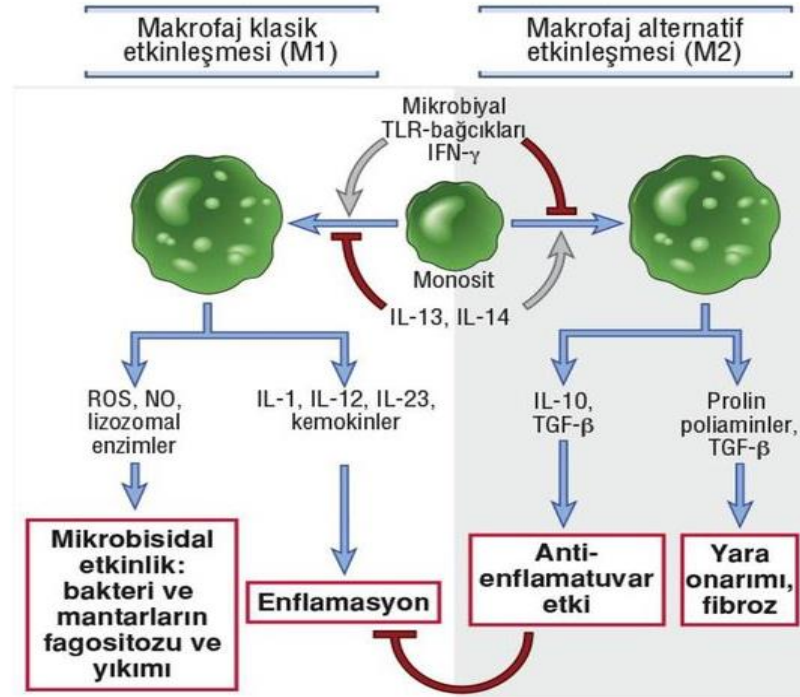
Mikroorganizmalar ve yıkıma uğrayan hücreler, TLR'ler ve NLR'ler gibi örgü tanıyan reseptörlere (Pattern Recognition Receptors; PRR) bağlanarak işlevlerini yerine getirmesi için makrofajları etkin kılarlar. Makrofajların fagositik işlevleri, mannoz reseptörleri ve doğrudan mikroorganizmalara bağlanan çöpçü (scavenger) reseptörler gibi yüzey reseptörleri ve kompleman aktivasyon ürünleri ya da mikroorganizmaları kaplayan antikorlar için olan reseptörler aracılığı ile sağlanır. Kompleman ve antikor reseptörleri, ayrıca hücre içine alınmış mikroorganizmaların öldürülmeleri için gerekli sinyal uyarısında da rol oynarlar.

Makrofajlar farklı işlevlerin gerçekleşmesi için iki ayrı yoldan etkin kılınırlar: Klasik ve alternatif yolak.

1. Klasik makrofaj etkinleşmesi, TLR'ler üzerinden doğal ve edinsel bağışıklık yanıtlarında üretilen IFN- $\gamma$  gibi bir sitokinin uyarısı ile tetiklenir. Klasik yoldan etkinleşen makrofajlar (M1), mikroorganizmaları parçalayıp enflamasyonu tetiklerler.

2. Alternatif makrofaj etkinleşmesi ise güçlü TLR uyarılarının olmadığı koşullarda, IL-4 ve IL-13 gibi sitokinlerin uyarısı ile ortaya çıkar, M2 adı verilen bu makrofajlar enflamasyonun denetlenmesinde ve doku onarımında daha etkilidir.

Bu iki tip makrofajların bir denge içerisinde olması gerekir. Bu iki makrofaj grubunun arasında ciddi farklılıkların olması, konak immün yanıtında bozukluklara ve önemli rahatsızlıklara sebep olabilir (Abbas ve ark., 2014).



Şekil 4. Makrofaj etkinleşmesi. Klasik yoldan etkinleşen makrofajlar (M1), TLR'lere bağlanan mikroorganizma ürünleri ve sitokinler, özellikle IFN-γ ile tetiklenir ve mikrosibidal ve proenflamatuvar özelliktedir. Alternatif makrofaj aktivasyonu (M2), IL-4 ve IL-13 tarafından uyarılır ve doku onarımı ve fibrozisde önemlidir (Abbas ve ark., 2014).



## 2.3. Tolerans ve Otoimmünite

### 2.3.1. İmmünolojik Tolerans

İmmünolojik tolerans terimi ilk olarak Ray Owen tarafından 1945 yılında ortaya atılmıştır (Owen, 1945). İmmünolojik tolerans, antijen ile karşılaşan lenfositlerin yanıt vermemesi durumudur.

Bir antijene özgül reseptörü olan lenfosit, o antijenle karşılaştığında, birtakım olasılıklardan herhangi biri gelişebilir:

1. Lenfositler aktive olup çoğalabilirler, etkin ve bellek hücrelere farklılaşabilirler, etkili immün yanıt gelişir; bu tür yanıtı açan antijen immünojenik olarak tanımlanır.
2. Lenfositler işlevsel olarak etkisiz kılınır veya öldürülürler ve sonuçta o antijene tolerans gelişir; bu tip yanıtı açan antijen tolerojenik olarak tanımlanır.
3. Bazı durumlarda antijene özgül lenfositler hiçbir şekilde yanıt vermezler antijeni yok sayarlar, bu durum immünolojik görmezden gelme olarak tanımlanır. Normal koşullarda patojen mikroorganizmalar immünojenik, kendi antijenlerimiz ise tolerojeniktir ya da yok sayılırlar (Abbas ve ark., 2014).

Akciğer ve sindirim sistemi mukozal yüzeylerinde pek çok zararsız hava ve gıda kaynaklı antijenlere karşı enflamatuvar yanıtları önlemek için, aktif tolerans mekanizmalarına gerek vardır. Bununla birlikte, toleransın en önemli özelliği, vücudun kendi dokularına karşı bir saldırı geliştirmesini engelleyen self toleranstır (Male ve ark., 2008). Santral lenfoid organlarda lenfosit gelişimi sırasında gerçekleşen gen düzenlemeleri, kaçınılmaz olarak kendi antijenlerine karşı afiniteye sahip bazı lenfositlerin oluşmasına da neden olur. Bu tür lenfositler normal olarak repertuvarından çıkarılır veya çeşitli mekanizmalar tarafından kontrol altında tutulur (Murphy ve Weaver, 2016).

Öz antijenler, bireyin DNA'sı tarafından kodlanan tüm epitoplara içine alır ve diğer tüm epitoplara öz olmayan antijen olarak nitelendirilir.

Buna rağmen, molekülün self veya non-self şeklinde ayrılmasını belirleyen şey, molekülün yapısı değildir. Epitopun yapısal özellikleri dışında;

- lenfositlerin, epitoplarıyla ilk karşılaştıklarındaki farklılaşma safhası
- karşılaşılan bölge
- epitopları sunan hücrelerin özelliği
- epitoplara yanıt veren lenfositlerin sayısı

gibi faktörlerde önemlidir (Male ve ark., 2008).

İmmün tolerans, üretken (primer) lenfoid organlarda henüz gelişmekte olan lenfositlerin bu antijenlerle tanışması ile merkezi organlarda lenfositler oluşurken sağlanabileceği gibi (merkezi-santral tolerans), olgun lenfositlerin periferik organlarda öz antijenlerle karşılaşmasının sonucu da oluşturabilmektedir (periferik tolerans).

Merkezi tolerans, sadece kemik iliği ve timus gibi primer lenfoid organlarda bulunan, öz antijenlere karşı olan tolerans düzeneğidir. Bu organlarda bulunmayan öz antijenler için tolerans, periferik düzeneklerle sağlanmalı ve sürdürülmelidir (Abbas ve ark., 2014).

Oto reaktif lenfosit için, bu tolerans mekanizmalarından hangisinin geçerli olduğu;

- reseptörün self antijene afinitesi
- bu antijenin yapısı
- antijenin konsantrasyonu
- doku dağılımı
- ifadenme biçimi

gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Male ve ark., 2008).

### 2.3.1.1. Merkezi Tolerans

Lenfositler, merkezi lenfoid organlar olan timus ve kemik iliğinde antijenlerle reaksiyona girmeyi öğrenirler. Bu lenfositlerin antijen reseptörlerini kodlayan genlerin rastgele yeniden düzenlemeleri sırasında, lenfositler, organizmanın kendi dokularına ait moleküllerinden gelen antijenik sinyallere de maruz kalır. Düşük afinite ile bu kendi doku antijenlerine bağlanan lenfositler immün repertuvarlar için uygunken, bu antijenlere yüksek afinite gösteren otoreaktif lenfositler elimine edilir yada etkisiz hale getirilir (Stockinger, 1999).

Otoreaktif lenfositlerin öldürülmesi (negatif seleksiyon), kalıcı olarak etkisiz hale getirilmeleri ya da antijen reseptör genlerinin yeniden düzeltilmesi (editing), onların henüz dolaşıma katılmadığı bir sırada, yani timus ya da kemik iliği gibi merkezi lenfoid organlarda iken gerçekleşir. Zaten bu nedenle bu sürece merkezi tolerans denir. Bu süreç B ve T hücreleri için farklı şekilde işler (Hekim ve Alkan, 2017).

### Merkezi T hücre Toleransı

T lenfositleri henüz timustan dışarı çıkmadan organizmanın kendi molekülleriyle karşılaşır. Çünkü göz, testis ve beyin gibi birkaç organın dışında, hemen hemen tüm organlara ait protein ve peptid parçaları timusun orta kısmında bulunan epitel hücrelerinin yüzeyinde sergilenirler. Bunu sağlayan güçlü bir transkripsiyon aktivatörü olan otoimmün düzenleyici (Autoimmune regulator; AIRE) proteindir. Bu protein, tüm doku antijenlerini kodlayan genlerin, timus epitel hücrelerinde aktifleşmesini sağlar. Böylelikle olgunlaşmakta olan T hücreleri henüz yerini terk etmeden organizmanın kendi dokularına ait moleküllerle karşılaşmış olur. Böylece otoreaktif özellikte olan lenfositler henüz dışarı çıkmadan kendilerini timusta ele verir (Hekim ve Alkan, 2017). Devreye giren merkezi tolerans ise 2 şekilde sonuçlanır: T hücrelerinin ölümü ya da CD4<sup>+</sup> düzenleyici T hücrelerinin oluşumu.

Olgunlaşmamış lenfositler MHC'ye bağlı olarak sunulan öz antijenleri ile kuvvetle etkileşime girerse bu lenfositler apoptozu tetikleyen sinyal alır ve olgunlaşmasını tamamlayamadan ölür. Bu işlem negatif seçim olarak tanımlanmaktadır ve bu durum merkezi toleransın başlıca düzeneğini oluşturur.

Timusta, öz antijeni yüksek affinite ile tanıyan bazı olgunlaşmamış CD4<sup>+</sup> T hücreleri ise ölmezler fakat düzenleyici T hücrelerine dönüşerek periferik dokulara yerleşirler (Abbas ve ark., 2014).

### **2.3.1.2. Periferik Tolerans**

Merkezi lenfoid organlarda, bireyin kendi doku ve proteinleri ile etkileşime geçen self reaktif lenfositler, tamamen temizlenmeyebilir. Bu nedenle merkezi toleranstan kaçan bu lenfositler lenf bezleri, dalak, deri ve bağırsak mukozasına ait peyer plakları gibi ikincil lenfoid dokularda tekrar gözden geçirilir ve bu tolerans mekanizmasında periferik tolerans denir (Hekim ve Alkan, 2017).

#### **Periferik T hücre Toleransı**

Şüphesiz, pek çok potansiyel otoreaktif T hücresi, santral toleranstan kaçmaktadır. Bu durum, timusta, toleransı başlatmak için çok sayıda antijenin mevcut olmadığını veya var olsa da yetersiz seviyede bulunduğunu gösterir (Male ve ark., 2008). Periferik tolerans, olgun T hücresi öz antijenleri periferik dokularda tanındığında oluşur ve işlevsel yanıtızlık (anerji), apoptoz veya düzenleyici T hücreleri tarafından öze tepkili lenfositlerin baskılanmasıyla sonuçlanır (Abbas ve ark., 2014).

#### **Anerji**

Naif T hücrelerinin etkin hücre ve bellek hücrelere farklılaşım için en az iki sinyal gerekmektedir:

- İlk sinyal, uygun peptid-MHC kompleksinin T hücre reseptörü (THR) tarafından tanınmasıyla harekete geçer;
- İkinci sinyal, ASH'lerin ifade ettiği CD80 (B7.1) ve CD86 (B7.2) eş uyarıcı molekülleri ile oluşur (Male ve ark., 2008).

Enfeksiyon olmadığı zamanlarda dendritik hücreler dinlenme halindedir ve eş uyaran moleküllerini düşük miktarlarda eksprese ederler. Aynı zamanda dendritik hücreler sıklıkla dokulardaki öz antijenleri sunarlar. Bu öz antijenlere karşı reseptör içeren T lenfositleri bu antijenleri tanıyabilirler ancak beraberinde T hücreleri dendritik hücrelerinden güçlü eş uyaran sinyali almazlar çünkü eşlik eden doğal immün yanıt yoktur.

Böyle bir durumda yani T hücrelerinin aktifleşmesi için gereken eş uyaranlar yetersiz olduğunda T lenfositleri antijenleri tanır ise, T lenfositleri uzun ömürlü işlevsel etkisizlik haline (anerji) geçerler. Anerjik hücreler yaşamlarını sürdürürler ancak antijene yanıt vermezler (Abbas ve ark., 2014).

### 2.3.2. Otoimmünite

İmmün sistemin kritik işlevi, kendini ayırt ederek, sadece mikroplara yanıt vermektir. Öz antijenlere karşı tolerans, oldukça düzenli bir süreçtir ve bunu sürdürmek için bağışıklık sistemi, kendiliğinden gelişen self reaktif lenfositleri geliştikçe ayırt edebilmelidir (Lleo ve ark., 2010). Otoimmünitenin altında yatan temel mekanizma, kendiliğinden gelişen self reaktif lenfositlerin kusurlu eliminasyonu veya kontrolüdür (Rosenblum ve ark., 2015). İnsanlarda yapılan çalışmalar ve deneysel hayvan modelleri, otoimmüniteye katkıda bulunan genetik ve çevresel faktörleri ortaya koymaktadır (Rosenblum ve ark., 2015). Ancak yapılan son çalışmalar, otoimmün hastalıkların gelişimi üzerindeki genetik faktörlerin aksine, çevresel faktörlerin daha güçlü bir etkisi olduğunu göstermektedir.

Otoimmün hastalıkların görülme sıklığı ve prevalansında ciddi bir artış vardır. Bunlar arasında, multiple skleroz (MS) ve myastenia gravis gibi nörolojik otoimmün hastalıklarda yılda % 3,7 oranında; romatizmal otoimmün hastalıklarda % 7,1; endokrinolojik otoimmün hastalıklarda % 6,3 ve gastrointestinal otoimmün hastalıklarda ise yılda % 6,2 oranında bir artış olduğu görülmüştür (Lerner ve ark., 2016).

Otoimmün hastalıklar, kronik yapıları, ilgili sağlık hizmetleri maliyetleri ve genç nüfuslardaki sıklığı sebebiyle önemli bir klinik problemdir (Rosenblum ve ark., 2015). Tip 1 diyabet Avrupa ve Kuzey Amerika'da hızla artmaktadır ve rahatsız edici şekilde en fazla artış oranı 0-4 yaş grubundadır (Patterson ve ark., 2009). Öyleki otoimmün tip 1 diyabet, çocuklarda görülen kronik hastalıklar arasında en yaygın olanıdır (Mackay, 2001). Otoimmün hastalıklar, sistem, organ veya doku tipine bağlı olarak yaklaşık 80 farklı tipte sınıflandırılır. Batı nüfusunun yaklaşık % 5'i bu anomaliden etkilenir, ancak dünya çapında görülme sıklığı bilinmemektedir.

Otoimmün hastalıklar doğada heterojendir ve klinik belirtileri tehlike yaratmayan anomalilerden hayatı tehdit edici koşullara kadar değişir (Laxminarayana, 2017). Otoimmün hastalıkların teşhisi de, genelde zordur, çünkü hastalık başlangıçta gizli olabilir ve başlangıç semptomları genellikle spesifik olmayıp yorgunluk, halsizlik veya ateş gibi birçok hastalıkta görülen klasik semptomları gösterir (Mackay, 2001).

Otoimmün hastalıkların gösterdiği etki de değişkendir, etkiledikleri organlarda ve klinik belirtilerinde, bazıları belirli dokularla sınırlı, bazıları ise sistemik veya yayılmış olarak büyük ölçüde değişir (Rosenblum ve ark., 2015).

Sitokin antagonistleri gibi mevcut tedaviler, bu hastalıkların çoğunun tedavisinde büyük umut vermiştir. TNF- $\alpha$  antagonistleri, romatoid artrit seyrini değiştirmiştir ve diğer sitokin antagonistleri, diğer çeşitli hastalıklarda etkileyici etkinlik göstermektedir (Kim ve Solomon, 2010).

Bununla birlikte, mevcut terapötik ajanların çoğu hastalığı hafifletmek üzerinedir, hastalığın başlatılmasından ve ilerlemesinden sorumlu olan temel problemleri ele almamaktadır. Çoğu durumda, bu, devam eden ve bazen de yaşam boyu süren tedaviyi gerekli kılarak, malignite enfeksiyon hastalıklarının gelişmesinde yatkınlığa sebep olur. Bu hastalıkları kaynağında ele almak, anormal immün reaksiyonların nasıl ortaya çıktığını, nasıl sürdürdüklerini ve sağlıklı bireylerde bu tepkileri bastırmak için kullanılan içsel mekanizmaları anlamayı gerektirir (Rosenblum ve ark., 2015).

#### **2.4. Potansiyel Tolerans İndükleyici Stratejiler**

Otoimmün hastalıklar, sadece yaşam kalitesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olmayan, aynı zamanda potansiyel olarak yaşamı tehdit eden yaygın kronik bozukluklardır (Hirsch ve Ponda, 2015). Günümüzde, otoimmün hastalıkların kontrol ve tedavisi temelde, spesifik olmayan immünosüpresif ilaçlarla yapılmaktadır (Wraith, 2017). Yaygın olarak tercih edilen tedavi yöntemleri klinik yararlar sağlarken, ciddi yan etkilere de sebep olduğu gözlenmiştir (Hirsch ve Ponda, 2015).

Romatoid artrit, sistemik lupus eritematoz ve multipl skleroz için mevcut tedavi seçeneklerine fizik tedavi, kortikosteroidler, anti-enflamatuvar ilaçlar, anti-sitokin tedavileri, monoklonal antikolar, T hücresi fonksiyonunun biyolojik inhibitörleri ve B hücresi inhibisyonu örnek verilebilir. Bu tedaviler, milyonlarca hastaya fayda sağlarken bazı önemli dezavantajları da olabilir (Hirsch ve Ponda, 2015).

Günümüzde otoimmün hastalıkların tedavisinde hedeflenen, spesifik otoimmün hastalığın, selektif olarak baskılanması ve bağışıklık sisteminin geri kalanının bulaşıcı hastalıkların ve kanserin kontrolü için fonksiyonel olarak aktif kalmasının bir yolunu keşfetmektir. Amaç, potansiyel yan etki riskini azaltmak için hastalığa özgüllüğü artıran tedaviler geliştirmektir (Wraith, 2017).

Potansiyel Tolerans indükleyici stratejiler temelde dendritik hücreler üzerinden geliştirilir. Bu stratejilerden biri tolerojenik dendritik hücrelerdir. Bu hücrelerin kullanımı ve nakli otoimmün hastalıklar için umut verici bir terapötik stratejidir.

Geniş kapsamlı güçlü immün sistemi uyarıcı ve düzenleyici fonksiyonları, dendritik hücreleri günümüz immünoterapilerin merkezine yerleştirmiştir (Naranjo-Gómez ve ark., 2011). Dendritik hücreler, immün yanıtın indüksiyon fazında oldukça önemlidir ve bu nedenle bir antijene karşı yanıtın enflamasyon mu yoksa tolerans mı olacağının belirlenmesinde kritik öneme sahiptir (Hirsch ve Ponda, 2015).

Bu stratejide IL-10, deksametazon (Dexa), rapamisin (Rapa) ve vitamin D3 (VitD3) gibi çeşitli farmakolojik ajanlarla dendritik hücrelerin tolerojenik özelliklerini geliştirilip stabilize ederek dendritik hücrelerin tolerojenik aktiviteleri teşvik edebilir. Böylece tolerojenik dendritik hücrelerin, klonal T hücresi tükenmesi, anerji, T yardımcı hücre (T helper; Th) farklılaşması veya Treglerin üretilmesi dahil olmak üzere çeşitli yollarla immün toleransı indüklemesi sağlanır (Naranjo-Gómez ve ark., 2011).

Otoimmüniteye karşı geliştirilmek istenen diğer bir strateji de, CD80/86'nın ekspresyonunu önlemek için dendritik hücreleri ve diğer ASH'leri genetik olarak değiştirmektir (Tan ve ark., 2005). Dendritik hücrelerin yüzey moleküllerinden CD80 ve CD86 eş uyaran molekülleri, T hücresi aktivasyonunda ve hayatta kalmasında rol oynayan iki temel ortak uyarıcı faktördür (Sharpe ve Freeman, 2002).

Dendritik hücrelerinin, eş uyaran sinyali olmadan antijenleri sunması durumunda T hücre anerjisi oluşabilir (Hirsch ve Ponda, 2015).

Bu tez çalışmasında da profesyonel antijen sunan hücrelerden biri olan makrofajlarda, eş uyaran molekülleri CD80 ve CD86 genleri susturulup, T hücrelerinde anerjinin tetiklenerek otoimmün hastalıklara karşı tolerans geliştirilmesi amaçlanmıştır. Aynı stratejinin transplantasyon toleransını sağlamak amacıyla kullanılabilme potansiyeli de söz konusudur.

## **2.5. Yeni Nesil Genom Düzenleme Teknikleri**

Bir organizmanın fenotipi üzerindeki etkisini belirlemek için bir geni nakavt etmek yada ekspresyon seviyelerini değiştirmek moleküler biyolojide vazgeçilmez bir araçtır. Bu teknikler, bir gen ürününün organizmaların gelişimine ve hücre sel kimliğine nasıl katkıda bulunduğunu anlamak için kritik öneme sahiptir. Genom düzenleme teknolojilerindeki son gelişmelerle birlikte genomik dizilim teknolojilerinin patlaması, bu deneylerin daha önce kolayca erişilemediği veya mümkün olmadığı birçok organizmada genetik manipülasyon olasılığını arttırmıştır. (Thurtle-Schmidt ve Lo, 2018).

Genom düzenleme, genomik DNA'yı değiştirme ve genetik bilgiyi yapay olarak değiştirerek, fonksiyon kazanımı (gen knockin, gen mutasyonu, gen etiketleme ve gen aktivasyonu) ve fonksiyon kaybını (gen knockout ve gen mutasyonu) baz alarak yapılır (Sánchez-Rivera ve Jacks, 2015). Genom düzenleme teknolojileri, bilim insanlarının DNA çift zincir kırıklarının (Double-strand break; DSB), esas olarak Homoloji yönlendirmeli tamir (homology directed repair; HDR) ve Homolog olmayan uç birleştirme mekanizması (nonhomologous end-joining; NHEJ) yoluyla, endojen DNA tamir mekanizmalarını uyardığını keşfetmeleri üzerine geliştirilmiştir (Takata ve ark., 1998).

HDR, DSB'lerin olduğu bölgede çalışır. Bu mekanizma genetik bilgiyi korur çünkü homolog DNA, onarımda şablon olarak kullanılır. Homolog DNA yoksa NHEJ, DSB'leri onarmak için çalışır.



Bu tamir mekanizmasında onarım için baz alınacak bir homolog DNA olmadığından, NHEJ kolayca genetik bilgiyi kaybeder ve hasar gören bölgelere ekleme veya silme işlemi yapar (Maeder ve Gersbach, 2016). Böylece DNA üzerinde gen değişikliği yapmak için bu onarım mekanizmaları tetiklenir.

Günümüzde, genom düzenlemede üç nükleaz yaygın olarak kullanılmaktadır: çinko parmak nükleaz (Zinc finger nucleases; ZFN), transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleaz (Transcription activator like effector nuclease; TALEN) ve CRISPR. CRISPR sistemi, memeli genomunda gen düzenlemede diğer tekniklere oranla oldukça güçlü bir araç olarak yer alıyor (Chen ve ark., 2016). Şekil 5’de bu üç yöntem kıyaslaması yapılmıştır.

	Time first introduced into mammalian(year)	DNA recognition pattern	DNA modification pattern	Validation time	Relative efficiency*	Relative specificity*	Clinical development
ZFN	2000	Zinc finger protein	FokI nuclease fused with ZFs	8 weeks	++	+	Phase 1/2
TALEN	2011	TAL protein	FokI nuclease fused with TALENs	8 weeks	++	+++	Phase 1
CRISPR-Cas9	2013	Single strand guide RNA	Cas9 nuclease	2-4 weeks	+++	++++	Preclinical

Şekil 5. Yeni nesil genom düzenleme tekniklerinin karşılaştırılması. Şekilde yapılan kıyaslamada da görüldüğü gibi çalışma süresi, spesifite ve verimlilik açısından CRISPR diğer iki yöntemle kıyasla daha avantajlıdır (Chen ve ark., 2016).

CRISPR tabanlı teknolojiler yıllar içinde gelişip günümüzde, daha önce tedavi edilemez olarak kabul edilen birçok insan genetik hastalıkları için terapötik bir platform olarak umut vermiş, yüksek kalitede gen düzenlemeye esnek bir yaklaşım sağlamıştır (Luther ve ark., 2018). Bu sistem, bu alanda geliştirilen önceki gen düzenleme yöntemlerine kıyasla birçok avantaja sahiptir. Önceki sistemlere kıyasla, CRISPR, hücre içi mekanizmalara müdahale etmeden bir geni devre dışı bırakabilir veya ortadan kaldırabilir.

Sistem, hastalıkların tedavisinde ve bu hastalıklarda kusurlu genlerin performansının belirlenmesi ile ilgili araştırmalarda da kullanılabilir. CRISPR ayrıca önceki sistemlere göre daha fazla potansiyele ve uygulama alanına sahiptir. Bu uygulamalara CRISPR'in kanser gibi genetik ve epigenetik hastalıkları anlamadaki kullanımını örnek verilebilir (Mahmoudian-sani ve ark., 2018).

Bu tez çalışmasında CRISPR/Cas gen düzenleme sistemi kullanıldığından konuya bu sistemin anlatılması üzerinden devam edilecektir.

### 2.5.1. CRISPR/Cas Sistemi

1980'lerin sonlarında, *E. coli* genomunda alışılmadık şekilde aralıklı, homolog sekans yapıları fark edildi (Kick ve ark., 2017). Benzer şekildeki aralıklı homolog sekanslar 1993 yılında *Haloferax mediterranei* türü archaea'da da gözlemlendi. Zaman içerisinde bu sekansların sadece bakterilerde değil arkea'lar da görüldüğü anlaşıldı (Ishino ve ark., 2018). 2002 yılında, diğer prokaryotlarda benzer genomik yapıların keşfedilmesi ve bu dizilerin ortak özelliklerinin tanımlanmasının ardından bu sekanslar düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrar kümeleri (CRISPR) olarak adlandırıldılar (Kick ve ark., 2017).

CRISPR bölgelerinin detaylı analizleri bu dizilerin yakınında bulunan Cas (CRISPR associated) adı verilen genlerle ilişkili olduğunu gösterdi. Yapılan analizlerde Cas genlerinin helikaz gen ailelerine benzerlik gösterdiği görüldü. Ve Cas genlerinin aslında DNA onarımı ve rekombinasyonu, transkripsiyonel düzenleme ve kromozom ayrımı dahil olmak üzere DNA metabolizmasında yer aldığı tahmin edildi (Ishino ve ark., 2018).

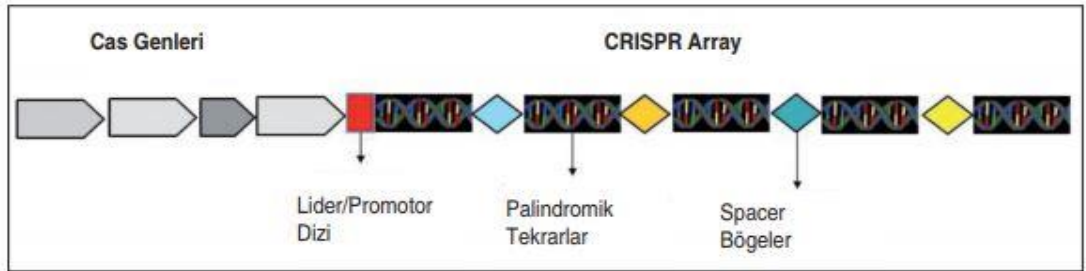
2006 yılında CRISPR'den türetilen bağışıklığın RNA aracılığıyla yürütülebileceği bildirildi, 2007 yılında ise cas genlerinin, spacer bölgelerinde sorumlu olan bölge olduğu keşfedildi (Chen ve ark., 2016). Zaman içerisinde CRISPR dizilerinin esas olarak farklı bakteriyofajlara ait sekanslar içerdiği ve bunların kazanılmış bir bakteri bağışıklık sisteminin bir parçası olduğu bulundu (Kick ve ark., 2017).

2007 yılında yapılan bir çalışmada Faj dizisinin, *Streptococcus thermophilus*'un CRISPR dizisindeki spacer bölgesine eklenmesi bu suşu, karşılık gelen faja karşı dirençli kıldığı, öte yandan, faj enfeksiyonuna karşı bu bakteriyel direncin, karşılık gelen protospacer sekansı faj genomundan silindiğinde ise kaybolduğu görülmüştür. Böylece CRISPR-Cas sisteminin prokaryotik kazanılmış bir bağışıklık sistemi olarak işlevi, laktik asit bakterisi *S. thermophilus*'da deneysel olarak kanıtlanmış oldu (Barrangou ve ark., 2007).

CRISPR bölgelerinde bulunan, tekrarlayan kısa DNA dizileri palindromiktir. Uzunlukları 21-48 baz çifti arasında değişen bu DNA dizileri 5'den 3'e ve 3'den 5'e, her iki yönde de aynı okunur. Bu kısa DNA dizilerinin arasında ise 26-72 baz çifti uzunluğunda spacer adı verilen DNA bölgeleri bulunur.

Bu özgün DNA dizileri, genellikle bir bakteriyofaj veya plazmitin nükleik asitlerine ait sekanslar içerir. Aynı zamanda CRISPR dizisinin başında bulunan lider dizi adı verilen korunmuş bölgelerde transkripsiyonun yönünün belirlenmesinde görev alır.

Sistemin 2. önemli parçası ise CRISPR dizisinin yakınında bulunan Cas genleridir. Cas proteinlerinin helikaz ve nükleaz özelliklerinin bulunması DNA dizilerini açma ve kesme işlemlerini gerçekleştirmesini sağlar. Böylece, Cas proteinleri nükleik asitlerle etkileşim kurarak nükleaz, helikaz veya RNA bağlanma proteini şeklinde aktivite gösterir (Bozok Çetintaş ve ark., 2017).



Şekil 6. CRISPR/Cas Sistemi (Bozok Çetintaş ve ark., 2017)

Bağışıklık yanıtın her bir aşamasında birbirinden farklı Cas proteinleri bulunur. CRISPR lokusunun sayısı, görev alan Cas proteinlerinin farklılığı göz önüne alınarak Tip I, Tip II ve Tip III CRISPR/Cas sistemleri tanımlanmıştır (Bozok Çetintaş ve ark., 2017). Tip II sadece bakterilerde bulunurken, Tip I ve Tip III CRISPR/Cas sistemi hem bakteri hem de arkea'larda bulunur. Yüksek verimi ve sadeliği nedeniyle *S. pyogenes*'deki tip II CRISPR/Cas sistemi günümüzde en çok tercih edilendir (Chen ve ark., 2016).

### 2.5.1.1. CRISPR/Cas9 Çalışma Mekanizması

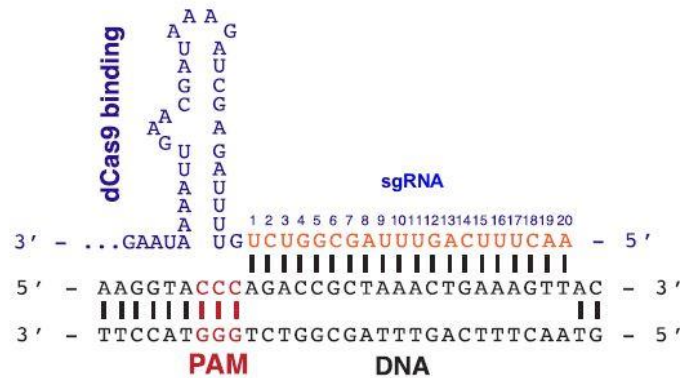
Modifiye edilmiş ve günümüzde araştırmalarda kullanılan CRISPR sistemi temelde 2 parçadan oluşur: Rehber RNA (single guide RNA; sgRNA) ve Cas9 nükleazı. Rehber RNA hedefi belirlerken, Cas9 nükleaz fonksiyonel işlemi gerçekleştirir.

Rehber RNA ise 2 alt üniteden oluşur;

- CRISPR RNA olarak da adlandırılan crRNA,
- tracrRNA olarak da adlandırılan trans aktifleştirici crRNA

Sistemin çalışması için gerekli olan bir başka bileşim ise proto-spacer ilişkili motif (Protospacer adjacent motif; PAM) dizisidir. Cas9'un hedef DNA'yı bağlaması için bir PAM dizisi kesinlikle gereklidir. PAM'lar, Cas9-sgRNA kompleksinin hedefe bağlanmasında ve nükleaz aktivasyonunda görevlidir. Ayrıca PAM, Cas9 için hedef DNA'yı kendi genomundan ayırt etmek için özel bir işarettir. PAM, *Streptococcus pyogenes* Cas9'u için bir NAG veya bir NGG nükleotididir. Bu PAM dizisi her Cas9 türü için aynı olmayıp, farklı Cas9 ortologları için farklı PAM dizileri bulunmaktadır.

Sistem harekete geçtiğinde Cas9-sgRNA kompleksi ilk önce PAM sekansını tanıır daha sonrasında ise rehber RNA, PAM sekansının bitişiğinde bulunan hedef nükleotitlerle eşleşir ve böylece Cas9'da hedef sekansların hemen yanındaki dsDNA'yı çözer ve kesimi başlatır. Buradaki eşleşme oldukça önemlidir çünkü sgRNA'nın, hedef DNA ile eşleşme derecesi Cas9'un hedefi kesip kesmeyeceğini belirler. Cas9 Hedef DNA'da kırıklar oluşturacak şekilde NHEJ veya HDR'yi tetikleyen DSB'ye neden olur ve böylece DNA üzerinde istenilen değişiklikler yapılabilir (Chen ve ark., 2016).



Şekil 7. Cas9-sgRNA kompleksinin hedef sekansla eşleşmesi (Qi ve ark., 2013)

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. LentiCRISPRv2 Vektörünün Hazırlanması

LentiCRISPRv2 (Addgene, USA) vektörüne (Şekil 8), CD80 ve CD86 genlerine özgü primerleri klonlayacağımız bölge protokolde (Addgene: lentiCRISPRv2 and lentiGuide oligo cloning protocol) geçen BsmBI (NEB) restriksiyon enzimi kullanılarak çıkartıldı.

Burada; 5 µg LentiCRISPRv2 plazmit, 3 µL BsmBI ( $10^4$ u/mL) (NEB, USA), 3 µL 10x 3.1 Tampon (NEB, USA), 5 µL DTT (10 Mm) (Sigma, Germany) mikrosantrifüj tüpüne konuldu ve son hacim 30 µL'ye ddH<sub>2</sub>O (Merek Millipore,USA) ile tamamlandı. Bu karışım 55°C de PCR cihazında (Eppendorf, Mastercycler, Germany) 2 saat inkübe edildi.

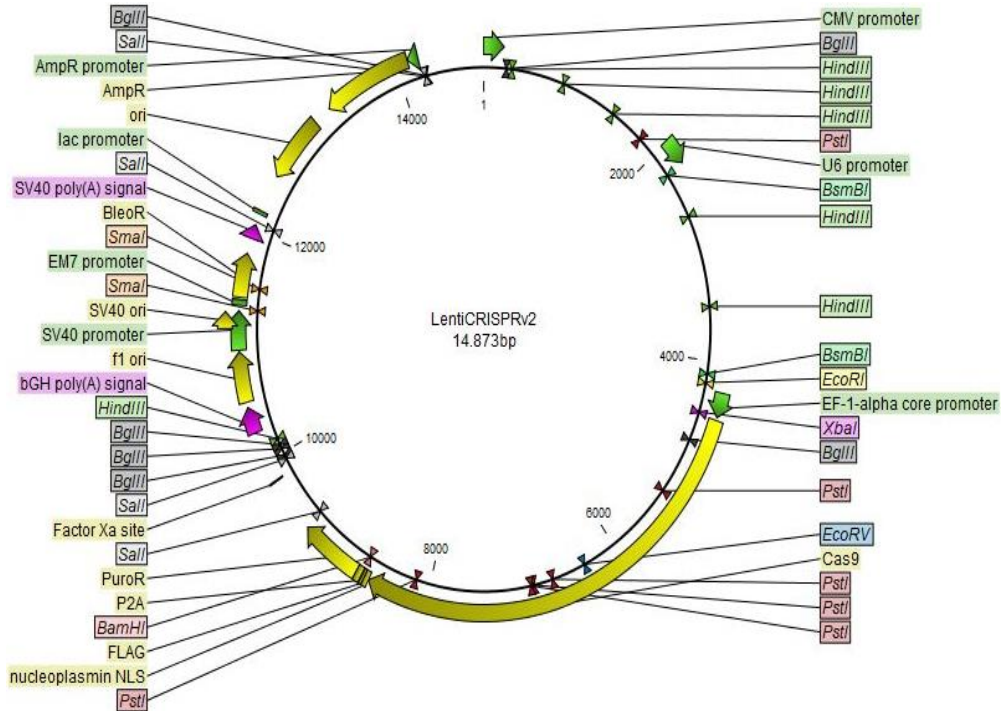
BsmBI kesiminden sonra vektörde açık kalan uçlardan fosfat gruplarını uzaklaştırmak, böylece vektörün kendi üzerine katlanmasını önlemek için; yukarıda bahsi geçen, BsmBI ile 2 saat inkübe edilen 30 µL'lik karışımın tamamı, 3 µL CAIP (Claf İntestinal Alkaline Phosphatase) enzimi (Fermantas, ThermoScientific, USA), 5 µL CIAP 10x Tamponu (Fermantas, ThermoScientific, USA) mikrosantrifüj tüpüne konuldu ve son hacim 50 µL'ye ddH<sub>2</sub>O (Merek Millipore, USA) ile tamamlandı ve karışım 37°C de PCR cihazında (Eppendorf, Mastercycler, Germany) 30 dakika inkübe edildi.

CIAP işleminden sonra vektör 1 saat boyunca 100 Voltta, %1 agaroz jelde (Sigma, Germany) yürütülerek BsmBI kesimi kontrol edildi. Jelde görünen 2 banttın, 12.5 kb uzunluğunda olan ve vektörü içeren bant kesilip PCR temizleme ve jel ekstraksiyon kiti (Macherey-Nagel Nükleospin Gel and PCR Clean-Up, Germany) kullanılarak jelden saflaştırıldı.

Jelden kesilen parçası tartılarak mikrosantrifüj tüpüne konulan jele, 100 mg jele 200 µL bağlayıcı tampon (NTI) olacak şekilde NTI solüsyonu eklendi. Sonrasında örnek 55°C de 10 dakika, jel tamamen çözünene kadar inkübe edildi.

İnkübasyondan sonra DNA'nın bağlanması için, örnekler Nükleospin Gel and PCR Clean-Up kolonuna yüklenmiş ve 11 000 g'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi (Eppendorf, 5415D, Germany). Sonrasında yıkama amacıyla 700 µL NT3 tamponu Nükleospin Gel and PCR Clean-Up kolonuna eklenip tekrardan 11 000 g'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Akışkan kısım atılıp bu işlem ikinci kez tekrar edildi. Tekrardan akışkan kısım uzaklaştırıldı, Nükleospin Gel and PCR Clean-Up kolonundaki membranı kurutup NT3'ü tamamen uzaklaştırmak amacıyla 11 000 g'de 1 dakika boyunca santrifüj işlemi yapıldı.

Sonrasında Nükleospin Gel and PCR Clean-Up kolonu temiz 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. DNA'yı ayrıştırmak için 25 µL elüsyon tamponu (NE), kolon membranının ortasına eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı ve ardından 2 dakika boyunca 11 000 g'de santrifüj edildikten sonra tüpün dibindeki örnek yeni steril bir mikrosantrifüj tüpüne aktararak saflaştırılmış, klonlanmaya hazır LentiCRISPRv2 vektörü elde edilir.



Şekil 8. LentiCRISPRv2 vektörü ve sekans referans noktaları (Zhang F., 2014)

### 3.2. CD80 ve CD86 Genlerine Özgü CRISPR Primerlerinin Hazırlanması

Mouse CRISPR Knockout Pooled Library (GeCKO v2) kütüphanesinden mouse CD80 ve CD86 genlerine özgü primerler tarandı ve aralarından en uygunları CRISPOR programı (Tefor infrastructure, France) kullanılarak ve her bir gen için 2'şer tane olmak üzere seçildi ardından Addgene: lentiCRISPRv2 ve lentiGuide oligo klonlama protokolünde belirtilen şekilde, seçtiğimiz primerleri dizayn edilip sentez ettirildi. (Sentegen, Ankara).

Sentezlettirilen primer sekansları;

**CD80 - A2 Revers** → CACCGAGTCTGAAGACCGAATCTAC

**CD80 - A2 Forward** → AAACGTAGATTCGGTCTTCAGACTC

**CD80 - B1 Revers** → CACCGTGTGGCCCGAGTATAAGAAC

**CD80 - B1 Forward** → AAACGTTCTTATACTCGGGCCACAC

**CD86 - A1 Revers** → CACCGGCACGTCTAAGCAAGGTCAC

**CD86 - A1 Forward** → AAACGTGACCTTGCTTAGACGTGCC

**CD86 - A2 Revers** → CACCGTTGACCTGCACGTCTAAGCA

**CD86 - A2 Forward** → AAACGTGCTTAGACGTGCAGGTCAAC

Oligonükleotitlerin konsantrasyonları ddH<sub>2</sub>O (Merek Millipore, USA) kullanılarak 100 µM'a ayarlandı ve birbiri ile komplementer olan üst ve alt oligonükleotitler T4 Polinükleotit Kinaz (T4 Polynucleotide Kinase; T4 PNK) enzimi ile birleştirildi. 1 µl sg RNA üst oligonükleotit (100 µM), 1 µl sg RNA alt oligonükleotit (100 µM), 1 µl 10x T4 Ligase Buffer (NEB, USA), 1 µl T4 PNK (NEB, USA) mikrosantrifüj tüpüne konuldu ve son hacim 10 µL'ye ddH<sub>2</sub>O (Merek Millipore, USA) ile tamamlandı. Sonrasında karışım 37°C de 30 dakika, 95°C de 5 dakika inkübasyon ve sonrasında her dakikada 5°C düşerek son sıcaklık 25°C olacak şekilde PCR cihazına (Eppendorf, Mastercycler, Germany) konuldu.

İnkübasyon tamamlandıktan sonra örnekler PCR cihazından alındı ve ddH<sub>2</sub>O (Merek Millipore, USA) ile 1/5 oranında dilüe edilip % 2'lik agaroz jelde 110 Voltta 20 dakika yürütüldü.

### **3.3. LentiCRISPRv2 Vektörü ile Oligonükleotitlerin Ligasyonu**

Bu aşamada dupleks haline getirdiğimiz oligonükleotitlerimizi T4 DNA ligaz enzimi ile jelden saflaştırıp elde ettiğimiz ligasyona hazır lentiCRISPRv2 vektörüne klonlandı. Her bir dupleks primer ayrı lentiCRISPRv2 vektöre klonlandı. 50 ng lentiCRISPRv2, 1 µl 1/200 oranında dilüe edilmiş dupleks oligonükleotit, 1 µl T4 DNA ligaz (NEB, USA), 2 µl 10x T4 DNA ligaz tamponu (NEB, USA) mikrosantrifüj tüpüne konuldu ve son hacim 20 µL'ye ddH<sub>2</sub>O (Merek Millipore, USA) ile tamamlandı ve karışım oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

#### **3.3.1. Ligasyon Ürününün *E. coli* Kompetan Hücrelerine Aktarılması**

*E. coli* DH5-α kompetan hücrelerine, klonlanmış oligonükleotitleri içeren lentiCRISPRv2 plazmitleri aktarıldı.

Steril 2 mL tüpe 1 µl ligasyon ürünü ve 200 µl kompetan hücre eklendi. Karışım 30 dakika buzda bekletildikten sonra 42°C de 90 saniye ısı şoku uygulandı. Sonrasında 1 dakika buzda inkübe edildi. Ardından her tüpe 800 µl LB sıvı besiyeri (BD, USA) sıvı besiyeri eklendi ve 37°C de su banyosunda (Thermo Scientific, USA) 45 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra hücreler maksimum rpm'de santrifüj edilerek hücreler dibe çöktürüldü. Santrifüjden sonra dibe çöken hücreleri yerinden kaldırmadan yavaşça süpernatantın 900 µl'si mikropipet (Isolab, Germany) ile uzaklaştırıldı. Geriye kalan 100 µl içerisinde dibe çökmüş olan hücreler mikropipet (Isolab, Germany) yardımıyla yavaşça çözdürüldü. Sonrasında çözdürülen hücreler ampisilin içeren (LB ampisilin 100 g/mL) LB agar'ın (BD, USA) bulunduğu petrilere ekildi ve 37°C'lik inkübatörde (Mettler, Germany) 16 saat inkübasyona bırakıldı.



### 3.3.2. Plazmit İzolasyonu

On altı saatlik inkübasyonun ardından petrilere farklı koloniler seçilip miniprep için 2 mL ampisilin içeren LB sıvı besiyerine ekim yapıp çalkalamalı inkübatörde (New Brunswick Sci., Innova 40/40R, USA) 180 rpm'de 37°C sıcaklıkta 16 saat bekletilerek hücrelerin üremesi sağlandı. Midiprep içinse 150 mL ampisilin içeren LB sıvı besiyerine ekim yapıldı. Besiyeri çalkalamalı inkübatörde (New Brunswick Sci., Innova 44/44R, USA) 200 rpm'de 37°C sıcaklıkta 16 saat bekletilerek hücrelerin üremesi sağlandı.

#### 3.3.2.1. Miniprep ile Plazmit İzolasyonu

Plazmitler Nucleospin Plasmid (Macherey-Nagel, Germany) kiti kullanılarak üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde izole edildi. 2 mL bakteri kültürü alınıp 1 dakika 11 000 g'de santrifüj edilerek hücreler dibe çöktürüldü. Santrifüj sonrası üstte kalan sıvı uzaklaştırılıp, tüpe 250 µL tampon A1 eklenir ve dibe çöken hücreler vorteks (Velp Scientifica, Italy) yardımıyla tamamen çözündürüldü. Ardından 250 µL tampon A2 eklenir ve tüp 7-8 kez yavaşça ters düz edilerek karıştırıp 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra tüpe 350 µL A3 solüsyonu ekleyip, 7-8 kez ters düz edilerek karıştırıldı. Sonrasında örnekler oda sıcaklığında, 10 dakika 11 000 g'de santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası üstteki faz Nucleospin Plasmid kolonuna transfer edildikten sonra oda sıcaklığında 1 dakika 11 000 g'de santrifüj edildi. Santrifüjün ardından, kolon steril bir 2 mL'lik tüpe aktarılıp üzerine 600 µL yıkama solüsyonu olan A4 tomponu eklenerek oda sıcaklığında 11 000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Akışkan kısım atılarak tüp 2 dakika daha santrifüj yapılarak kalan yıkama tamponu kolondan tamamen uzaklaştırıldı. Kolon 1,5 mL yeni steril bir tüpe aktarılıp üzerine 50 µL AE tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra 11 000g'de 1 dakika santrifüj edilerek plazmit DNA'sı kolondan ayrıştırılarak elde edildi. Plazmitler kullanılıncaya kadar -20°C'de dondurucuda (Bosch, Germany) saklandı.

### 3.3.2.2. Midiprep ile Plazmit İzolasyonu

Plazmitler HiPure Plasmid Midiprep (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Germany) kiti kullanılarak üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde izole edildi.

50 mL steril falkon tüp içerisindeki hücreler 4500 g'de + 4 °C'de 20 dakika santrifüj edilerek dibeye çöktürüldü. Üstte kalan kısım uzaklaştırdıktan sonra çöken hücre pelletinin üzerine 4 mL R3 tamponu eklenerek hücreler tamamen çözünene kadar pipetleme işlemi yapıldı. Sonrasında 4 mL Lizis tamponu eklenerek falkon tüp 5 kez ters düz edilip oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Ardından 4 mL N3 tamponu eklenerek tekrardan 5 kez ters düz edildi ve ardından 4500 g'de 40 dakika boyunca + 4 °C'de santrifüj edildi.

Santrifüjün bitmesine 10 dakika kala HiPure Plasmid Midiprep kolonundan 10 mL EQ1 tamponu geçirilerek kolon ıslatıldı. Kolon ıslatıldıktan sonra, santrifüjden çıkan örneklerin üst kısmı kolondan geçirildi. Tüm süpernatant kolondan geçirildikten sonra, 10 mL yıkama tamponu kolondan geçirildi ve bu işlem 2 kez tekrar edildi.

Ardından kolon steril bir 15 mL'lik falkona aktarıldı ve 5 mL E4 tamponu kolondan geçirildi, ardından kolon uzaklaştırılıp tüpe 3.5 mL izopropanol eklenip iyice karıştırıldı. Örnekler + 4 °C'de maksimum hızda 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstte kalan kısım uzaklaştırılıp tüpe 3 mL %70'lik etanol eklendi ve tekrardan + 4 °C'de maksimum g'de 5 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan kısım uzaklaştırıldıktan sonra tüplerden etanolü uzaklaştırmak amacıyla tüpler ağzı açık şekilde 10 dakika inkübe edildi.

Etanol tamamen uzaklaştırıldıktan sonra falkonun dibinde pellet 100 µL TE tamponu ile çözülerek örnekler mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve Nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific, USA) ile konsantrasyonları ölçülerek kullanılmaya kadar - 20 °C dondurucuya kaldırıldı.

### 3.3.3. İzole Edilen Plazmitlerin Görüntülenmesi

DNA'nın LentiCRISPRv2 vektörüne entegre olduğunu göstermek için plazmit DNA'sı izole edildikten sonra BsmBI restriksiyon enzimi ile kesim yapıp beklenen boydaki bantlar ile ligasyonun olup olmadığına bakıldı. Burada; 5 µg ligasyon yapılmış LentiCRISPRv2 plazmit, 3 µL BsmBI (10<sup>4</sup>u/mL) (NEB, USA), 3 µL 10x 3.1 Tampon (NEB, USA), 5 µL DTT (10 Mm) (Sigma, Germany) mikrosantrifüj tüpüne konuldu ve son hacim 30 µL'ye ddH<sub>2</sub>O (Merek Millipore,USA) ile tamamlandı. Bu karışım 55°C de PCR cihazında (Eppendorf, Mastercyclers, Germany) 2 saat inkübe edildi. Sonrasında örnekler 100 Voltta %1'lik agaroz jelde 1 saat jelde yürütüldü. Sonrasında örnekler sekanslamaya da gönderilerek ligasyon doğrulandı.

## 3.4. Hücre Kültürü

### 3.4.1. Hücre Materyali

Çalışmada kullanılan HEK293FT (İnsan embriyonik böbrek hücre hattı) hücreleri ve Raw 264.7 (Fare makrofaj hücre hattı) hücreleri American Type Culture Collection (ATCC)'den temin edildi. Çalışmalar sadece laboratuvar koşullarında yapıldı.

### 3.4.2. Donmuş HEK293FT ve Raw 264.7 Hücrelerinden Kültür Yapılması

ATCC'den soğuk zincirle temin edilen dondurulmuş hücreler kabin içerisinde, hücre kültürü laboratuvarında uygun şekilde eritildi ve 15 mL falkon tüp içerisine 10 mL DMEM (%10 Fetal sığır serumu, %1 L-glutamin, %1 penisilin ve streptavidin) besiyeri (GIBCO, USA) eklenerek, üzerine çözülen hücre süspansiyonu eklenip birkaç kez yavaşça pipetleme yapıldı. Hücrelerin bulunduğu falkon tüp 4°C'de 6 dakika 150 g'de santrifüj edildi. Biyogüvenlik kabinine alınan falkon tüp içerisindeki hücrelerin besiyeri aspire edilerek 2 mL taze besiyeri eklenip birkaç kez otomatik pipetle karıştırılarak T25 cm<sup>2</sup>'lik steril flask (Corning, USA) içerisine alınıp total hacim DMEM (%10 Fetal sığır serumu, %1 L-glutamin, %1 penisilin ve streptavidin) besiyeri ile 7 mL'e tamamlandıktan sonra CO<sub>2</sub> inkübatöründe (Binder, Germany) 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren bir ortamda inkübasyona bırakılarak çoğalmaları sağlandı.

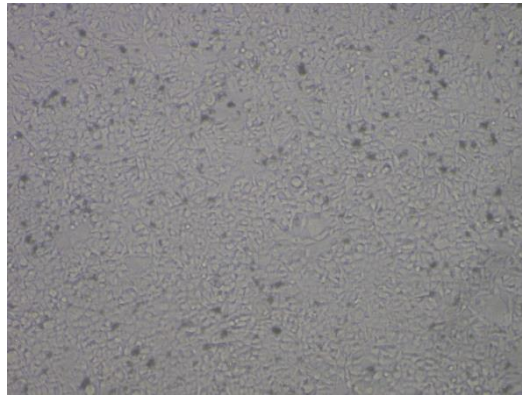
### 3.4.3. Hücrelerin Pasajlanması

#### 3.4.3.1. HEK293FT Hücrelerinin Pasajlanması

T25 cm<sup>2</sup> flask içerisindeki hücreler mikroskopla incelenerek %80 doluluk oranına sahip olduğu görüldükten sonra biyogüvenlik kabini içerisinde alınıp, var olan besiyeri aspire edilir ve 2 mL PBS (Phosphate-buffered saline) (Sigma, Germany) ile yıkayıp aspire edildi. Hücreleri yüzeyden kaldırmak amacıyla 500 µL Tripsin (1X) eklenip ve 5 dakika 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde bekletildi. Mikroskop altında hücrelerin yüzeyden söküldüğü gözlenerek biyogüvenlik kabini içerisinde alınan hücrelerin üzerine 2 mL DMEM (%10 Fetal sığır serumu, %1 L-glutamin, %1 penisilin ve streptavidin) besiyeri (GIBCO, USA) eklenip ve hücreler flasktan 15 mL'lik steril falkona aktarıldı.

Ardından 300 g'de 5 dakika santrifüj edilen hücreler dibe çöktürüldü. Tekrardan kabin içerisinde alınan falkondaki hücrelerin besiyeri aspire edildi ve falkon içerisinde 3 mL DMEM (%10 Fetal sığır serumu, %1 L-glutamin, %1 penisilin ve streptavidin) besiyeri (GIBCO, USA) eklenerek dibe çöken hücreler pipetleme yardımıyla çözdürüldü. Ardından hücreler yeni bir steril T75 cm<sup>2</sup> flask (Corning, USA) içerisinde aktarıp total hacim 15 mL'e tamamlanacak şekilde DMEM (%10 Fetal sığır serumu, %1 L-glutamin, %1 penisilin ve streptavidin) besiyeri (GIBCO, USA) eklenip hücreler 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre konularak çoğalmaları sağlandı.

T75 cm<sup>2</sup> flask'a ekilen hücreler bir iki gün sonra kontrol edilip % 80 doluluk oranına sahip olduğu görüldükten sonra yukarıda anlatılan işlem tekrar edilir.

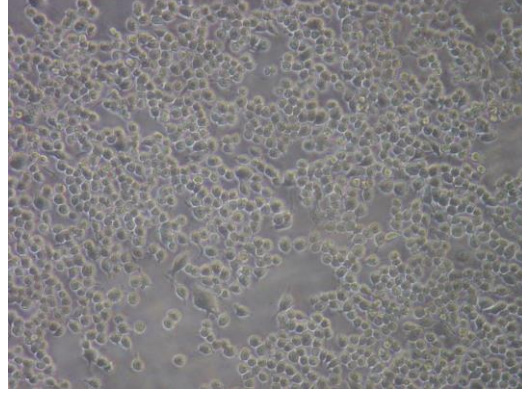


Şekil 9. HEK293FT hücrelerinin inverted ışık mikroskopunda 20X büyütme objektifteki görüntüsü

Hücreler inkübatörden kabin içerisine alınır üzerine 4 mL PBS (Sigma, Germany) ile yıkanıp aspire edildi. Hücreleri yüzeyden kaldırmak amacıyla 1 µL Trypsin (1X) eklenip ve 5 dakika 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde bekletildi. Mikroskop altında hücrelerin yüzeyden ayrıldığı gözlendikten sonra tekrardan kabin içerisine alınan hücrelerin üzerine 9 mL DMEM (%10 Fetal sığır serumu, %1 L-glutamin, %1 penisilin ve streptavidin) besiyeri (GIBCO, USA) eklendi ve hücreler flasktan 15 mL'lik steril falkona aktarıldı. Ardından 300 g'de 5 dakika santrifüj yapılarak hücreler dibe çöktürüldü. Tekrardan kabin içerisine alınan falkondaki hücrelerden besiyeri aspire edildi ve falkon içerisine 6 mL DMEM (%10 Fetal sığır serumu, %1 L-glutamin, %1 penisilin ve streptavidin) besiyeri (GIBCO, USA) eklenerek dibe çöken hücreler pipetleme yardımıyla resüspanse edildi. Ardından hücreler yeni bir steril T175 cm<sup>2</sup> flask (Corning, USA) içerisine aktarılıp total hacim 30 mL'e tamamlanacak şekilde DMEM (%10 Fetal sığır serumu, %1 L-glutamin, %1 penisilin ve streptavidin) besiyeri (GIBCO, USA) eklenip hücreler 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre konularak çoğalmaları sağlandı.

#### **3.4.3.2. Raw 264.7 Hücrelerinin Pasajlanması**

T25 cm<sup>2</sup> flask (Corning, USA) içerisindeki hücreler mikroskopla incelenerek %80 doluluk oranına sahip olduğu görüldükten sonra biyogüvenlik kabini içerisine alınıp, var olan besiyeri aspire edildi ve 2 mL PBS (Sigma, Germany) ile yıkanıp aspire edildi ve flaska 2 mL DMEM (%10 Fetal sığır serumu, %1 L-glutamin, %1 penisilin ve streptavidin) besiyeri (GIBCO, USA) eklendi. Ardından steril bir scraper aracılığıyla flask yüzeyi kazınarak hücreler yüzeyden kaldırıldı. Mikroskop altında hücrelerin yüzeyden kaldırıldığı gözlenerek biyogüvenlik kabini içerisine alındı ve flastaki hücreleri içeren tüm ortam 15 mL'lik steril falkona aktarıldı. Ardından 300 g'de 5 dakika santrifüj yapılarak hücreler dibe çöktürüldü. Tekrardan kabin içerisine alınan falkondaki hücrelerin besiyeri aspire edildi ve falkon içerisine 3 mL DMEM (%10 Fetal sığır serumu, %1 L-glutamin, %1 penisilin ve streptavidin) besiyeri (GIBCO, USA) eklenerek dibe çöken hücreler pipetleme yardımıyla çözdürüldü. Ardından hücreler yeni bir steril T75 cm<sup>2</sup> flask (Corning, USA) içerisine aktarılıp total hacim 15 mL'e tamamlanacak şekilde DMEM besiyeri (GIBCO, USA) eklenip hücreler 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre konularak çoğalmaları sağlandı.

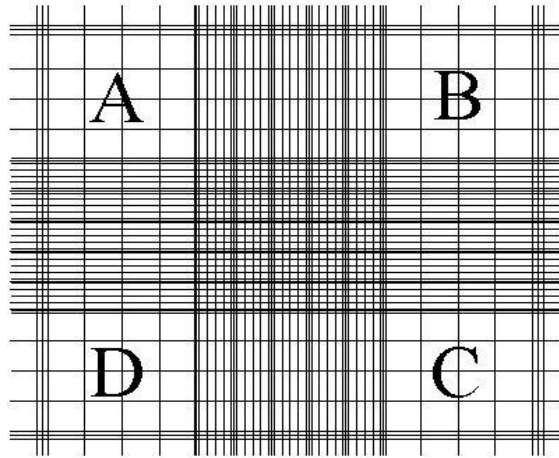


Şekil 10. : Raw 264.7 hücrelerinin inverted ışık mikroskobunda 20X büyütme objektifindeki görüntüsü

#### 3.4.4. Hücrelerin Sayılması

Hücre sayım yapılacak flasktaki hücreler bulunduları flask tipine göre 3.4.3 de anlatılan işlemlere tabi tutulur. Santrifüj aşamasında sonra kabine alınıp besiyeri aspire edilip uzaklaştırılır ve çöken hücrelerin üzerine bir miktar besiyeri eklenerek dipteki hücreler çöktürülür. Ardından steril ependorf tüpü alınıp içine 20 µL tripan mavisi (Sigma, Germany) çözeltisinden ve 20 µL hücre süspansiyonundan alınarak pipetleme yapılır ve 1-2 dakika bekletilip Hemositometrenin (Hausser Scientific, USA) olukları arasına 10 µL alttan ve 10 µL üstten olmak üzere karışım pipetlendi. Işık mikroskobunda görülen küçük karelerin etrafındaki büyük kareler sayılır.

Hesaplama şu şekilde yapılır; Sayılan karelerin aritmetik ortalaması x 2 (Dilüsyon faktörü) x 10000 = 1 mL'deki toplam hücre sayısı



Şekil 11. Hemositometre. Hemositometrede sayılması gerek alanlar harflerle gösterilmiştir (Jumuddin F., 2018).

### 3.5. Virüs Üretimi

Virüs üretimi elde etmek istediğiniz virüs partikülü sayısına göre temelde 2'ye ayrılır: Büyük ölçekli virüs üretimi ve küçük ölçekli virüs üretimi. Küçük ölçekli virüs üretiminde yaklaşık 5-6 milyon virüs partikülü üretilirken büyük ölçekli virüs üretiminde 10-15 milyon virüs partikülü elde edilir. Küçük ölçekli virüs üretiminde 100 mm'lik petripler tercih edilirken büyük ölçekli virüs üretiminde 150 mm'lik petripler tercih edildi. İki üretim şeklinde de tüm süreçler aynı olup sadece rakamlarda bazı farklılıklar görülmektedir.

#### 3.5.1. Virüs Üretiminde Kullanılacak Petrilerin Poly-L-lysin ile Kaplanması

Virüs üretiminde kullanılacak olan petripler kabin içerisinde ilk olarak ticari olarak temin edilen Poly-L-lysin (BD, USA) ile kaplandı. Burada amaç, petrilere ekilecek hücrelerin Poly-L-lysin aracılığı ile sıkı bir şekilde petri yüzeyine yapışmasını sağlamaktır.

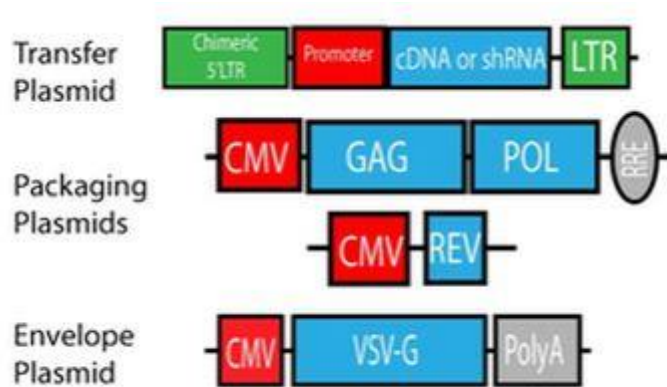
İlk olarak Poly-L-lysin 0.22 nm'lik filtreden geçirildi. Sonrasında filtrelenmiş Poly-L-lysin petrilere konuldu. Büyük ölçekli virüs üretimi için 150 mm'lik petrilerin herbirine 5 mL Poly-L-lysin konuldu. Küçük ölçekli virüs üretiminde ise 100 mm'lik petrilerin herbirine 2 mL Poly-L-lysin konuldu. Ardından petripler kabin içerisinde 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra Poly-L-lysin petri yüzeyini tamamen kaplayan bir tabaka oluşturur. Aspirasyon yapılarak yüzeyde kalan fazla Poly-L-lysin uzaklaştırıldı. Sonrasında petripler, 100 mm'lik petriplerde 5 mL, 150 mm'lik 7-8 mL ddH<sub>2</sub>O kullanılarak iki kere yıkandı ve her bir yıkama işleminden sonra ddH<sub>2</sub>O aspire edilerek uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi bittikten sonra petripler kabin içerisinde 1 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından petripler hücre ekimi için uygun hale gelmiş oldu.

### 3.5.2. Poly-L-lysin ile Kaplı Petrilere Hücre Ekimi

Petrilerin yüzeyi Poly-L-lysin ile kaplandıktan sonra hücre ekimi aşamasına geçildi. Küçük ölçekli üretim yapılacaksa 100 mm'lik petrilere 10 mL DMEM-GlutaMAX (%10 Fetal sığır serumu, %1 L-glutamin, %1 penisilin ve streptavidin) besiyeri (GIBCO, USA) konuldu ve 3.4.3 de hazırlanan hücrelerden 5 milyon hücre ekildi. Büyük ölçekli üretim için 150 mm'lik petrilere 20 mL DMEM-GlutaMAX (%10 Fetal sığır serumu, %1 L-glutamin, %1 penisilin ve streptavidin) besiyeri konuldu ve 15 milyon hücre ekildi. Ekim yapıldıktan sonra petrilere 37°C de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 16 saat inkübasyona bırakıldı.

### 3.6. Plazmitlerin Hazırlanması ve Virüs Üretimi

Üçüncü jenerasyon lentivirüslerin üretiminde temelde 3 tip plazmit kullanılmaktadır. Bunlar; paketleme plazmiti, zarf plazmiti ve transfer etmek istediğimiz geni içeren plazmit. Paketleme plazmitleri temelde GAG/POL ve REV genlerini kodlayan iki plazmitten oluşur. Zarf plazmiti ise virüsün zarf yapısının oluşumunu sağlayan VSV-G genini kodlar (Şekil 12). Temelde bu plazmitler ko-transfekte ederek istenilen virüs elde edilmektedir. Bu tez çalışmasında CRISPR vektörü dışında kontrol olarak da GFP üreten LeGO-G2 Puro vektörünü kullandık. LeGO-G2 Puro plazmiti en son aşamada ne kadar virüs partikülü ürettiğimizi hesaplamada kullanıldı.



Şekil 12. Üçüncü Jenerasyon Lentiviral plazmitler (Addgene).



### 3.6.1. Küçük Ölçekli Virüs Üretimi

Kabin içerisinde steril bir mikrosantrifüj tüpüne 3.75 µg GAG/POL plazmiti, 2.25 µg REV plazmiti, 1.5 µg VSV-G plazmiti ve 7.5 µg transfer edilecek plazmit konularak total hacim ddH<sub>2</sub>O ile 450 µL'ye tamamlandı. Sonrasında üzerine 50 µL CaCl<sub>2</sub> eklenerek mikropipet yardımıyla karıştırıldı. Ardından kabin içerisinde steril 50 mL falkona 500 µL 2xHBS (Sigma, Germany) konuldu. 2xHBS eklenmiş falkona 2 mL'lik serolojik pipet ile girilip pipet yardımıyla bubling yapıldı. Bubling sırasında içerisinde CaCl<sub>2</sub> bulunan plazmit karışımı 1000 µL'lik mikropipet yardımıyla yavaş bir şekilde, damla damla eklendi. Tüm karışım 2xHBS içerisine aktarıldıktan sonra da yaklaşık 10 saniye daha bubling'e devam edildi. Ardından bu karışım 15 dakika kabinde inkübasyona bırakıldı.

Sonrasında 3.5.2. de hücre ektiğimiz petriyer kabin içerisine alındı ve hücre kültürüne, hücrelerin porlarını açıp virüs partiküllerinin hücre içine girmesini sağlamak için besiyerinin 1/1000 oranında (10 µL) 2.5 mM klorokin (Sigma, Germany) eklendi. Ardından yukarıda hazırlanmış olduğumuz karışım mikropipet yardımıyla yavaşça bu petrilere eklendi. Plazmit içeren karışımın hepsi eklendikten sonra petriyerler 8-10 saat 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı. 8-10 saatlik inkübasyondan sonra petriyerlerdeki besiyeri çekilir ve taze 11 mL DMEM-GlutaMAX (%10 Fetal sığır serumu, %1 L-glutamin, %1 penisilin ve streptavidin) besiyeri (GIBCO, USA) eklenerek tekrardan 37°C de, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

### 3.6.2. Büyük Ölçekli Virüs Üretimi

Kabin içerisinde steril bir mikrosantrifüj tüpüne 15 µg GAG/POL plazmiti, 10 µg REV plazmiti, 5 µg VSV-G plazmiti ve 30 µg transfer edilecek plazmit konularak total hacim ddH<sub>2</sub>O ile 900 µL'ye tamamlandı. Sonrasında üzerine 100 µL CaCl<sub>2</sub> eklenir mikropipet yardımıyla karıştırıldı.

Ardından kabin içerisinde steril 50 mL falkona 1 mL 2xHBS konuldu. 2xHBS (Sigma, Germany) eklenmiş falkona 2 mL'lik serolojik pipet ile girilip pipet yardımıyla bubling yapıldı. Bubling sırasında içerisinde CaCl<sub>2</sub> bulunan plazmit karışımı 1000 µL'lik mikropipet yardımıyla yavaş bir şekilde, damla damla eklendi.

Tüm karışım 2xHBS içerisine aktarıldıktan sonrada yaklaşık 10 saniye daha bubbling'e devam edildi. Ardından bu karışım 15 dakika kabinde inkübasyona bırakıldı. Sonrasında 3.5.2 de hücre ektiğimiz petri kabin içerisine alındı ve 1/1000 oranında (20 µL ) 2.5 mM klorokin (Sigma, Germany) eklendi.

Yukarıda hazırlanmış olduğumuz karışım mikropipet yardımıyla yavaşça bu petrilere eklendi. Plazmit içeren karışımın hepsi eklendikten sonra petri kabinler 8-10 saat 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı. 8-10 saatlik inkübasyondan sonra petri kabinlerdeki besiyeri çekildi ve taze 21 mL DMEM-GlutaMAX (%10 Fetal sığır serumu, %1 L-glutamin, %1 penisilin ve streptavidin) besiyeri (GIBCO, USA) eklenerek tekrardan 37°C de, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

### **3.7. Üretilen Virüslerin Toplanıp Saklanması**

İnkübasyona bırakılan petri kabinlerden 24. saat ve 36. saat de tüm besiyeri 10 mL'lik şırınga yardımıyla çekilerek üretilmiş olan virüsler toplandı.

İnkübasyona bırakılan petri kabinler 24. saat de inkübatörden kabin içerisine alındı. Ardından petri kabinlerdeki ortamı toplamak için kullanılacak steril 10 mL'lik şırıngalar da kabin içerisine alındı ve şırınga uçlarına steril 0.45 µm'lik filtre takıldı. Ardından petri kabinlerde ki besiyeri uçlarında filtre bulunan bu şırıngalar aracılığı ile yavaşça çekilerek steril 15 mL falkonlara konuldu. Tüm besiyeri bu şekilde toplandıktan sonra petri kabinlere taze DMEM-GlutaMAX (%10 Fetal sığır serumu, %1 L-glutamin, %1 penisilin ve streptavidin) besiyeri (GIBCO, USA) konuldu.

150 mm'lik petri kabinler kullanılıyorsa 20 mL, 100 mm'lik petri kabinler kullanılıyorsa 10 mL taze besiyeri eklendi. Ardından petri kabinler 12 saat daha 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatör de inkübasyona bırakıldı. 15 mL'lik falkonlarda toplanan besiyerinden daha sonrasında titrasyon da kullanılmak üzere 50 µL örnek alınarak mikrosantrifüj tüpüne konuldu sonrasında toplanan virüsler -80°C'e (Forma, Thermo ElectronCorp, USA) kaldırıldı. Tekrardan inkübasyona bırakılan petri kabinler 36. saat de inkübatörden kabin içerisine alındı ve yukarıda anlatılan işlemler tekrar edildi. Tüm besiyeri toplanıp -80°C'e (Forma, Thermo ElectronCorp, USA) kaldırıldı.

### 3.8. Üretilen Virüs Partikülü Sayısının Hesaplanması

#### 3.8.1. Virüs Titrasyonu

Bu aşamada 24. saat ve 36. saat de topladığımız virüslerden aldığımız örnekler farklı miktarlarda titre edilerek 24 kuyucuklu plaklara ektiğimiz HEK293FT hücrelerine uygulandı ve sonrasında akan hücre ölçer analizi yapılarak üretilen virüs partikülü sayısı hesaplandı. Kabin içerisine steril 24 kuyulu plak alındı. Her bir kuyucuğa 500 µL DMEM (%10 Fetal sığır serumu, %1 L-glutamin, %1 penisilin ve streptavidin) besiyeri (GIBCO, USA) konuldu. Ardından yine her kuyuya 50.000 HEK293FT hücresi 3.4.3.1. ve 3.4.4. de anlatıldığı gibi hazırlandı ve ekildi. Plak, hücreler ekildikten sonra 3-4 saat 37°C de, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatör de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra kabin içerisine alınan plaktaki her bir kuyuya virüs örnekleri eklenmeden önce, transdüksiyon etkinliğini arttırmak amacıyla besiyerinin 1/1000 oranında (0.5 µL) protamin sülfat (8 mg/mL) (Sigma, Germany) eklendi.

Ardından 24. saat ve 36. saatte toplanan LeGO-G2 Puro'ya ait mikrosantifüj tüplerindeki 50 µL'lik virüs örnekleri -80°C'den (Forma, Thermo ElectronCorp, USA) kabin içerisine alınıp çözünmesi beklendi. Sonrasında aşağıda gösterilen miktarlarda ve şekilde kuyulara virüs örnekleri eklendi.

	G2 Puro 24. saat	G2 Puro 36. saat	Kontrol Kuyusu Virüs yok			
0,1 µL						
0,5 µL						
1 µL						
5 µL						

Şekil 13. Virüs titrasyonu. Şekilde görüldüğü üzere LeGO-G2 Puro'ya ait 24. saat ve 36. saatte toplanan virüs örnekleri farklı miktarlarda kuyucuklara ekilmiştir. Kontrol olarakta bazı kuyulara sadece hücre ekilmiş virüs eklenmemiştir.

Virüsler eklendikten sonra plak 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatör de 16 saat inkübasyona bırakıldı. 16 saat sonunda plak kabin içerisine alınıp kuyucuklardaki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırıldı ve taze 1 mL DMEM (%10 Fetal sığır serumu, %1 L-glutamin, %1 penisilin ve streptavidin) besiyeri (GIBCO, USA) kuyucuklara eklendi. Ve plak 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatör de inkübasyona bırakılıp 48 saat sonra analizleri yapılmak üzere örnekler akan hücre ölçerden geçirildi.

### **3.8.2. Akan Hücre Ölçer Analizi ile Üretilen Virüs Partikülü Sayısı ve MOI Hesaplaması**

İnkübasyona bırakılan plaktaki hücreler 48 saat sonra akan hücre ölçer cihazından geçirilerek analizleri yapıldı ve üretilen virüs miktarı hesaplandı.

Kabin içerisinde steril santrifüj tüpüne 50 µL PBS ve 250 µL FBS (Fetal bovine serum) konularak karıştırılarak %0,5'lik FBS/PBS solüsyonu elde edildi. Ardından inkübatördeki 24 kuyucuklu hücre kültür plağı kabin içerisine alınır ve kuyulardaki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırıldı.

Sonrasında her kuyuya 50 µL tripsin eklenir ve 37°C'de inkübatörde 7-8 dakika bekletildi. Sonrasında her kuyuya 1 mL %5'lik FBS/PBS solüsyonundan eklendi ve hücreler pipetleme yapılarak toplanıp tüplere konuldu. Tüpler 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılıp, tüplere 500 µL %5'lik FBS/PBS solüsyonundan eklendi ve örnekler akan hücre ölçerden geçirilerek (BD LSRFortessa, USA) analizleri yapıldı.

Akan hücre ölçerde tüm örnekler sırasıyla geçirilerek analiz sonuçlarındaki LeGO-G2 Puro'ya ait GFP ışımaya bakılıp üretilen virüs partikülü sayısı aşağıdaki şekilde hesaplanır:

0,5 µL virüs örneği ile muamele ettiğimiz kuyudaki hücreler % 4 oranında GFP ışımaya görülürse;

100 hücreden 4'ü enfekte ise

50.000 hücreden Y kadarı enfekte

$$Y = (50.000 \times 4) / 100 = 2000 \text{ hücre enfekte}$$

0.5 µL virüs örneğinde 2000 hücreyi enfekte ederse

1000 µL virüs örneği Z hücre enfekte eder

$$Z = (1000 \times 2000) / 0.5 = 4 \times 10^6 \text{ enfekte hücre} = 4 \times 10^6 \text{ virüs partikülü/mL}$$

Şekil 13'deki her bir kuyu için bu hesaplama yapıldı ve bu hesaplamalarda 24. saatin 0.1 µL, 0.5 µL, 1 µL, 5 µL kuyuları için yapılan hesaplamalarının birbirine yakın, 36. saatin 0.1 µL, 0.5 µL, 1 µL, 5 µL kuyuları için yapılan hesaplamalarının da birbirine yakın çıkması beklenmektedir.

Üretilen virüs partikülü sayısı hesaplandıktan sonra bu virüsler hücreye verilmeden önce birde MOI ( Multiplicity of infection) hesaplaması yapılmaktadır. MOI temelde her bir hücreyi enfekte edecek olan virüs partikülü sayısıdır ve hücreden hücreye farklılık gösterir. Hesaplamalar şu şekilde yapıldı; MOI x toplam hücre miktarı.

Örneğin 1 milyon hücreye MOI 2 olacak şekilde virüs kullanmak istiyorsak, 2 milyon virüs partikülü verilmesi gerekir. Sonrasında da 2 milyon virüs partikülünün kaç mL'e denk geldiği hesaplanır.

Yukarıda işlem devam ettirilirse;

0.5 µL virüs örneği      2000 hücreyi enfekte ederse

1000 µL virüs örneği      Z hücre enfekte eder

$$Z = (1000 \times 2000) / 0.5 = 4 \times 10^6 \text{ enfekte hücre} = 4 \times 10^6 \text{ virüs partikülü/mL}$$

1 mL'de       $4 \times 10^6$  virüs partikülü varsa

A mL'de       $2 \times 10^6$  virüs partikülü vardır

$$A = (2 \times 10^6 \times 1) / 4 \times 10^6 = 0.5 \text{ mL}$$

Yani 1 milyon hücre için MOI 2 de virüs kullanmak istenildiğinde üretilen virüsten 0.5 mL alınır ve hücreye verilir.

### **3.9. CRISPR Virüslerinin Raw 264.7 Hücrelerine Aktarılması**

3.4.3.2. de anlatıldığı gibi Raw 264.7 hücreleri pasajlanır. Toplama 6 tane T25 cm<sup>2</sup> flask hazırlanır ve 7 mL DMEM (%10 Fetal sığır serumu, %1 L-glutamin, %1 penisilin ve streptavidin) besiyeri (GIBCO, USA) içeren her bir flaska 500.000 hücre ekilerek 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatör de 16 saat inkübasyona bırakıldı.

On altı saatin sonunda kabin içerisine alınan flaskaların besiyerleri aspire edilerek uzaklaştırıldı. -80°C'de (Forma, Thermo ElectronCorp, USA) saklanan virüsler kabin içerisine alınarak çözümleri beklendi. Sonrasında MOI 3 olacak şekilde (16 saatin sonunda flaskta 1 milyon hücre olduğunu varsayarsak  $1 \times 10^6 \times 3(\text{MOI}) = 3 \times 10^6$  virüs partikülü kullanılır) CRISPR virüsü eklendi ve total hacim 7 mL'e tamamlandı.

Ardından besiyerinin 1/1000 oranında protamin sülfat (8 mg/mL) (Sigma, Germany) ortama eklendi ve 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatör de 10 saat inkübasyona bırakıldı. Burada CRISPR virüslerinin yanında kontrol olarak LeGO-G2 Puro virüsü kullanıldı.

On saatlik inkübasyonun ardından flasklar kabin içerisine alınıp içerdikleri besiyerler aspire edilerek uzaklaştırılır ve 7 mL taze DMEM (%10 Fetal sığır serumu, %1 L-glutamin, %1 penisilin ve streptavidin) besiyeri (GIBCO, USA) eklendi. Ardından flasklar tekrardan 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatör de 10 saat inkübasyona bırakıldı.

### **3.10. Seleksiyon**

Virüs verildikten sonra hücrelerin durumuna göre 36. ya da 48. saatin ardından seleksiyona başlandı. Seleksiyon 6 µg/mL puromisin (Sigma, Germany) ile yapıldı. CRISPR vektöründe puromisin direnç geni bulunduğundan bu vektörü almış hücreler seleksiyonda hayatta kalırken, vektörü almamış olan hücrelerin ölmesi beklenir.

Virüs verildikten 24-36 saat sonra hücreler kabin içerisine alındı. Flasklarda ki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırıldı ve 7 mL taze DMEM (%10 Fetal sığır serumu, %1 L-glutamin, %1 penisilin ve streptavidin) besiyeri (GIBCO, USA) eklendi. Sonrasında 6 µg/mL puromisin (Sigma, Germany) eklendi ve hücreler 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatör de inkübasyona bırakıldı.

### **3.11. Akan Hücre Ölçer ile CD80 - CD86 Taraması Yapılması**

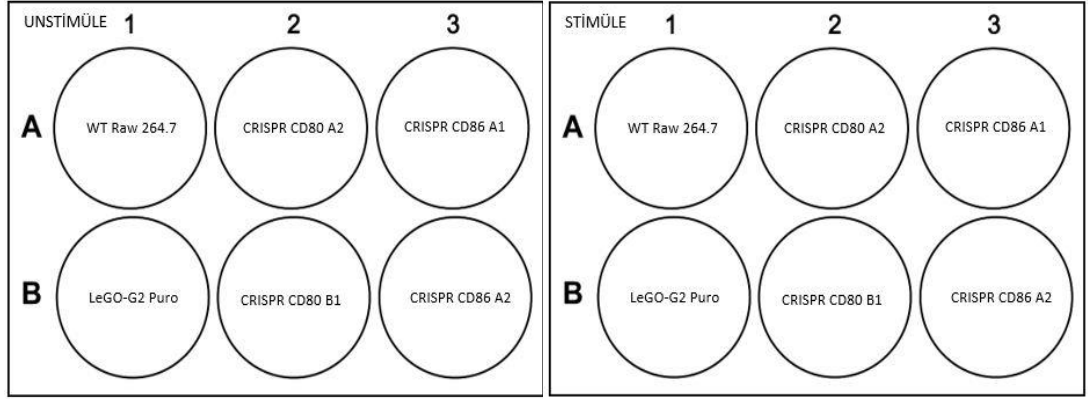
3.10. da anlatıldığı gibi yapılan seleksiyonda hayatta kalan hücrelerde CRISPR'ın çalışıp CD80 ve CD86'nın susturulduğuna emin olmak için monoklonal antikolar kullanılarak akan hücre ölçer ile bu hücreler değerlendirildi.

#### **3.11.1. Raw 264.7 Hücrelerin IFN-γ ile Uyarılması**

Bu aşamada de nova sentezin baskılanıp baskılanmadığını göstermek için makrofajlarda CD80 ve CD86 ifadesini arttıran IFN-γ ile uyarım yapıldı.

Kabin içerisine steril 2 adet 6 kuyulu hücre kültür plağı alındı. Uyarılan (Stimüle) ve uyarılmayan (Unstimüle) olmak üzere plaklar 2'ye ayrıldı. Her bir kuyucuğa 1 mL DMEM (%10 Fetal sığır serumu, %1 L-glutamin, %1 penisilin ve streptavidin) besiyeri (GIBCO, USA) konuldu ardından yine her kuyuya 3.10. da anlatıldığı gibi yapılan seleksiyonda hayatta kalan hücrelerden 300.000 Raw 264.7 hücresi 3.4.3.2. ve 3.4.4. de anlatıldığı gibi hazırlandı ve ekildi.

Plağa ekim şekil 14’de gösterildiği gibi yapıldı. Sonrasında plak 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatör de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün stimüle edilecek plak inkübatörden kabin içerisine alınarak her kuyuya 10 ng/mL IFN- $\gamma$  (Sigma, USA) konuldu ve hücreler sonrasında 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatör de 1 gün inkübasyona bırakıldı.



**Şekil 14.** Hücrelerin IFN- $\gamma$  ile uyarılması. 6 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına hücreler şekilde görüldüğü gibi ekilmiştir. Plakların biri IFN- $\gamma$  ile uyarılırken diğeri uyarılmamıştır.

### 3.11.2. Akan Hücre Ölçer Analizi

IFN- $\gamma$  ile uyarılan ve uyarılmayan 2 plak 24 saatlik inkübasyondan sonra inkübatörden kabine alındı. Ardından her kuyudaki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılır ve 700  $\mu$ L taze DMEM (%10 Fetal sığır serumu, %1 L-glutamin, %1 penisilin ve streptavidin) besiyeri (GIBCO, USA) konuldu. Sonrasında steril bir scraper yardımıyla plak yüzeyinde hücreler kazınarak kaldırıldı. Mikropipet yardımıyla tüm ortam toplandı ve tüplere aktarıldı.

Sonrasında her bir kuyu için 3 tüp hazırlandı. Her tüpe 100  $\mu$ L toplanan hücre süspansiyonundan konuldu.

Ardından 2. tüplere 1  $\mu$ L IgG APC (BD, USA), 1  $\mu$ L IgG PE (BD, USA) monoklonal antikolarından konuldu. 3. tüplere ise 6  $\mu$ L CD80 APC (Tonbo Biosciences, USA) ve 5  $\mu$ L CD86 PE (Tonbo Biosciences, USA) monoklonal antikor eklenildi. Sonrasında tüpler 20 dakika karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyonun ardından her tüpe 2 mL cell wash eklenir ve 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi.



Santrifüjden sonra süpernatant atılıp ve hücre pelletinin üzerine 300 µL cell wash eklenecek vorteks yapıldı ve hücreler, akan hücre ölçer cihazında (Beckman Coulter, USA) okutuldu ve sonuçlar Kaluza Analysis Software ve Navios EX Software (Beckman Coulter, USA) programlarında analiz edildi.

Uyarılmış ve Uyarılmamış 6 kuyulu hücre plaklarındaki her kuyu için 3 tüp hazırlanmıştır ve her tüpte bulunanlar aşağıda özetlenmiştir.

### **Uyarılmamış (US;Unstimüle)**

- 1. tüp (BOŞ)** = Herhangi bir monoklonal antikorla muamele edilmemiş ve IFN- $\gamma$  ile uyarılmamış hücre
- 2. tüp (İZOTİP)** = IgG PE ve IgG APC monoklonal antikoruyla muamele edilmiş IFN- $\gamma$  ile uyarılmamış hücre
- 3. tüp (CD80-86)** = CD80 APC ve CD86 PE monoklonal antikorlarıyla muamele edilmiş IFN- $\gamma$  ile uyarılmamış hücre

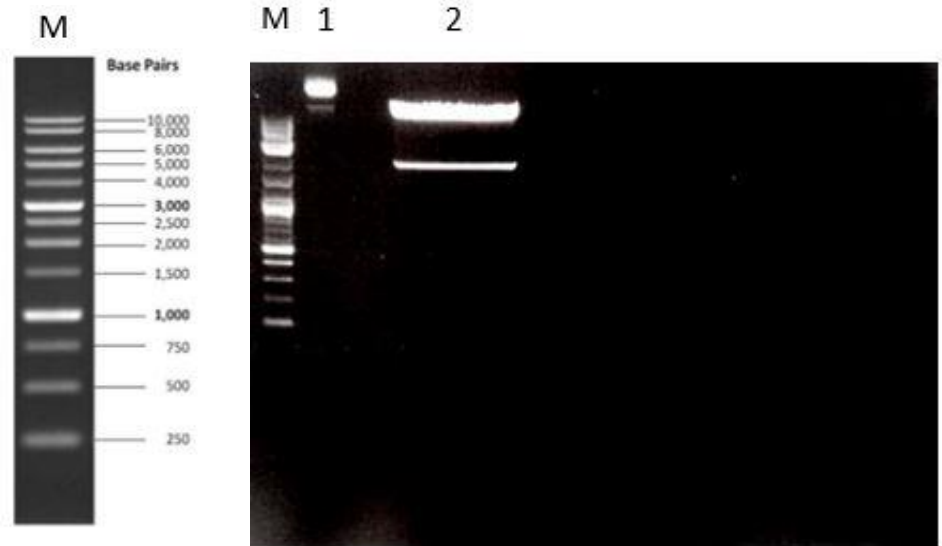
### **Uyarılmış (STI;Stimüle)**

- 1. tüp (BOŞ)** = Herhangi bir monoklonal antikorla muamele edilmemiş ve IFN- $\gamma$  ile uyarılmış hücre
- 2. tüp (İZOTİP)** = IgG PE ve IgG APC monoklonal antikoruyla muamele edilmiş IFN- $\gamma$  ile uyarılmış hücre
- 3. tüp (CD80-86)** = CD80 APC ve CD86 PE monoklonal antikorlarıyla muamele edilmiş IFN- $\gamma$  ile uyarılmış hücre

## 4. BULGULAR

### 4.1. LentiCRISPRv2 Vektörünün Ligasyona Hazırlanması

LentiCRISPRv2 vektörünün (Addgene) CD80 ve CD86 genlerine özgü primerleri klonlayacağımız bölge, 3.1. de anlatıldığı gibi BsmBI restriksiyon enzimi kullanılarak kesildi. Agaroz jelde yürütüldükten sonra jelde görünen 2 banttandır (Şekil 15), 12,5 kb uzunluğunda olan vektöre ait bant kesilip saflaştırıldı.

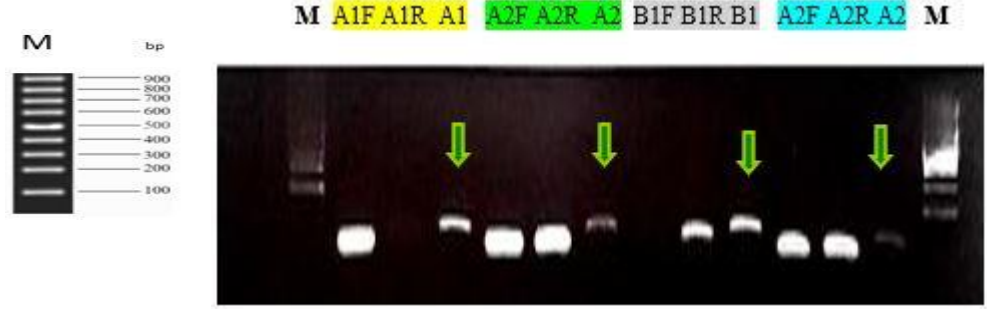


**Şekil 15.** LentiCRISPRv2 vektörünün BsmBI ile kesiminin %1 lik agaroz jel görüntüsü M: Moleküler ağırlık marker (New England Biolabs inc.,USA), 1 nolu kuyucuk; kesime tabi tutulmamış LentiCRISPRv2 vektörü, 2 nolu kuyucuk; kesime tabi tutulmuş LentiCRISPRv2 vektörü. Jel görüntüsünden de anlaşıldığı gibi kesim gerçekleşmiştir ve vektör ligasyona hazır hale gelmiştir.

### 4.2. CD80 ve CD86 Genlerine Özgü CRISPR Primerlerinin Dupleks Haline Getirilmesi

Mouse CRISPR Knockout Pooled Library (GeCKO v2) kütüphanesinden mouse CD80 ve CD86 genlerine özgü ve her bir gen için 2'şer tane olmak üzere seçilen primerler 3.2. de anlatıldığı gibi dupleks haline getirildi.

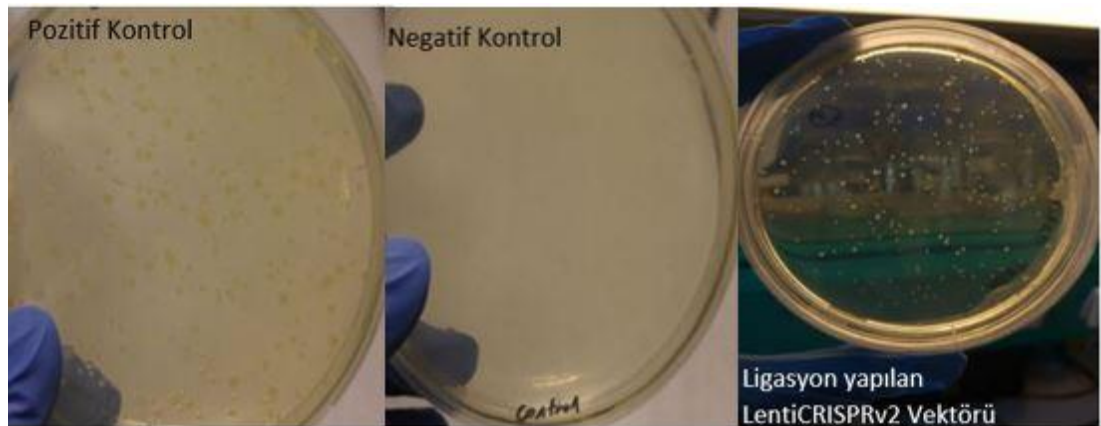
Dubleks olan oligolar olmayanlara göre agaroz jelde daha yavaş yürüyeceklerdir ve jelde diğerlerine göre daha yukarıda yer alması beklenmektedir. Ayrıca kontrol amaçlı olarak her bir oligonükleotitin üst ve alt olarak dubleks işlemine tabi tutulmamış halleri de jele yüklendi ve böylece dubleks olan ve olmayanlar kolayca ayırt edilebildi.



Şekil 16. CD80/86'nın her biri için tasarlanan oligonükleotitlerin %2'lik agaroz jel görüntüsü. Oklarla gösterilenler dubleks olanlar (CD86-A1) - (CD86-A2) - (CD80-B1) - (CD80-A2). Diğerleri ise, dubleks işlemine tabi tutulmayan üst ve alt primerleri. M: Moleküler ağırlık marker (New England Biolabs inc.,USA).

### 4.3. LentiCRISPRv2 Vektörü ile Oligonükleotitlerin Ligasyonu

Oligonükleotitler LentiCRISPRv2 plazmit vektöre klonlandıktan sonra ligasyon ürünü kompetan *E. coli* hücrelerine aktararak, transforme olmuş hücreler ampisilin içeren (LB ampisilin 100 g/mL) ortamda çoğaltıldı. Başarıyla transforme olan bakteriler ampisiline dirençli hale geldikleri için ampisilin içeren besiyerinde üremesi beklenmektedir. Transformasyon sonrası petrilere, her bir oligo için 2 koloni seçilerek plazmit izolasyonu için kullanıldı (Şekil 17).

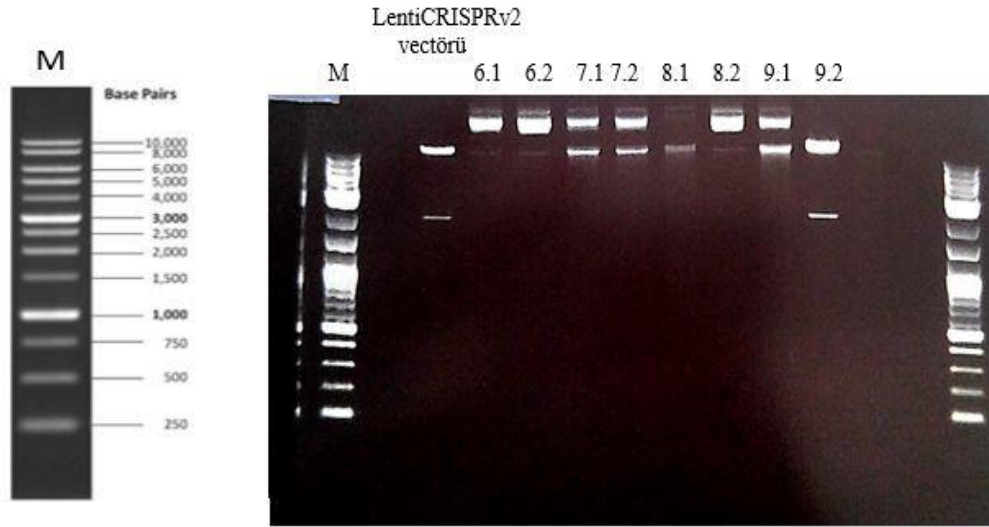


Şekil 17. LB ampisilin agar görüntüsü

CD80 ve CD86'nın her biri için 2'şer oligonükleotit tasarlanmıştır. Plazmit vektörlerin isimlendirilmesi 6(CD80-A2) - 7(CD80-B1) - 8(CD86-A1) - 9(CD86-A2) şeklinde yapıldı. Her bir oligonükleotit için de 2 koloni alındığı için 6.1/6.2 - 7.1/7.2 - 8.1/8.2 - 9.1/9.2 olarak kodlandı.

Plazmitler izole edildikten sonra dubleks haline getirilen oligonükleotitlerin plazmit DNA'sına entegre olduğunu göstermek için, plazmit DNA'sı BsmBI restriksiyon enzimi ile kesildi. Eğer vektör oligoyu aldıysa BsmBI kesim bölgesi bozulmakta ve kesimin gerçekleşmemesi beklenmektedir.

Kesilen örneklerden de 6.1/6.2 - 7.1/7.2 - 8.1/8.2 - 9.1 de kesim gerçekleşmiş olup klonlamanın başarılı olduğu düşünüldü. Altta çıkan kısa bantların oligoyu almamış plazmitler olabileceği düşünüldü. 9.2 de ise kesim gerçekleşmemiş olup klonlamanın başarısız olduğu sonucuna varıldı.

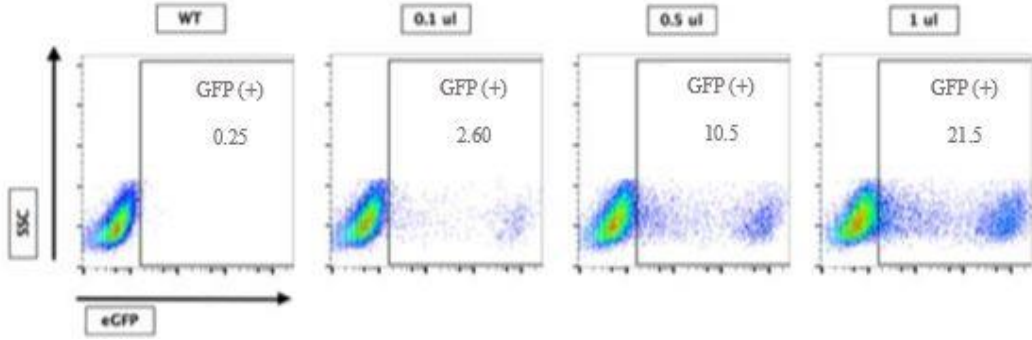


**Şekil 18.** Ligasyon yapılmış LentiCRISPRv2 vektörünün %1'lik jel görüntüsü. Pozitif kontrol olarak kullandığımız LentiCRISPR vektöründe kesim gerçekleşti. M: Moleküler ağırlık marker (New England Biolabs inc.,USA).

Sekans hizmeti alınarak klonlama doğrulanmıştır.

#### 4.4. Virüs Üretimi ve Akan Hücre Ölçer Sonuçlarının Değerlendirilmesi

3.6. da anlatıldığı gibi virüs üretimi yapıldıktan sonra 3.8.1. de anlatıldığı gibi üretilen virüslerin titrasyonu yapıldı. 48 saatlik inkübasyondan sonra analizler yapıldı ve sonuçlar FlowJo (Tree Star Inc., USA) programı ile analiz edildi, üretilen virüs partikülü sayısı 3.8.2. de anlatıldığı gibi hesaplandı.



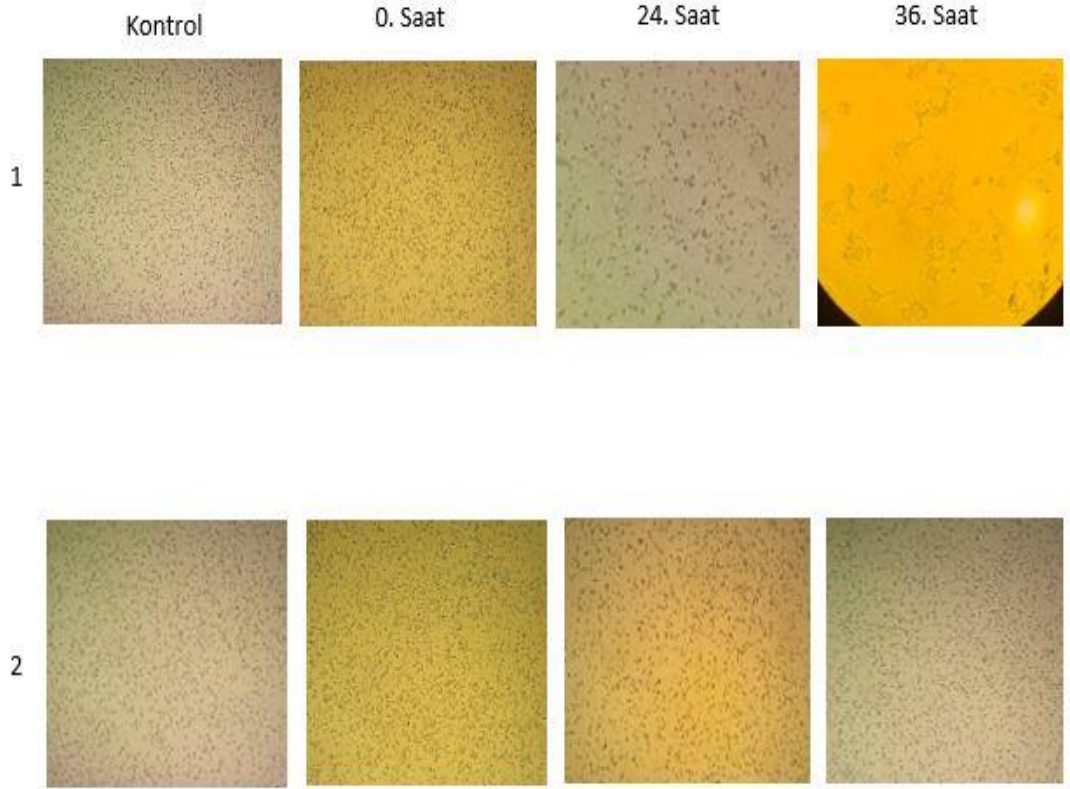
Şekil 19. Akan hücre ölçer sonuçlarının görüntüsü

Çizelge 1. Akan hücre ölçer analizi sonucunda üretilen virüs parikülü sayısının hesaplanması.

Virüs Miktarı ( $\mu\text{L}$ )	GFP <sup>+</sup> Hücre Sayısı	1 mL'deki Virüs Partikülü Sayısı
0.1	$50.000 \times 2.60 / 100 = 1300$	$1300 \times 10.000 = 13 \times 10^6$
0.5	$50.000 \times 10.5 / 100 = 5250$	$5250 \times 2000 = 10.5 \times 10^6$
1	$50.000 \times 21.5 / 100 = 10750$	$10750 \times 1000 = 10.7 \times 10^6$

#### 4.5. Raw 264.7 Hücrelerine Gen Transfeksiyon Etkinliğinin Saptanması

Raw 264.7 hücrelerinin CRISPR virüsleri ile transdükte edilip edilmediğini test etmek için hücreler puromisin seleksiyonuna tabi tutulmuştur. Seleksiyon sonucu CRISPR vektörünü alan hücreler hayatta kalırken almayan hücreler ölmüştür (Şekil 20).



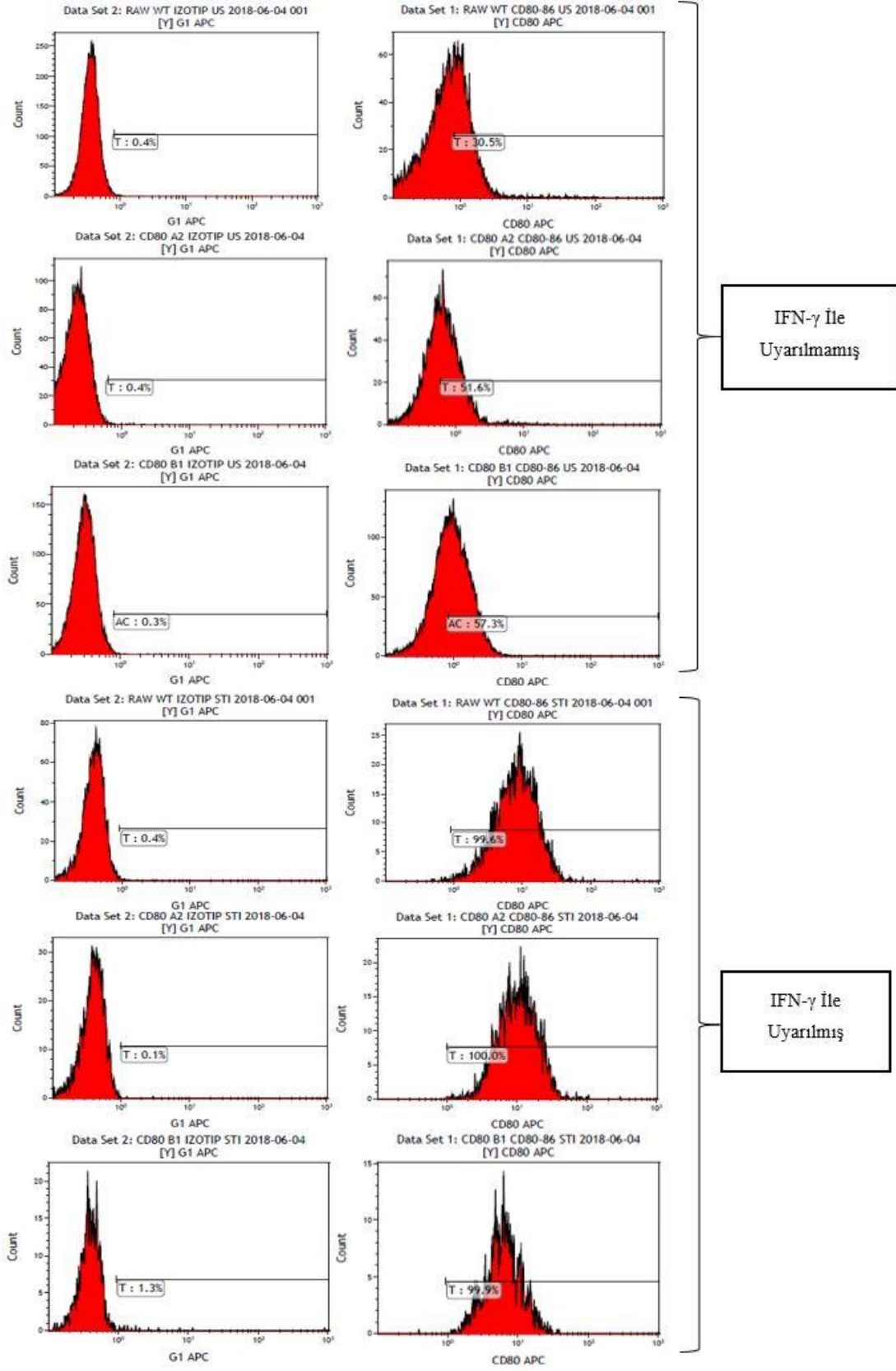
**Şekil 20.** Transfeksiyon sonrası puromisin seleksiyonuna tabi tutulan Raw 264.7 hücrelerinin görüntüsü. (1) Seleksiyon sonucunda ölen hücrelerin görüntüsü, (2) Seleksiyon sonucunda hayatta kalıp çoğalmaya devam eden hücreler.

#### 4.6. CD80 ve CD86 Susturulmasının Akan Hücre Ölçer ile Değerlendirilmesi

Seleksiyon sonrası hayatta kalan hücrelerde CRISPR sisteminin CD80 ve CD86'yı susturup susturmadığını test etmek için akan hücre ölçer cihazı ile Raw 264.7 hücrelerindeki CD80 ve CD86 ifadelerindeki değişiklikler değerlendirildi.

Genetik olarak düzenlenmiş Raw 264.7 hücrelerinde CD80 ifadelerindeki değişiklikler değerlendirildiğinde (Şekil 21); herhangi bir viral vektörle transduksiyon yapılmamış Raw 264.7 (WT) hücrelerinde %30,5 CD80 ifadesinin IFN- $\gamma$  ile uyarılmayı takiben %99,6'ya kadar arttığı; G2 Puro (boş vektör) virüsü ile transdükte edilmiş uyarılmamış hücrelerde %41,9 olan CD80 ifadesinin IFN- $\gamma$  uyarımı ile %98,1'e yükseldiği; CD80 A2 CRISPR vektörü ile transdükte edilmiş ve IFN- $\gamma$  ile uyarılmamış hücrelerde CD80 ekspresyonu %51,6 iken uyarılmayı takiben %100 olduğu; CD80 B1 CRISPR vektörü ile transdükte edilmiş uyarılmamış hücrelerde %57,3 olan CD80 ifadesinin IFN- $\gamma$  ile uyarılmayı takiben %99,9 olduğu görülmüştür.

Ayrıca, CD86 A1 veya CD86 A2 CRISPR vektörleri (uygunsuz vektörler) ile transdükte edilmiş uyarılmamış hücrelerde sırasıyla %50 ve %65,6 olan CD80 ifadesinin IFN- $\gamma$  ile uyarılmayı takiben sırasıyla %97,5 ve %99,5 olduğu gözlenmiştir.

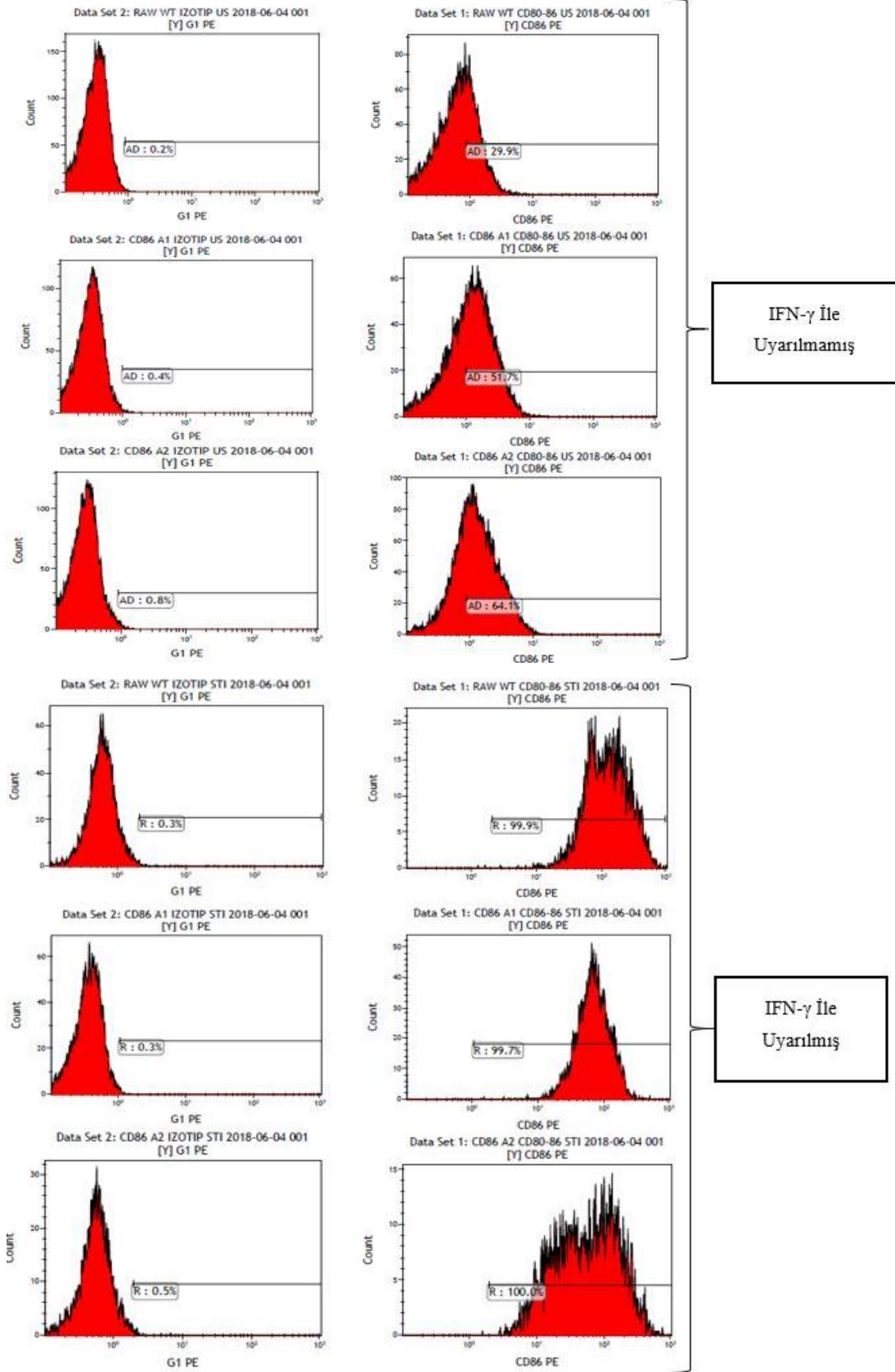


Şekil 21. CD80 A2 ve CD80 B1 primerlerinin klonlandığı CRISPR vektörü ile transfekte edilmiş stimüle Raw 264.7 hücrelerinin sonuçları



Genetik olarak düzenlenmiş Raw 264.7 hücrelerinde CD86 ifadelerindeki değişiklikler değerlendirildiğinde (Şekil 22); herhangi bir viral vektörle transdüksiyon yapılmamış Raw 264.7 hücrelerinde (WT) %29,9 olan CD86 ifadesinin IFN- $\gamma$  ile uyarılmayı takiben %99,9'a kadar arttığı; G2 Puro (boş vektör) virüsü ile transdükte edilmiş uyarılmamış hücrelerde %41,1 olan CD86 ifadesinin IFN- $\gamma$  uyarımı ile %99,9'a yükseldiği; CD86 A1 CRISPR vektörü ile transdükte edilmiş ve IFN- $\gamma$  ile uyarılmamış hücrelerde CD86 ekspresyonu %51,7 iken uyarılmayı takiben %99,7 olduğu; CD86 A2 CRISPR vektörü ile transdükte edilmiş uyarılmamış hücrelerde %64,1 olan CD80 ifadesinin IFN- $\gamma$  ile uyarılmayı takiben %100 olduğu görülmüştür.

CD80 A2 veya CD80 B1 CRISPR vektörleri (uygunsuz vektörler) ile transdükte edilmiş uyarılmamış hücrelerde sırasıyla %48,6 ve %66.1 olan CD86 ifadesinin IFN- $\gamma$  ile uyarılmayı takiben sırasıyla %99,9 ve %99,8 olduğu gözlenmiştir.



Şekil 22. CD86 A1 ve CD86 A2 primerlerinin klonlandığı CRISPR vektörü ile transfekte edilmiş stimüle Raw 264.7 hücrelerinin sonuçları

Özet olarak, bu tez çalışmasında CRISPR/Cas9 gen düzenleme teknolojisi kullanılarak CD80 ve CD86 genlerinin susturulamadığı görülmüştür.

Ayrıca, CRISPR'la transdükte edilmiş ve ve IFN- $\gamma$  ile uyarılmamış hücrelerde CD80 ve CD86 ekspresyonunun IFN- $\gamma$  ile uyarılmamış WT Raw 264.7 hücrelerine kıyasla beklenmedik şekilde daha yüksek olduğu gözlenmiştir. CRISPR'la transfekte edilmiş ve ve IFN- $\gamma$  ile uyarılmış hücrelerde CD80 ve CD86 ekspresyonunun ise IFN- $\gamma$  ile uyarılmış WT Raw 264.7 hücrelerle benzer düzeyde olduğu görülmüştür.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Normal şartlarda, immün sistemin en belirgin özelliklerinden biri, çok sayıda değişik patojen mikroba karşı yanıt oluştururken, bireyin öz antijenlerine karşı yanıt oluşturmamasıdır (Abbas ve ark., 2014). Bağışıklık sisteminin antijene karşı tepkisiz olduğu bu duruma immün tolerans denir (Sykes, 2007). İmmün sistem normal işleyişi içinde birçok öz antijene kolaylıkla erişebilmektedir. Bu durum öz antijenlere yönelik immün yanıtların oluşmasını önleyecek mekanizmaların varolmasını zorunlu kılmaktadır. Bu mekanizmalardan biri de anerjidir.

Anerji, T hücrelerinin tam etkinleşmesi için gereken eş uyaran sinyalinin yetersiz olduğu durumda gerçekleşir. Burada, T hücreleri ASH'lerce sunulan antijenleri tanı ancak beraberinde eş uyaran sinyali alamazlar ve böylece T hücreleri yaşamlarını devam ettirseler bile aktif hale geçip antijene yanıt veremezler. Böylece T hücreleri tanıdıkları öz antijene karşı yanıt vermezler. Böylece T hücreleri tanıdıkları öz antijene karşı yanıt vermezler. Bu ve diğer tolerans mekanizmalarında bir bozukluk ya da yetersizlik olursa, öz antijenlere yönelik immün yanıtların oluşması engellenemediği için, immün sistem bireyin kendi hücre ve dokularına saldırabilir. Gerçekleşen bu duruma otoimmünite, neden olduğu hastalıklara ise otoimmün hastalıklar denir (Abbas ve ark., 2014).

Özellikle son 30 yılda, otoimmün hastalıkların görülme sıklığı ve prevalansında ciddi artışlar görüldü (Lerner ve ark., 2016). Seksen farklı tipte sınıflandırılan bu hastalıklar batı nüfusunun %5'ini etkilerken dünya çapındaki etki alanı tam olarak bilinmemektedir (Laxminarayana, 2017).

Çalışmada kullanılan gen düzenleme tekniği CRISPR/Cas9, son yıllarda tıp ve biyoloji alanında devrim niteliğindeki bir teknik haline gelmiştir (Ratan ve ark., 2018). CRISPR/Cas9 sistemi, genom içerisinde sadece belirli bir sekansı hedeflemek için Cas9 proteiniyle bir kompleks haline gelen bir kılavuz RNA (gRNA) kullanan çok yönlü bir araçtır.

Bugüne kadar gen düzenlemede tercih edilen ZFN ve TALEN sistemlerine kıyasla CRISPR/Cas9, genom mühendisliğinde kullanılan en güçlü ve hızlı araç olma özelliğine sahiptir. ZFN ve TALEN sistemlerinde hedeflenecek sekansın bulunması protein-DNA etkileşimleriyle sağlanmaktadır ve bu etkileşimin hedef DNA dizisi üzerindeki küçük değişikliklere karşı hassasiyetinin nispeten düşük olması sebebiyle benzer dizideki hedef olmayan bölgelere bağlanması, dolayısıyla yüksek “off-target” etki görülmesi mümkündür.

Buna kıyasla, CRISPR/Cas9 sisteminde hedef sekansın bulunması Cas9 ile kompleks halindeki gRNA ile genom arasında baz eşleşmesi sayesinde gerçekleştiği için çok daha spesifik etki göstermekte ve daha düşük “off-target” etki göstermektedir. Gelişmiş CRISPR/Cas9 teknolojisi sadece biyolojik soruların derinlemesine araştırılması için moleküler bir araç olmakla kalmaz, aynı zamanda biyolojinin yenilikçi ve pratik uygulamalarının geliştirilmesine de olanak sağlar (Ding ve ark., 2016). Sistem hücre hatlarında, organlarda ve hayvanlarda genetik modifikasyonlardan genom taramasına kadar çeşitli amaçlar için kullanılabilir (Chen ve ark., 2016).

Günümüzde potansiyel tolerans geliştirme stratejileri arasında CD80 ve CD86 ifadelerinin baskılanması yeni hedeflerden biri haline gelmiştir.

İnsan dendritik hücrelerinde, modifiye edilmiş bir sitotoksik T lenfosit antijen 4 (CTLA4) molekülünü (CTLA4-KDEL) kodlayan plazmit ile transfekte ederek B7 moleküllerinin ekspresyonunu inhibe edildiği bir çalışmada dendritik hücre yüzeylerinde CD80/86 ekspresyonu baskılanmış ve bunun sonucunda T hücre anerjisinin geliştiği görülmüştür (Tan ve ark., 2005)

Alerjik cilt hastalarında yapılan bir çalışmada periferik dokulardaki dendritik hücrelerde, siRNA aracılığı ile CD86'nın susturulmasının, dendritik hücrelerin göçünü engellediği ve antijene özgü lokal enflamasyonun azaldığı görülmüştür. Ayrıca, bu hastaların klinik belirtilerinde belirgin bir iyileşme sağlandığı ve antijen spesifik interlökin-4 (IL-4), serum immünoglobülin E (IgE) ve IgG1 seviyelerinin de düştüğü gözlenmiştir. Bu çalışma CD86 siRNA ile periferik dokulardaki dendritik hücrelerin hedeflenmesinin, alerjik cilt hastalığının tedavisinde ümit verici bir strateji olabileceğini göstermektedir (Ritprajak ve ark., 2008).

Yapılan başka bir çalışmada, fare dendritik hücrelerinde CD80 ve CD86 gen ekspresyonunun siRNA aracılığı ile baskılandığı ve bu yaklaşımın allograft reddi için potansiyel bir terapötik araç olduğu rapor edilmiştir (Gu ve ark., 2006).

Pankreas adacık hücre naklinde CD80 molekülünün transplant toleransındaki etkisini görmeyi amaçlayan bir çalışmada, dendritik hücrelerde, CD86 geni siRNA kullanılarak susturulmuş olup sadece CD80 ekspresyonunun olduğu bu süreçte dendritik hücrelerde IL-2 ve IFN- $\gamma$ 'nın ekspresyonu düşerken IL-10, TGF- $\beta$  ve IDO gibi toleransı destekleyen faktörlerin ekspresyonlarının arttığı gözlenmiştir. Ayrıca, pankreas adacık nakli yapılan diyabetik farelere CD86 ekspresyonu baskılanmış dendritik hücrelerin transferinin, nakil edilen adacık hücrelerinin yaşam süresini arttırdığı görülmüştür (Ke ve ark., 2016).

Bizim tez çalışmamızdaki amaç ise profesyonel antijen sunan hücrelerden biri olan makrofajlarda, eş uyaran molekülleri olan CD80 ve CD86 genlerinin CRISPR/Cas9 gen düzenleme tekniği ile susturarak *de novo* CD80 ve CD86 ifadelerini baskılamaktır. Böylece, T hücrelerinde anerjinin tetiklenmesi ve sonucunda otoimmün hastalıklarda toleransın geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Bu stratejinin sadece otoimmün hastalıkların tedavisinde değil organ nakillerinde graft reddini engellemeye yönelik olarak kullanılabilmesi de düşünülmektedir.

CRISPR/Cas9 vektörü ile gen aktarımı yapılan hücreler, kontrol vektörleriyle gen aktarımı yapılmış hücrelerle kıyaslandığında benzer oranlarda CD80 ve CD86 ekspresyonu olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre, çalışmalarımızda test edilen gRNA dizileriyle CRISPR/Cas9 sistemi kullanarak makrofajlarda CD80 ve CD86 genlerinin susturulamadığı görülmüştür.

Tüm avantajlarına rağmen CRISPR/Cas9 sisteminin başarısız olabildiği örnekler de vardır. CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak yapılan çalışmalarda başarısızlığın önemli nedenlerinden biri olarak Cas9 proteininin, kesim yapılan DNA'ya sürekli bağlanması gösterilmiştir. Cas9 proteini DNA'ya bağlı kaldığında DNA tamir enzimlerinin bu bölgeye erişemediği ve dolayısı ile DNA onarımını yapamadığı görülmüştür. Ayrıca, bu bölgeye bağlı kalan Cas9 DNA'da başka kesimlerde yapamamakta ve CRISPR sisteminin verimliliği düşmektedir.

Bu durum CRISPR/Cas9'nın %15 oranında gen modifikasyonlarında başarısız olmasına sebep olur. Rastgele gerçekleşen bu durumun neden kaynaklandığı ise henüz ortaya konulamamıştır (Clarke ve ark., 2018). Çalışmalarımızda kullanılan lentiviral CRISPR/Cas9 sisteminde Cas9 proteini ve gRNA dizileri geçici olarak değil sürekli ifade edilmektedir. Bu sebeple sürekli ifade edilen Cas9'un hedeflendiği diziyeye bağlanıp sürekli olarak bloke etmesi yukarıda bahsedildiği gibi olası bir senaryodur. Öte yandan, bu tip etkiler kullanılan gRNA dizisine göre değişebileceği için yeni bir gRNA tasarımıyla CD80 ve CD86 genleri üzerinde şimdiye kadar hedeflenmeye çalışılan dizilerden daha farklı diziler hedeflenerek bu etkinin üstesinden gelinmesi de mümkün olabilir.

Ayrıca, CRISPR/Cas9 sisteminin *in vivo* uygulamalarda da etkisiz olabildiği gösterilmiştir. Bunun en önemli nedeninin Cas9 proteinine karşı gelişen antikorlar olduğu rapor edilmiştir. Cas9 proteini temelde, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ve *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) bakterilerinden türetilmiştir. Bu iki bakteri türünün insan popülasyonunda yüksek frekanslarda enfeksiyonlara neden olduğu gerçeğine dayanarak yapılan bir çalışmada, bu bakterilerden üretilen Cas9 homologlarına karşı insanda, önceden var olan edinsel bağışıklık tepkilerinin olup olmadığı araştırılmıştır. Çalışma sonucunda CRISPR'a karşı edinsel immün yanıtın olabileceği doğrulanmıştır.

Araştırmacılar yaptıkları taramalarda, katılımcıların %79'unun *S. aureus*'tan türetilmiş Cas9'a karşı, katılımcıların %65'inin ise *S. pyogenes*'den türetilen Cas9'a karşı antikor ürettiğini keşfetmiştir. Ayrıca, insan periferik kanında bu Cas9'lara karşı antijene spesifik T hücrelerinin varlığı araştırıldığında, donörlerin %46'sında *S. aureus*'tan türetilmiş Cas9'a yanıt veren T hücreleri bulundu. Bu veriler, insanlarda Cas9'a karşı önceden var olan humoral ve hücrel edinsel bağışıklık yanıtlarının var olduğunu, CRISPR-Cas9 sisteminin klinik denemelerinde bu durumun dikkate alınması gereken bir faktör olduğunu göstermektedir (Charlesworth ve ark., 2018).

Mühendislik nükleazlarının genomda hedef dışındaki aktiviteleri, anormal gen ekspresyonu, hücre ölümü veya onkogenezele sonuçlanabilecek mutasyonlar, inversiyonlar veya translokasyonlara neden olabilir. Bu nedenle, mühendislik nükleazlarının hedef dışı etkilerini en aza indirmek çoğu zaman gereklidir ve hedef dışı etkileri azaltarak veya ortadan kaldırarak genomik riski en aza indirir (Lee ve ark., 2016).

İnsanda CRISPR/Cas9 aracılı gen düzenlemesinin etkilerini araştırmak amacıyla zigotlarda yapılan bir çalışmada, CRISPR'ın hedef dışı etkileri sonucu mozaik embriyolar elde edildi. Araştırmacılar CRISPR/Cas9'nun klinik uygulamalarına geçilmeden önce, sistemin kalitesinin ve özgüllüğünün daha da iyileştirilmeye ihtiyaç olduğunu vurgulamaktadır (Liang ve ark., 2015).

Yapılan çalışmalarda metillenmiş DNA ve kapalı kromatinlerinde CRISPR/Cas9 etkinliğinde oldukça etkili olduğu ve sistemin verimliliğini etkilediği görülmüştür (Wu ve ark., 2014).

Literatürde CRISPR/Cas9 ile CD80 ve CD86 genleri üzerinde yapılan herhangi bir çalışma bulunmadığından sistemin başarısızlığı hakkında fazla bilgi bulunmamaktadır. Her ne kadar çalışmamızda CD80-CD86 genlerinin susturulmadığı görülmüş olsa da, sorunu çözmeye yönelik ileri çalışmalarla CRISPR/Cas9 sistemi ile eş uyaran sinyali engellenebilir. Buna yönelik olarak, CD80 ve CD86 susturulması için farklı gRNA dizileri dizayn edilerek bunların susturmak aktivitesi yeniden test edilebilir. Bu yaklaşım, uygulanabilirliği gösterilebildiği takdirde otoimmün hastalıklarının tedavisi ve organ reddinin engellenmesi için etkin bir tedavi stratejisi olabilecek potansiyele sahiptir.



## 6. KAYNAKLAR

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S et al (2014) Basic immunology : functions and disorders of the immune system (Temel immünoloji : İmmün sistemin işlevleri ve bozuklukları). Çeviren CAMCIOĞLU Y, DENİZ G, 4. Baskı, Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, s: 31-172.

Adema GJ (2009) Dendritic cells from bench to bedside and back. Immunology Letters 122: 128-130.

Addgene, Third Generation Lentiviral Plasmids.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen Recognition and Innate Immunity. Cell 124: 783-801.

Ashman R (2012) Leucocytes: Methods and Protocols. 1nd edition, Humana Press, USA, pp: 139-156.

Banchereau J, Briere F, Caux C et al (2000) Immunobiology of Dendritic Cells. Annual Review of Immunology 18: 767-811.

Barrangou R, Fremaux C, Deveau H et al (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science 315: 1709-1712.

Beckman Coulter (2000) Navios EX Software. Viewing and Analyzing Flow Cytometer data, USA.

Beckman Coulter (2000) Kaluza Analysis Software v2.1. Viewing and Analyzing Flow Cytometer data, USA.

Bozok Çetintaş V, Kotmakçı M, Tezcanlı Kaymaz B (2017) From the Immune Response to the Genome Design; CRISPR-Cas9 System: Review. Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences 37: 27-42.

Chaplin DD (2010) Overview of the immune response. The Journal of allergy and clinical immunology 125: 3-23.

Charlesworth CT, Deshpande PS, Dever DP et al (2019) Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. Nature Medicine 25: 249-254.

Chen S, Sun H, Miao K et al (2016) CRISPR-Cas9: from Genome Editing to Cancer Research. International journal of biological sciences 12: 1427-1436.

Clarke R, Heler R, MacDougall M et al (2018) Enhanced Bacterial Immunity and Mammalian Genome Editing via RNA-Polymerase-Mediated Dislodging of Cas9 from Double-Strand DNA Breaks. *Molecular cell* 71: 42-55.

Ding Y, Li H, Chen L et al (2016) Recent Advances in Genome Editing Using CRISPR/Cas9. *Frontiers in plant science* 7: 703.

Elhelu MA (1983) The role of macrophages in immunology. *Journal of the National Medical Association* 75: 314-317.

Flaherty DK (2012) *Immunology for Pharmacy*. Elsevier Press, China, pp:37

Gu X, Xiang J, Yao Y et al (2006) Effects of RNA Interference on CD80 and CD86 Expression in Bone Marrow-derived Murine Dendritic Cells. *Scandinavian Journal of Immunology* 64: 588-594.

Hekim N, Alkan Ş (2017) *Bağışıklık Bilimi*. Nobel tıp Kitabevleri, İstanbul, s: 52-452.

Hirsch D, Ponda P (2015) Antigen-based immunotherapy for autoimmune disease: current status. *ImmunoTargets and therapy* 4: 1-11.

Ishino Y, Krupovic M, Forterre P (2018) History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *Journal of bacteriology* 200: 8-17.

Jumuddin F (2018) Cell count using haemocytometer, *Semantic Scholer*.

Ke N, Su A, Huang W et al (2016) Regulating the expression of CD80/CD86 on dendritic cells to induce immune tolerance after xeno-islet transplantation. *Immunobiology* 221: 803-812.

Kick L, Kirchner M, Schneider S (2017) CRISPR-Cas9: From a bacterial immune system to genome-edited human cells in clinical trials. *Bioengineered* 8: 280-286.

Kim SY, Solomon DH (2010) Tumor necrosis factor blockade and the risk of viral infection. *Nature Reviews Rheumatology* 6: 165-174.

Krauthammer Lab. (2007) Yale University, T-cell activation.

Laxminarayana D (2017) Is Tolerance Broken in Autoimmunity?. *Clinical medicine insights. Pathology* 10: 20-28

Lee CM, Cradick TJ, Fine EJ et al (2016) Nuclease Target Site Selection for Maximizing On-target Activity and Minimizing Off-target Effects in Genome Editing. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 24: 475-487.

- Lerner A, Jeremias P, Matthias T (2016) The World Incidence and Prevalence of Autoimmune Diseases is Increasing. *International Journal of Celiac Disease* 3: 151-155.
- Levinson W (2010) Review of medical microbiology and immunology, 11nd edition McGraw-Hill Companies, USA, pp: 375-396.
- Liang P, Xu Y, Zhang X et al (2015) CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triprounuclear zygotes. *Protein & Cell* 6: 363-372.
- Lleo A, Invernizzi P, Gao B et al (2010) Definition of human autoimmunity autoantibodies versus autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews* 9: 259-266.
- Luther DC, Lee YW, Nagaraj H et al (2018) Delivery approaches for CRISPR/Cas9 therapeutics in vivo: advances and challenges. *Expert Opinion on Drug Delivery* 15: 905-913.
- Mackay IR (2001) Topics in Review: Tolerance and autoimmunity. *Western Journal of Medicine* 174: 118.
- Maeder ML, Gersbach CA (2016) Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 24: 430-446.
- Mahmoudiansani M, Farnoosh G, Mahdavezhad A et al (2018) CRISPR genome editing and its medical applications. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 32: 286-292.
- Male D, Brostoff J, Roth D et al (2008) Immunology (İmmünoloji). Çeviren: İMİR T, 7. baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, s: 145-345.
- Mellman I (2013) Dendritic Cells: Master Regulators of the Immune Response. *Cancer Immunology Research* 1: 145-149.
- Murphy K, Weaver C (2016) Janeway's Immunobiology, 9th edition, Garland Science, USA, pp: 643.
- Naranjo Gómez M, Raich Regué D, Oñate C et al (2011) Comparative study of clinical grade human tolerogenic dendritic cells. *Journal of translational medicine* 9: 89.
- Owen RD (1945) Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins. *Science* 102: 400-401.
- Patterson CC, Dahlquist GG, Gyürüs E et al (2009) Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989–2003 and predicted new cases 2005–20: a multicentre prospective registration study. *The Lancet* 373: 2027-2033.

Qi LS, Larson MH, Gilbert LA et al (2013) Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* 152: 1173-1183.

Ratan ZA, Son Y, Haidere MF et al (2018) CRISPR-Cas9: a promising genetic engineering approach in cancer research. *Therapeutic advances in medical oncology* 10: 150-161.

Ritprajak P, Hashiguchi M, Azuma M (2008) Topical Application of Cream-emulsified CD86 siRNA Ameliorates Allergic Skin Disease by Targeting Cutaneous Dendritic Cells. *Molecular Therapy* 16: 1323-1330.

Rosenblum MD, Remedios KA, Abbas AK (2015) Mechanisms of human autoimmunity. *The Journal of clinical investigation* 125: 2228-2233.

Sánchez Rivera FJ, Jacks T (2015) Applications of the CRISPR–Cas9 system in cancer biology. *Nature Reviews Cancer* 15: 387-393.

Sharpe AH, Freeman GJ (2002) The B7–CD28 superfamily. *Nature Reviews Immunology* 2: 116-126.

Sprent J (1995) Antigen-presenting cells. Professionals and amateurs. *Current biology* 5: 1095-1097.

Stockinger B (1999) T lymphocyte tolerance: from thymic deletion to peripheral control mechanisms. *Advances in immunology* 71: 229-265.

Sykes M (2007) Immune tolerance: mechanisms and application in clinical transplantation. *Journal of Internal Medicine* 262: 288-310.

Takata M, Sasaki MS, Sonoda E et al (1998) Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO Journal* 17: 5497-5508.

Tan PH, Yates JB, Xue S et al (2005) Creation of tolerogenic human dendritic cells via intracellular CTLA4: a novel strategy with potential in clinical immunosuppression. *Blood* 106: 2936-2943.

Thurtle Schmidt D, Lo T (2018) Molecular biology at the cutting edge: A review on CRISPR/CAS9 gene editing for undergraduates. *Biochemistry and molecular biology education* 46: 195-205.

Tree Star Inc., FlowJo v10. Viewing and Analyzing Flow Cytometer data, USA

Turvey SE, Broide DH (2010a) Chapter 2: Innate Immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology* 125: 24.

Turvey SE, Broide DH (2010b) Innate immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology* 125: 24-32.

Wraith DC (2017) The Future of Immunotherapy: A 20-Year Perspective. *Frontiers in immunology* 8: 1668.

Wu X, Kriz AJ, Sharp PA (2014) Target specificity of the CRISPR-Cas9 system. *Quantitative biology* 2: 59-70.

Wynn TA, Chawla A, Pollard JW (2013) Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496: 445-455.

Zhang F (2014) Addgene Full Sequence Map for lentiCRISPRv2, Addgene.

## SİMGELER ve KISALTMALAR

### Simgeler

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
$\gamma$	Gamma
$\mu\text{g}$	Mikrogram
$\mu\text{m}$	Mikrometre
$\mu\text{L}$	Mikrolitre

### Açıklama

### Kısaltmalar Açıklama

Bç	Baz çifti
$\text{CaCl}_2$	Kalsiyum klorür
CD	Farklılaşma Kümesi
$\text{CO}_2$	Karbon dioksit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DNA	Deoksiribonükleik asit
ddH <sub>2</sub> O	Duble Distile Su
DTT	Dithiothretiol solüsyon
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik asit
g	Gravite
GFP	Yeşil Floresan Protein
IFN- $\gamma$	İnterferon Gamma
IL-	İnterlökin
IDO	İnsan indolamine 2,3-dioksijenaz
LB	Luria Bertani
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
mm	Milimetre
mg	Milligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribo Nükleik Asit
Rpm	Dakikada devir
sn	Saniye
TBE	Tris-Borik Asit-EDTA
TGF- $\beta$	Transforme Edici Büyüme Faktörü- $\beta$
u	Ünite

## **EKLER**

### **EK 1: Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanması**

#### **1. Agaroz Jel Hazırlanması**

Öncelikle jel döküm tablasının boyutları (jel kalınlığı da dikkate alınarak) ölçülür ve hacmi belirlenir. Hazırlanmak istenen yüzde konsantrasyona göre (örn. %1'lik), belirlenen hacim için gereken miktar agaroz dikkatli bir şekilde tartılır ve erlen içine konur. Üzerine hesaplanan hacimde 1X TBE tamponu (1 hacim 5X TBE üzerine 4 hacim saf su ilave edilerek hazırlanır) konarak ateş üzerine alınır ve eritilir (3-5 sn kaynaması yeterlidir). Ateşten alınan jel üzerine son konsantrasyon 0,5 µg/mL olacak şekilde stok etidyum bromür. Solüsyonundan ilave edilir. Jel sıcaklığı 48°C'ye geldiğinde hazırlanan jel kabına dikkatli bir şekilde, hava kabarcığı oluşturmadan dökülür ve yaklaşık 40 dakika beklenerek donması sağlanır. Jel elektroforez tankına alınır ve üzeri örtülene kadar 1X TBE tamponu ilave edilir. Kuyucuk oluşturmak için yerleştirilen tarak dikkatli bir şekilde çıkartılır. Jel, örneklerin yüklenmesine ve elektroforeze hazırdır.

#### **2. LB Besi Ortamı Hazırlanması**

1 litre için

Yeast extract: 5 gr

Bacto tryptone: 10 gr

NaCl: 10 gr

Yukarıda verilen miktarlar 1 litre içindir. Hazırlanacak olan hacim için gereken miktar içerik orantılanarak tartılır. Manyetik karıştırıcı üzerinde toplam hacimden biraz az saf su ile çözülür ve pH'sı NaOH ile 7,5'e ayarlanır. Hacim saf su ile tamamlanır ve erlenlere (erlen hacminin 1/10'u oranında) paylaşılır. Erlenlerin ağzı pamukla sıkıca kapatılır ve alüminyum folyo sarılarak otoklavlanır. Oda sıcaklığında uzun süre saklanabilir. Kontaminasyon belirtisi olanlar dökülür.

### **3. LB-Agar Besi Ortamı Hazırlanması**

Hazırlanan sıvı besiyerine %1,5 oranında agar katılır ve aynı şekilde otoklavlanır. Kullanılacak petri kutuları da kağıda sarılarak otoklavlanır. Besiyeri steril kabin içinde petri kutularına paylaşılır ve donduktan sonra streç filmle sarılarak +4°C’de saklanır. Saklama süresi iki haftayı geçmemelidir. Antibiyotik ilave edileceği zaman, son konsantrasyonlar dikkate alınarak besiyeri sıcaklığı yaklaşık 48°C’ye geldiğinde ilave edilir ve zaman geçirmeden petri kutularına paylaşılır. Plakların üzerine ilgili bilgiler yazılarak etiketlenir.



## EK 2: Gen ve Plazmit Sekansları

### 1. Mouse CD80 Geni Sekansı (30401 bç)

TCCCACCTCTCCAGTGCAGGACACTGTTTATACCGTGTGGGAATTGAACTCAGAGCTCCCTGCATGTCAGCTAAGCAT  
TCTACCGACCAAGTCCCATGCCAGTCCCTAACTCCCCAACTTCACTGCTTTTTAAACATACATAACAATCATAACTTGCCC  
TCAGAGCAGTCTCCTGGGGTCTCTTATTCTCAAGGCTGCGGCATTCCAACACTGTTAGAAAAACACCATCAGGATTCTTTT  
GTGTTTCTAGATGCAAAACATTTTTGTAGGGCGAAGTTGAGGTTTTTCTAATCAAGAAAATGCCGGTAACAAGTCTCTTCA  
AGCTAACTGGTTGGCTAAGGGGTATCTCTCCAAAAAGAAGAGATCCACATGTCAGGCCAGTTGTAGGCATGATGTCTGTCT  
CCCTCCCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCT  
AGGGTTTCTTTGTATAGCCCTGGCTGTCTGGAACACTCTGTAGACCAGGCTGGCCTCGAACTCAGAAATCTGCCTCTG  
CCTTACCTCCTGAGTGTGGGAATTAAGGTGTGCACCACCATGCCCGGCTGGGATGTCATTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTT  
TTGATACTTTATGGAAGAAAAAGAAAAGATAGACAAGCCTTTCATGTAATACTCCATAGTCTCAATAAGTGGTGTTCG  
TAACGTGGCTTCTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCT  
TTCTTGGTTTCTGTTTTAAGATATAAAAGAAACCATTTCTAACTAAAAACTGCCCTTGGACAAAATACTTTTGGCAGTC  
ACTCTGTGTCCAGAATGGAATTTAAGCTTTTCATGGCCTAGCTGTAGTGAAGGTTCTCTGCTTTTTTTGGCTGTTGTATGT  
GAAATGGGGTTGGGTGGGAACCACCTCACTGTGTCTAGTGTTAGTCAACCCACCCCGCAAGCAGAATCCTTTTACCCA  
GCTTTTTACCCAGCTGTGCTCACCCGGTGTCTCAGAACAGGCCTGGACAAGTCACCTCCCTAGAGTTCTGGGGACCTTTG  
AGTTGCCCTCATGGCCACACCCTGATTGAGAACTCTCACTCTGTGTAAGATAGAGCTACTGGGGAGTTTTATACCTCAAT  
AGACTCTTACTAGTTTCTTTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCT  
ATCATCTTTAGCATCTGCCGGGTGGATGCCATCCAGGCTTCTTTTTCTACATCTCTGTTTCTCGATTTTTGTGAGCCTAGGA  
GGTGCCTAAGCTCCATTGGCTCTAGATTCTGGCTTTCCCATCATGTTCTCCAAAGCATGGAAGCTATGGCTTGAATT  
GTCAGTTGATGCAGGATACACCCTCTCAAGTTCCATGTCCAAGGCTCATTCTTCTTTGTGCTGCTGATTCTGCTTTTCT  
ACAAGTGTCTTCAGGTAAGGAAAGAACTTTCAGGAACCTGACTTAAGCTCGCTGGGGTTTTGAGGGAGATGATGCTGTCT  
GTGCCGTATCTCTCCATTCACTTTGTGACACTCCCTGTTCCTTTGTGAACTGGAGAGCCCTTCAGAGTATCTCTGGAG  
TACTTTAAAGCTATGAAAGTTCTGGTTCGATGAGGTTAAAGGATGCGGAGGGTCACACAGAAAGTTATACAGCAACTTA  
AAGCAAGAACTTCAACTCTAACACAGAGGTGGGGACATTGCCATTTCAACAACACATAAAACCAACGAGCAGCTTAGAG  
CTGTGGCCTCCTTCATCGCTATTAGATGTTCAATTTACATCTTGTATGTGCCAACAGCGTTGGTCTGGGGTCTGGTTTCCA  
AAGTGCCTTTCTATGATACAACTTAATTAATGTAACCTACCTCTAAGATAATGTTGATCTTTTTCTTTGGGGTGGGGTGGG  
GAATTGAGACACTTCTTAGTATGGAATCTTCTCTTAATATTTCTTCTTAAGTGTGCTTTCTTCTCTGCGCAGCCAAACC  
CAAGATGTAGCACAAAAAATTAGCCTTAAAGATAATTTCTAACGGGCTGTGTGTTTCTTATGATGTTCTTCAAAGAATATTT  
TGTTCTCGATGCATTTCTGCTTCTATGAAGGCAGTCTTACAGAAGCTCACTTCCAGGATTATTCAGAGGGCATGGGAGA  
TCTGTGCAAGCCATGCCTCTATGTACTTGGACCACCATGTCCTGCATTACTATTTTTTAAATGGGGTAGCTGACACATGTA  
ACTTTTTAAGGTCAGAAAAAAAAGATCTGCTTTCTAAGGAGTGGTGTATACATTGGTTTCTCACAAACAAGGAGGAAGC  
TGGACTTCCGAAACCGGACTGTCCGAGGCCCTGCTGTAAGCAGCTCACCCAAAACCTGCCCTGAATATGAAAACT  
GTGAGAGACAAGGAGAGGGCAGGGAGAGGGAGGATGAAAGATGCATAGACCACTGGCTACAAGTAGTGGCAGTTTTAA  
ATTTCTGTCCAAGTTGTGAAACTTAGTTGCAGAACCCAGAGTACCATGACGTAAGTCTCATTACACTTCAGGTTCTG  
GACACGGTTAAATGTCCAATAATAGCCGGGTGTGGTGGCGCACGCCTTAAATCCAGCACTCGGGAGGCAGAGGCAGGC  
GGATTCTGAGTTTGAGGCCAGCCTGGTCTACAAAGTGAGTGCCAGGACAGCCAGGGCTACACAGAGAAACCTGTCTC  
GAAAAACAAAACAAAACAAAACAAAAGTCCAATAATTACATAGTTACAATCTTTTTCTGGAAATTAGGGGGCACC  
CTCAAACTCAAGTCTTCAGGAGAAAGTATAGAAACCCAGAGACTGGGCTGGGAGTGGATGGGTGGGTATTGTGAAAAAC  
TTTCAAAAAGTTAGAGAAGAACTGGCAAAAATTTAAACCAAGCAATTTAAAACCATTCACCAGAAAACTTGGTCAAGAT  
TAAGCCAAAGTGATACATTTTTAGCCATCAGGAAAAGTACTGTGTGCTATGGCTATGCCGGTTCTTTCTGCTCTGAGTCAA  
AAAATAGTCTATGAATATCTTAGCTTTGAATGTCCACCTATCTCAGAGGTTAGTTGAGCCTGAGATTCGTCTCTCAAACA  
AGTTTGCTTATGTAAGTCTGCAGTAACCCCTCAAGAAATAAGGGGGTCTGAGATTCTGTCTCAAACAAGTTTGCT  
TATGTAAGTCTGCAGCTAACCCCTCAAGAATAAAGGGTCTGATTAAGTACTGACTGAGGATCTGAGAAAGGAGGGAGT  
AGGGGGGTTGGAGGAGAAGACCTGACGGAGGCAGATGGCAATGGAGGATTGGGGGGCGGGTATCAGACTGACAGGGT  
CTCATGTAGCCTAGGCTAGCTACCCCTACTCACTAGGTAACGAAGGATGACTTTGAACTTTTGATCTCTGCTCTACCT  
CCTAAATACTAGGATTCTAGACATCTACTACCATGCCAGTTTGTGCAGTATTACAGATCAAACCAAGGGTTTCTTACAT

TCTGGGCAAGCACTTTGCCAGTTGGGCTACATTGAAGCTGTGTGGCTTGTCTTTTGTAAAGCATTGAATTCAACAAATAGCA  
GGCAGTTTCTGGGTACAAAGATGTGTTTGTGGTCTGGGGATAAATTATGAGTCCTTTCTTCATGTAATCCCTAGTCAC  
TGGAAGGAAGAAGACAAGAGATCTTGTAACCATAGCATTAATATGTGACCACTGCAGAGAGGAGAACTTTGAAGAGA  
AGGCATTATTCAGAGGTGCTATTTTCAGTGGCTGGATCACGACCAGAAAGGAGCCAGGCTAGGCTTTACAGTACCATTG  
AAAATCTGAATGTACTCAAATTGTACTGGGGGAGGGTTGGGAGGGTTTTAGAGGGAGGTGGGGTTGGCACTATCTATAT  
ATTATACATATCTAACACCTGGGGGTTTTCTTAAAAGACAGTCTCCAATACAGGGGATTTTTTTTTAGAGAAGTGAAATTAT  
TTTGATAACTATAACGATGTATCTATTATGCATAGATGTTTCAAGCACATATAAAGCACACCTCCTAGAGGGAAACG  
CTAAATCATGACTTTGGGAGATAATGATGTGTCAGAGGAGGTTTCGTGGACTGTAAACAAATGTGTCACCTGTGATATGGGTG  
GCTGCTGAGGAGATGAAGCTGGAAGTCGAGGACAGGATCGGTCTGTGGGAATCCGTCATGCGTGTCTGCCAAATCTGCT  
GGGAACCTAAAACCTGCTCTGATAAATACTTCTGAAATATTTTATGTTTCGGTTTTCTGGAGTCAGGGTCTCACTCTGTTGC  
CCAGGCTGGCCTAGAATTCAGTACGTAGCTCGGTCTTGCCCTTAACTCCCAACTCAGCCTCCAGAGTAGCAAGGCTTAGG  
TCTGTGAGCTACCTACCAGGTCCGGCTTTAAAGCCTTCATTTAGCAGCTGCTGCTTCTTAGGTGGATTGGAATGGGGCTT  
GAGCTTTGGCATCGCTAGGAAGCATGCAAGTGTGCTGAGGCTGGAGAACTGTACCCTCTCATTCGAGTATGAGGTCTGT  
ATGCAAAGGACGGTTAAAGAAAAACAGGAAATGTGGAGCCAGATGTGTTAGCTCAGGTCTGTACTCCCTGATAACTGG  
AGGCTGAGCAGGAGGATCAAAGCATCAAGGCTTCTGGGATAGAGAGTGAACCAAGGCTAACATGGACCATACTTGA  
AATAAAAAACATGGGCTGGAATAAAGCCTGGTGGATAGAGTACTCGCCAGCATAACATGAGGTGCTCGGCTTCATCTCTA  
GTAAGGTATAAGGCACAAGCCTATAATCTTAGCTCTTTGGAGGTATAGACAAGGAGAGAAATTTGGAGTCAATTTCAAGG  
GCATAGTGTAGTTGAGACACGCTTGTAGTTACACGAGTCTTGTCTTGGAAAAAGCGGGGAGGGCACTGAAGATATAGC  
CCAGTGTGGGTGCTAGAGGCTCTGTGTTCAATCCTTGGACTGAGAAAACAAAAATCTTTTGTAGTTGCTGAAGCGTGAG  
GAATGGCTGGTAGAGCAGCCACAGCCATGGTGCAAAAGTCTAACAGGAGGCTGTTTTCTGGAGCCAAATGTATAGGGGA  
TGCAATGGTCTGATGAAAGAAAGGTGTTGGGGGGAGTGGATGGGCTAAGGATGTACAATATGAAGCTGGTGAGGACT  
GGGCAGGTTTTGGTGAGGATGTGGGTGGCCTGTGGTGCCTGGGGTCAAGATCAAGTCAGGTGAAGTAAGATAATACAGA  
ACTGTTTTGGAGTTGGGTGGATGTACTACACCTTCAGTCTGCTCTGGGACAGGAAGCCACACCTGGTGGCATGGTCTC  
CTCTCTCTATTACTCTCCAGCCATCTGTACCCAGAGCAAGTTGGCCTCTTTTCTTTACAAGAGAGAACTCAGCCATATCC  
TCTCTGCCATCAGGTTCAAACAGGGTCTTCTGAGGTAGAAGCACATGACTGTATTCCAGAAAATGGTGGCTAGGAGCAA  
CGAGCATAAATGGGCAGCCTTCCCCCAGGGCTGGGATCCTTAAAGAAATGGCTCAGCTCTAAGGCTGGATAAAAGCTTC  
CTGCGGAAGCCAGCCAATGATGTATTAGGACTCTAGGGTAGAGAAAAAGCTAATGCCTCAAAGTGTACCTCTCATCC  
ATTACACACTGCTGTCAAACAGGACTAGCCAAACGATCTCATGGGTTGTACCTTCTGGCATCATTACCCTGATAATAGT  
GGTCCGAATCTCTTAGCCTTCTTACGAACCTAGAATTTAAGAGAAAAAAATTTTGAAGATCTGATTTCTATAGAATATAA  
GGGCTGTATGTAAGTGGAGAGAACTCAGGGACCAAGACTGAAATCTTCCAGCAGCTCGCATGCCAGCCACATCTTC  
CCTGTGCTACACCCTGAACAGGCCTAATACCAGGCCATGGTATTCACTTAGTGAGAAGCTTAGAAGTACCCATAATAT  
CGCCTCCATAGAAAAGACTGTGCCAAACATCAGCAGTCCCCCATAACAGTACTAACAGAGTGCTTAGCTCTCAAGACC  
AGATGAGACTGGGCACATTTGGTGTGGTAGGGCTGTAGACCATGTATCAGCATTAAATATCTCAGGCTTAGGAGGATA  
GGTGGTCTCATGGCTTTTGTGGCTTGGTTTGTCTCTTTACTCTTCCAAATTAATCTATTTTTTTTTTCTAGTCTGAC  
AAAATGCTTATGGAACAAGCACGTTTATGTGTGCACATCAATCTTATTGAGTTGTTTTGCTTTGTTTTTCTAGTCTGAGG  
ATCAAACCTCAGGGTTTGGCAAGTGATCAACCACCTGGTTAAAAACCTCACCTGGTGGATTGAGATGCTGTGCCAGCTT  
GCTTCTTTATTAGGAGACATGGTGATCCAGTACCAAGACGCTCGCCAGGGGCTGGCTGCCGAGGACGCTCTTCATC  
TGCTTCTGTAGTTAGAATCTAGAAAGGTACATCAGTCTGTGCGGAGAGGAATGCGTTCGTGTGTGTGTGTGTGTGTG  
TG  
TCTCTACGGTGTGGTCTGGGATAGAATTCAGGTTATCAGGTTTAGCATCAAGTGCCTTTACCCCTGAGCCTTCTCA  
CTTGCTTTATTTTACTATTTTTATATCTCCGATTATATTTTCCAATAATATCATAAATATCAGCTTTTAATTTTTTCTTA  
CTCTCATCTAAAACACTCTTTTCTGAAAAATATAAAGCGTGCACATTGATAGCATTCTTTGGTTTAGGTTTGGGCTTTT  
ATTTATATTTATTTATTTATTTAGGTTTGGGCTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTAGAGACAGGGTCTCACTATGTATAGCTCT  
GGCTGACCCAGAACCAATTTGCAGGGTTTTCCCTGTCCAATTACATTAGGGCAGCAGGAGACCTGTGATTGGACAGGGA  
AAAGGCAGATCTAAGAGTTGCAGATAAGAAGAGGAGAGTGTGCCAGAGAGAGGGAGAAGGCAAAATGGAGGCGGATA  
TGAACCCGTGTGGCTTTAACAGCCACAGGTAGCTATGCTATCATAAGGTTGGAAGTATTGGGATAATGCTTTTATCATT  
ATCCATTGGTTCAGAAATATTGTATCGGCATCTTGTAATTTGTGACTTATTGATACATAAATCTGATTGGTTAATTATAA  
GCTTTAAGAGTTTTGATTCTACCAGGTAATGGGTGTGTGGTTGCAGACCATAGGTGGCTGACGGGGTGGACGGACAT  
TACAGTACTGAAGAGAACTCAGGAGCTCTGGCCATCGGAGAGTTGGGTAGAGACAGATCCAGTGAAGCCGAGTGGGG  
CGAGAGTTGCCTGCACATGTGTGGGAATGTGCCATTCTTTTTTTTTTTTTTAAATTTTTCCCAACAACAAATAGGTAGACCC  
AGGTGACCTCAAACCTGAGAGATCTACTGCCTCTGCCTCCCAAGTGCCTGGGTTAAAGGCATGCACCACCATGGCTG  
GCTGACAGCACTTTCAAAGAAAGAAAAACCTACGAAGCCTCTAAGCTGTAAGCCAATCATAATACCACAAACAAACA

AACAAACAAACAAACAAAGCTTGAGTTATCTGAAAGGCTTTAAAATTCACCATTTTAAAGTGAACCACCATTTCATGGGC  
TTTCGTGTCCCATGCTGTTGATGGAGCCATAACTACTCTAGCTTCAGATTATTTTCATGACCTCATACTAGAACATTCA  
GCTGCCATTCTCCATGACATCCCGTCTCATCTCTAGTAACCACTACTCTACTCCCCTCTCTAGGACCATGCCATTCTGG  
GCATTTCTTACAATGCAAGCATGCATCCTATGGTGTGTGTGTCTGTCTGGCTTCTTTCTTTTAAACATTGTTTACAGGGTTC  
ATCTGTGTTGACGTATGTGTTGGAACATCATTTGTCTTAAGAGCTAATAATACACTGCTGTAGTCTGAGTTCTTAAAAGAT  
GTGTGGTTTTGTCTTTAGGTCTGTTGGCTAGAGCGTCTCTCTAGGGGATAGTGGTTGGGAGTTGAGGAAGGAAGGAAGA  
CAGCAAAGGAGTCAAGAAGGCGGGGACTGGGGCTAACTGCTTAGTGTCCCCTGTTTGGCATCCAGAGGCAACTGTAC  
ACAAGTTCATTAGAAGTAAGCAGAGCTGCCTCCTGCTTCTGCCTATTTTCTCTCATAGCCTTGACTCTATCCAGCTGTGA  
CTAGAAGGGGCCAGATGTGCAGCCCAAGCAACTGTGGGCCTTCCATTAGACCACGGGTCAGACAGTTTCTACAGTTCT  
ATTCTGGGTGTGATTAGCAGAGCAGCAAGCCATAACAAGGCCAGAAGAGCCCTATGAAAAACCCACATTAGGGCTGGGG  
ACATGACCCTGGAGGCAAACTTGTGTGCAGCTCTAATGACTCGTTAAGTCTCATAGTCCATGGTGAAGGTCTAAGA  
TCTGACCTCTACCCCGTGGCATGTATCCATCCACCATTACACACATACATAAATAATAAAATGAAACGTGAAAGTAT  
GTGTTTTTAAAAAATCATATACTGTACAGTCAGCAAAGATCCTTGTCTTCTCTAGGATTGCTGTGGCAGTTTTGTA  
CAGTAGGAAAGATAGCACACAGGAGCTGTGAAGTGAACCTGAGACCCAGCAGCATTCTCCAGTTCTTCAGGGTCATGG  
TTCTAACTCATGCTGATCCAAGTCTAATACTTAGTGTGCATTAGCAAGTATCCACTTCATATCTTCTAAGCTAGGCC  
CTGTTCTCAATACTGCAGATGTGGCAATGAACAAAACAGGCAAAGCTGCTCATATGGGCACACATGTCATTTATATATAC  
AAGCATAGATAGGTAGGTAGGTAGGTACGTAGGTACATAGATAGAGGGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATATAT  
AACCTTCCAGGTATAACCTGTATCTGCCAGAGCAAGACTGACGATAAAGCCAAGCATAAGTAGCATATACTTGAATCACA  
GCATTACAGGAGCTGAGGCAGAAAGATTACTCAGTTAAGGCCAGATAAAGAAAGTCTTGATACACAGAGATAAATA  
ACATAACTCATCTCAAAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAATCCAAGCCAAAAAGATTGAAGACAGAC  
ATATCAAGGACAGAGCTATGGAGTGGCTAGACAGATGAAGTTAGGAGGGGCTGTTTGACAAAGAGAGATAGAGAAGAC  
TTTTCTGAGTAGAGAACCAACCCAGACTGGTGTGAACCTGGACCGTGTGGATGGGCCCTGAGGGAGATGTTGGCTT  
AGCTCATATCTCAGGCATGATATGAGATATGGTGAGGAGAGTTAAGTACGGTCTGTTTGAACACTCACTCCTGCTTTGT  
CTGGGGTGTGGAGTGCCAAAGTGGTATACCTGACCAACTCAGAGATCAATACATCTTCCAGGCACTCAGCTCCCCTCCAGA  
GTCACCAACAGGCAAAAAGCCTGACCCGCGTTTCTTCCATTTTTTTTCTCATTTGCTCGGGTATCAGAGTGAAGCCTGG  
TTCTGTGGAACTTCCCGGTCACACAGGAAAGTTCTGATTCTCTTTTTCAGTCTGGTCTTCTCCTCAGCATCAGGGTGTGA  
TGTGTGGGGGCTCAGACAGGAATGGAGAGCAACCCATGGTGTGGCGGCATGACCTTTAGAGAAATCATCCATACTTCTCT  
CCATGTGACTGCACGAACTCTCAGGAGTTGCCGTCGGAAGGAGACGGTTTTACTTTTGCTCATTTGTTTTCTCTCTTGTG  
TCATCGGATGCCAAAAATCTGCCAGAAATATTGCATTCTATGGGGATGGGAACAAGTAGGTCTGAGGAGGGGATACCC  
CACTATTTGGGGCCAAAGAAATGAGCTGTTTCATGTACAATGTTTCATCAGGCCAAGCGAGACCAGAGTGTACACAG  
CTGATAGGATCCCTCAGTGAGATTAAGCAACCAGAGGGCAAGATTTGGGACAGACAGGAGGACAGAAGACACCCCT  
GCATCAGACTGTATGTCAGGATCCCTCTGTCTATGCCATTAATTGAATTTACTTCCACAGTGTCTAGAACGGGCAG  
CTATCACACCCCTTTTACAGCTGAGCTGAGACTAGAATCTAAGTCAATAGGAGCACAAGTCTAGCTCTGTTTTTTTTTTT  
TTTTTTTTTTTTTTTACCTCTGTAGCTTTCTGTATCTCTAAATGTGTCTAGGTCATAGCCTGATCTTTAGCTCTCAAAGCC  
CTCTCAGACTTGTCTTCTACTTCTGTCTAGTTATGACCCGAGTAGGAACTTTGCTCTCAGCAAAGTTGCATAAAGTATAG  
CCTGGGAGCTCAGCGCCTCTGATTAGGAACACAATACTTTCTGTCATGGCTGGCCTGGTAGGAATGTGCCATTGCCCC  
AGATCTTGCTTTCCAGGAGCCGGAGGGCCGGAAATGAGGCTGCACACATGAGTGTCCCAAGGACATCTTTGTGACTC  
TCAGGGTACAAGCAAGCTACGGGCAGATGAGAGCACTGGTACAGGGGCTGAGACCTTGGGCCTTAGAGGGACGCTGCCT  
CTAAGCCACAGGCCAGAGGCTAGTTAGATAAGGAACTTTGTGGTCTTGATACGTGCTAGGAGCTAGTAAGTTGGGGTTT  
AGATATAAAATGTTGGTTTTCTGGGGTATAGTGATGAGGAAACATGCCTGATTGTTTTCTTTAATTTTTAATTTTATATG  
CATGGATCTTTGTATACACCTATATGATGTGTGTGCTAGTACCACAGAGGCCAGAAGATGCCAGGCATTCCCGGACTG  
GAGTCACAGGTGGTTATGAGCCACCTTGTGGTTGCTGGGAATTAGAGAGAAGTCGCTGGAAGAGCAGCCATTGCTCTTA  
ACCACTGAACCATCTCTGCAGCCCCAGGAACTGAGTTTTAAAACAGGCCCTACTTTGAAGATCCGAGCTGTAGGATCACT  
GCACACACAGATGACAGACAGCTGAGACAAAAGACAGGATAGAGGGGCCATCAAGTAGCTAAGAGGGCAGTCATAGCCC  
ACAGATATAAGCAGCAGCCTTGTGAGTGGTTCCAGCCTGAAACCATGAGGTACAGCCCAAGCCTGAAGAGAAAGGACCTC  
TTCTTTTCTATTTTGTGGGTTTTTTTTTTATTTTTATTTTTTTTGTGTTTGTTCATTAGAGACAAGGCTTTTTTGTGGTGT  
AGGCTGGCCTCAAACCTTTGTGTAGGCAATGATACACAAATTTGAACTCCTGGTCTTCTTCTTCTACCTCCCAAGTGT  
TGCCATTATAGCCTCTAGGACCCTTCTTTTTATTGCTTATTTATTTGTATGCACACATGGTACATGTGGAGAGGTCA  
AAGGGCAACTTGACAGGAGCTGTTCTCTCCTTCAAGGATGAAACTCAGGATGCCAGGTCTGTTAGCAGTTGCCTTTACC  
CACTGGCTCTCTTCTGTTGAAAAGCTCAATGGAGCAGCCGGTGGAGCAATGCAGTGTGGCTTCTGTTATTCTGGAAC  
GAATCTAAAACCTAGGCAACCAGTACCTTGGATTCTTCTTGTCACTATAAGTAAATGGCAGGCAAGAGTAACTAGGG  
GAAAGGGTTTGTCTGCCAGCTTCCGGGTGTGCTCCCTCGTGGCAGGGAGGTCACTGCAGCAGTTACATGAAAGGAG



ACTTGCCTCTTTTTAGATGTTGATGAACAACTGTCCAAGTCAGTGAAAGATAAGGTATTGCTGCCTTGCCGTTACAACCTCT  
CCTCATGAAGATGAGTCTGAAGACCGAATCTACTGGCAAAAACATGACAAAAGTGGTGTCTGTCTGCTCATTGCTGGGAACT  
AAAAGTGTGGCCCGAGTATAAGAACCGGACTTTATATGACAACACTACCTACTCTTTATCATCTGGGCCTGGTCTTTTC  
AGACCGGGGCACATACAGCTGTGTCGTTCAAAGAAGGAAAGAGGAACGTATGAAGTTAAACACTTGGCTTTAGTAAAG  
TTGTCCATCAAAGTTGGTAGGATTCTCCTTAAAGGAACATGTCTATTGATGGGGGTGACACGTTTAGCAGAGAAGGAAA  
CGTCTGACTTCATAAGTGAGGGTTGAGTCTCTAGTGCTACAGAAAACCTGATTGATCAAGGTGGAGACCTCTACTAATGC  
ACTTTTCTGTAGTTGGGATCATTCAAGGTCACGGTAACCATCCCAGGCGCTAGAATGGCCTGAGATGCCTTCTGACTCGC  
GGAAGCACAATAACTGTGATATATAGTGGCCGTAAGTAACTGCATTGAGAACTATCTTATTCTGGGTAGCAAGTTAA  
TCAGGTCACATATTTTTACTTTTTCTGAATCATTGTCATTCTGCCTTTGTTTCATAACATATACTCACCTTTCTCCACTAAA  
AGTGACAAAACCTGGGTAACTGAGTCATCTGAGAGATGAAGAGCCAGTCTTTTATTTTTAAAGATTTACTTTGTTTTTA  
ACTATGTATATGTGTGTGCTCAGATGCTCAGAGCAGTCAAGAAAAGTATTGGATTCCCCAGGAACTAGAGTTAAAGGCA  
CTTGCAGTACCCCAATATGAGTGTGTTGTGTTCTGCAAGAGTGAGTTAGGAGTATGTGCTTAACTGCTGAGCCATCTCT  
TTAGTCCCAAAGGGCTAATCTTTAGATGGTTCAGTCTTGCAAGACCTTCAAAGTAAGCCGGGCGTGGTGAATATGCCTT  
TAATCCCAGTCTCGGGAGGCAGAGGCAGGCGAATTTCTGAGTTCGAGGCCAGCCTGGTCTACAAAAGTGAGTTCAGGA  
CAGCCAGGGCTATACAGAGAAAACCTGTCTCAACCCCCCCCCCAAAAAAAGACCTTCAAAGTAGTTCCTCTAACTCGT  
TATCTTGTAGCAGGGCTAGGGGAGAAAGCTGAGGCTGTGTAAGCTCAGTCAGATAGGAAAAGGTGGCTTTACTGAAC  
TAACCATTTCTTAGAAAAAACAACATGAGTTGTGACTGAGAGCGTTAGGCCTGCAGATTTGTTACTCCAGGTAAAAA  
AGCCATGATGTCTGGTTAGAAGAAAACAAAATAAAATTTTTATGTTGACTATCCAAGTAGTAGTTTGATTGCGTGGCATT  
AAGGTAATAAGTAGAAAATAATAATGCCAACTATAAATAGGTCAGGAACACATGCAACTTTATTTAAGAACAAGGCCA  
TTTTAAATTTCCCTTTGTTTTAGTTTTGGTTTTGAGATAGGGTCTCACTATGTAGCCTTGGCTGGCTTGGAGTCTAGCCT  
CAAACCTCAGAGAGATTTCACTACCAAGGAATTGTTGTTGTTGTTGTTTACAATGACTTCTCTGCAACCAAATTCAGG  
GTTTTCCCTTTCTGGTAACTATACTCCGTAATCTTCCCTCATTCTCCCATTTCTCCAGTATCCCTGGGCATTTTCAGAAG  
GTTTCTTGACAGCCTGATTTAAATGAGAGCGTCTTCTAAATATATCTGTGTGTCAGGCTCCGTGCTAAGTGGTGTCTT  
TCCATCCCTCATCTCTGGAATGCATGGGTATTAACCTGCCTACAAACCAAGACTAAAAAGCAAGGGAGTGGCCACAG  
TCACAGGGCAAATCTCTGTTAAGAGCTGCTCTTGATAGTCACTGACCCCTGCTCATAAAGCTCGGTGGCACTCAGACTT  
CCAAAACGAAAGCTCAGGGTATGGACTGGAGTAGAGGAACTGACTGCCACAGGAGAGGGGAGGAGCTAAATTCCTAAA  
GTCTAAGCATGAGAAGCAAGTGGCAGGAGGTATCCACACTGACTCTAAGTCTACTTTAGCATCTTGTCTGGAGGTCAAAT  
ATACAAATGAAATCAACTCCAGGAAGCCTCCTGTCTCTTAAAATGCCAGAGTAGCAAGGAATTAATAAAATGTAGTGG  
TTGTGATTACAGATTAATACTGTATATTTGATCTGAGTACAAGCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGAAAATGAGGA  
TTGTAGAGGTTGGGAGGTCCCTTGGGTAGGTCATGGAACAAGGCTTTGGAATTTAGCTACTAAGACATTAGAGGGCC  
AGACTCGGGAAGTGACTTAGTTGTGTGGTCTAATGCTAGCTAAGGCAGAAGCTGAGTACCTTCTGATGTCTTTCGCATC  
TATGACTTTGCACAAATACAACAAATCTTTGGCCGCATGCCCTAACACCACAGTATCCCTAACAGCAACCGCACAAACAG  
CACAAGGCAGTAAGCAGTACCAGAGTGCCTGGAATCCTGCCTACCTAGGCATTTTTCTTAAAGATGAAGGCCACTAGAA  
CACAAGGCAGGAAGTGTGCAAGTCCCGCGCGGTGGAGGCGGCAGCAGCGGCGGCTGCTCTGGTCCCGGAGATGGTGGA  
GCAGAGGGGCTCCCGCAGCGACGGGGAGAACGTGTTTGTGGCAGCCAAAGATCTATGCCTACATGAGTCTTAACAA  
GTGCTCTGGAATGCGCTCTCCACTTCAGGAAGAGAACTCGGTTGCCATCACGAGGTCAAATGCCGGGGAAACCATTAG  
CTGGAATCTACAGGAAGCGAGAAAAGGAACGCCAGGAACGTTATCCGAAGCGCTGTGAAGTCAGATGAACAGAAGAGC  
AAAGACACCAGGAGAGGTCCCCTGGCGCCTTTTTCAAACCAAAAATCCGAAGCAGCAGAACCTCCAAAAACTCCACCCC  
CATCATGTGACTCTACCAATGTAGCAGTGCCTAAGCAAACCTGAAAAAGCCCCTCAAGGGCAAGCAGGCCCTCAGAA  
AAAGTCTCAAGGGAAAACCCAGCAGAATAGAAAATTCACCGATTTCTACCCTGTGCGGAGGAGCTCCTGGAAGAGCAAA  
GCTGAGCTGCAGTCTGAAGAAAGGAAGAAAATAGACGAGCTGACTGAGAGCGGGAAGGAAGAAGGCATGAAGATCCAT  
CTAATTGATGGCAAAGGCAGGGGCGGGATCGCTACCAAGCTGTTTTCCCGGAGGATACTTTGTGGTAGAATACCATGGG  
AACCTCATTGAAATTACCGATGCCAAGAAAGCGGGAGGCTCTGTACGCACAGGACCCCTCCACAGGCTGTACATGTACT  
ATTTTCAGTATCTGAGCAAAACCTACTGCGTGGATGCCACTCAAGAAAAGAACTGCCTGGGGAGACTCATCAATCACAGT  
AAGTGTGGAACTGCCAGACCAAACCTGCACGACATCGACGGCTGCCTCACCTCATCTCATCGCCACCCGAGACATCGC  
AGCTGGGGAGGAGCTCCTGTACGACTATGGGACCGAAGCAAGGCCTCCATCGAAGCCTACCCCTGGATGAAGCACTAA  
CCACTTGACCTCCCTGCCTCCCTGCCACCCTGCCTCCTCAAAGGTCAAAGTGCCTCAAAGGGGAATGAATTTTTTTTTTA  
CACACACACACTTACTCTTAGCAGATTACTTCAAATGTTTTTAAAAAGTATATTAAGATGCCTTTTCATGTAGTATTT  
AAATATCTGTTACAGGTTTCAAAGTGGACTTGAACAGATGGCCTTATATTAACAAAAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGG  
AAAGGGTGGCTTCGAACTCATTATATAGCCTAGGCTGACATCATACTTCTCCTACTGCAGCCTCCAAAGTATACCTGCCTA  
CTGTTGTGGTCCACCACGCGGGCTAACCTTACTTTTTTAAGAAGCAAGGGGGCATTGAACATGGACTTAGGGTGTATGCA









ATTTAAGATAGAAATGCAGCTCGCCTATAGCTGTGCCTATACTGAACAGGCACAGGGCTCTTGTGTATTTCATTTACATT  
GTATATGTAATTATGTATGCATTGTATGTAATCTAGGGATAATTTAAAGTACATGCAAATTATGACCTCACTTTATACTGG  
GAACGTGAGTACCCAAGATTTTGGAAATTTGTTTCAGATTCTGAGGGGTGACTGTATTCAAGAAAACAACAGCAACAATAA  
CAACAAAATAAGACACAAATAGGCAATGGGAGTAACTCAGTTACCCAGTGTCTGTGGGATGCCTGGCATGTTGTGCACTT  
CGCTAATATTATTTTCATTAATGTCACACTTCACAGTGGTATCCGGACAGGCAGTATCATTGTATTAATTAATAGCTGAGCA  
AGGCTCCCAGGCTCCTGAGGATGGAAGTGAAATCCTTTTTGTCTCTTTTGTCTGTGGCAGGTTCTCAGGGCACAGGATTCTT  
AGAAGCAGCTATGCCTGCCCTTCTTTTGTCTGGGGCGCTGGAGGCATGGTCGGTTCGAGGCACAGTTGTTTTCTGCCCTT  
TGTTATTTATTCCTGCACTTTGGGATTCTCTCTTCTACCCAGTGCCAACCTGGTTTCAGAAAGCCCTTTGTTGCTTTTATTTCA  
AAAGTTTACAGATTAATTTCCAAGTTAAAACAATTTCTTCTCTCGAGCATAATTTTAAATTTTCATATAAAATAAATGTA  
TATGAAAAAGTGCATACCTTAGAGTTTCCACGGAGCTGTAGAAGCCATAGTGTGAATTTGTGCTGGCGCTGCTTTGGGT  
CACAGGCCGCTGTCTAGATGGTGTGTTTAAAGATATTTTGTGTTTGTATGCCCAAGCCAGTAAACAAGCAATAAATAGC  
AACAAACAATGTTGAATCTTAGAGATAAAAAGTATGCAAAATCATAACAGTAAATTATCATTTTTTAAAAAATGAAAATGT  
TAATAAATGTTCTTGTGTTTCAAAAAGCAAGCAAGTAGCCGGGCGTGGTGGTGTATGCCTTAAATCCTAACACTTGGGAGGCA  
GAGGCAGGTGGATTCTGAGTTCGAGGCCAGCCTGATTTACAAAGTGAGTTCCAAGACAGCCGGCCTATACAGAGAAA  
CCCTGTCTCGAAAAAACA AAAAGACAACAAAAACAACAAAAACAACAAAAAACCACCAACCAACCAAAAC  
AAACAAAACAAGCAAAACAAGAAATTTCCGATGCTACTAAGGAGAGGGGAATATACGCTATATTGTCCCTGTATGGTTA  
TGCACCCCTTCTGATCAAAAAAATCTGCTGAAATACATAGCTTTCTCAAGGATATATGCTGTCTAAACAAGACCCGTTTAT  
CTTTACTACACAATGATAGATGTTAGTAAAGTTTTAATGACATGGATATTTTTCTTGCTATTTTTTTAATAATGTGGGA  
AATCTTAGAAACACTTGTTTAAAAATAGATGACTGGTTATCTATGAAACACCCGTAATGGAATATTATGAAATCGTTTTA  
AAAAGGAAACTCGGCTAAAGAACAGTCTCTAATGTGCTTAGCTTATGGAAAAGTGGGAGGCATGGTGTCTATCCCTTTT  
GTAGACAGGATGTGCACGTGCACAAAATTCACCAAATGTGTAAGGGCTTTTACTTTTCACTGTATGCTCTCAGCCTTGAA  
CCATTTCTGTAGGGAGAAAATTAAGAAAAGAAAAGAAACCAGCAACTACACTTGACTTTCTGTGTCTGCTTGTGATCG  
CTCTGATTCTGTAGGAGCCCTCTGCCAAGGACTTCAGCCTTTTGTCTTGTGTTTGAATATGCTTTTTTGGTTTTGGTGGTTG  
TTGTATATTTGAATACCATACCCACATTTGACACATCTTCTAGGTGTGGGCCTTAAACAAGCTGCTGAGCTAGTTAATCT  
TTAGTCTCCTGCTGTCAAAATGTGGCTGACAGTGAGTGCATATGTGGTTGTGAGGTTGAATGGGATAATTTATATTAAGT  
GCTTAGAATTTTGTCTAGTAAGAACTTAGTAATTACTATTATTAGTCATTTTATTATTACCATTTTGTGGTTAAGAAACA  
GAGGAGAAATTACTTATTTAAAAATTAATAACTATATAATGATATTCTTAGGACTAGAATTCAGGAAGTTAATGTGTCC  
TGTGTCTGTCTTCCCTCCCTGATATGTTCACTGGCCTTGGTAGAGGATCCCAGGCTACGAACCTAAAGGGCTGGCCTGA  
ACAAGCTGTGCCAAGGAGAAGAGCAGCCTCCATTGAGTGGCTGTTCCCGTGGGAAGCTAAACACTGGGGGAAAAAA  
TGGTGCAAAAAAAGAAGACTGAGGGAAAAGTCGGGCTCAGGGAGAAAGCATGAGCAAAGGGTTAATGGAAGACAGGA  
AATGGCTCCGAGACCAGTTATGGTGACATCAGAGAGGAAAAGATTGCCTGAGCACTAGAATCCAGGGTGATTGCTTGT  
TTAGTTTTGCTGTGATTTGGGTTTGTGTTGTGCTGTGTTGTGGGCTTTGTTTTTCTTCTTCTCCTTCCCTCCTTCCCT  
TCCTTCCCTCCTTCCCTTCCCTTCTTTTTTTTTTTTTTGTAGATAAGGCTCTCTACATAGCCCTGTGTCTGGA  
GACTGTGTAGACCAGGGTGGCCATGAACCTCACAGAGATCTGTCTGCGTCTGCCCTGAGTTCTGGGATTAAGGCTTGT  
GCCACCTTGTGAGATTTGTTTTGTTTTGCTTTTTAACCTGTGTGGAGACTGGAGATGGGAGAATACTTAAAGTGTGGGGT  
TCATCTTTCATAATGAAAAGACATTGGAACCTGGAATGAGTTTGGAGCAAATGGAGAGAGGGAAACAAGTGGTGTGATT  
TGCTCGCGGGGACTTAAGCAGTTAGACGGAGATGCCTGAGGAGATAGAACAAGCCAGTGCCAAGCCCAAGAAAGG  
CTTGGTGATGGCGGACATTGAGAGTCTCAGAATCTGGTAGTCAAATTTCTCTGTTCTGTGAGTTCTCAGGGAACAGTA  
GATTGAGGAGTCCAGGATGGAACCTGGAATACTCAGCGGGGCAAGGATGAGGAAGAACAGTCTAGAATGAACAGGA  
AAGACTGGCTGGAGAGTTGGAGTAAACCAGGACAAAAGTGTATCCTAGAAACCAAGTGAAGAAAACAAGGACGTGTT  
CATGGAGGGACAAAGCATACTGACAAAACCTCTGCATTGAGATATATGCCATGATAAATAACGGGAAAGATGATTA  
TGATTGTGCTAAGGGCCCTTCTCCACCTCTCACATCATTATCTCAGAATAGGACCATATTTAGAGACAGGACTTTTTACA  
AAGATAAGATAAATATGGGATCACTAGAGGGTGTCTTAATCTAAGCTTGTAAATGAGATGAGGAAATTTGGGTGGAGAA  
ACATTTGTAGAGGAAGAAGAAAAACAATATTTATGTGGTAAGGAAAAGCGGTTGGGAGCAGAGTCTCCCTGACAGTTC  
TCTAAAGGTGCCAACACAGTTGATAACCTTACTCTGGTACATTTGGCTTCTAGAAAAGAAAAGGAAAAAATTA  
AACACCTGTATGTTTTCTTCAATTTGGTGTCTGGTCTCGTTCACAGCCCTGGTCAGCAAATGCCTGTGAGAGTGGCG  
AGTGAGAGAAACCGAGCAAGAACATCTGAGAGACTCGAGAGAAACTGAGAAGAGATGAGGTCATCTAAGAGAACAAAA  
ATGTTTCACAAGGGAGAAGGTAGTCACGGTGTCCAATTTCCAGAAAGGTGTGATGGCCAAAATCCTCGGAGACTCTC  
GGTGGCCTTTTTGACACTCTCAGGTGAACAGAGGAACTGGCCTCAGAACGCCAAGAACGGGGAGGCAGCCAGAGGGA  
TGGACGCCTTCTAAGAAAAGTTTGTATGCAAAAAATAACACCTGACACCTCCATCAACTCCCTTCTGCTTTTTAAAAATGACAC  
AGAGTTGGGAGCTGGAGAGATGGCTCAGCAGTTAAGAGCACAGACTTGCAGATGACCTTTCCAGACCCATGCCAGGCAG  
CTTCAAACATCTGTAACCTCAGCTCCCGAGGGATCTAATAGTCTGGTCTCTGAGTGTCTCAGGCACGCATAGCCACACAC

AAATAAAGATGATCTAACATAAATCTTCATGGAAATGACAATAAGTCGTCAGCTGGACCCGGAAGGGCCCTCTCCCCAC  
ATTTACCAGCTAAGCAAAGAGAGAAGTCGATATTTCTTTTCAACCAAACTTGTTTGAAGGATTTTCAGAAACAAAACA  
AACAAACATTGTGAAGCTACCATTTACATGGTGGATTTGTACCAACATAGAGTCCAATTTGCATTGTGGAGTTTAGAG  
AAACTTGCTTATCCAAGATTTCTTGAAGAAGGATTTGGATGGGTCAAAACATAACTAGAATCGTAGGGAGCATTCTTT  
TATATCAATAAGCAGACAAAAAACCATAGTATAACTCAGTAGAAATGGAAAAACAGAAATATATGTGTTG  
CTTGAAAAATTTTGAATCCAGAAGATCCACAATCAGGTATAATAATAGCCTAGGCATTTTGGTTTTTCAGATAGGGTTT  
CTCTGTATAGCCCTGGCTGCCTGGAACACTTTGTAGACAAGGATGGCCTCGGACTCAGAAATCTGCCTGCCTGCCT  
CCCAAGTGTGGGATTAAGGCGTGCACCACCACCACCCGGCTAGCCTAGGCTTTTAACCCAGCACTTATAAGGCAGA  
GGCAGGGGTATCTCTGAGTGACTGGACACTCAGCTGTACATTGGTGAGTTCTAGGCCAAGTAGAGCTACACAGAGAAAC  
CATTCAACTTAACCCAAAATATGGGATGGAGAGGCAACCAAGAGGTTAAAAGTCTAGATTCTGTTCCGTAGCAACTGAG  
TTCGTTCCAGTCCCTACTACAGGGAGTGATAACTACCTGTAACTCCAGCTCCAGAGAATGTAACACCCTTTTCTAGACT  
CCTTAAAAGTGTGGCACACACCTGGTGACAGACAGATACTCAAACATATAAAATAAAATAAAATAAAATCTTTTAAAAG  
GGAAGAGTCTGCACTATATTATTAGATTCAAAGCTACCAGATTTAATGAGAGAAGAGATCTAATAAGAAATAAAATGA  
CTCAACATTTAGTTTATCTGAGCTAGTTAGTAAACGACAGCTTGAAATGGTAAAATTGGGGAAAGCTAAAACACTTAAC  
CAACCAGAAAGTAAACCTAGTTTGGCACCCTATCTTATAGTGATTTTAAACCACTAAACAAGTATTCATGGAGAATTT  
GAGACTGTGAGAAATTTGAAAGCACCAGAAGGAATACAGACGAAATGGATGTTGTGCTATTTTATACTGTGGTTTGAATA  
GAAACGATGCTCATAAAATAGTCAAGGAAACCAATGTGGTCAATTAAGTAGGCAATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT  
CGTGTGGTATGT  
GATGTGTGTTTTTATGT  
TGTTGTGTGTGTGGTGTGTATGTGTGTGTATGT  
GTATGT  
CCAGGCCTGACCCACAATGCCTCTCTCTACTGTGCCTCGATCATTTTAAAAAGTAAATACAAATAAAAAAGTTTCACTTCC  
CAGATATTAATGACAGCAATCAAACATTATGAACACATTTTCGTTTGTAGACAGAACGAAAAACAAATAATCCAAC  
GAGAAACAGGCAAAACATGTAACAGGAGATTTCTCAAAAAAAGAGTATAAATGATAAATTACCACATTAAGGGTGATC  
AGCATCATAAATATTGTTGAGATCAAAGTGAACAATTACCATATCCCTGAAGAGTATTTAAAAATTAATAATGTTCCCA  
CCAGTGCTGGTAGGCTGCAGAGAAACAAGATCATTCTCTTTGGGAAGTGTGGAAATGGTACAGACCCTCTGAAAAAAT  
CTTTTGTGGTTTCTTACAAAGATAATCATATTCTTATCATGTAAGTGTATGATTCCAATAGTTACCATTTATCTCAGAGAA  
ATAACCATGTTTACATGAAACTAGTACATAAATATTCATACCTGCTTTATTTATAATAGTCAAGTTCCAGAAAAAGAGA  
AATGACTTTTATGTGTAGTAGTAAAAAAGCTCTGGCACACCATGGAGTACTGCTCAACAATAGAGAGAGATGACCTAT  
CTGTTACACAAAAAACCAGTGAATTGCTAAGGAATTACCCTACCTGAAATGCCAGCCCCAAAAGTTACAAGTTGCTT  
CTTCCACTTACCTGCTATTGTAACAGAGACAGGGACCAGACTGGTGGTTGCCATGGGTATGATGAGGTAGAAGGTAGAA  
GTGAGGGACTCCTGGAACAGTTATCAAAAATCAGCACAGGGTACCTCTGGAATACCATCAGTCTATAGTGTGTGTGT  
GT  
GATCGCCTGAGAGTTACGGGCAGTTATAAGCCTCCTGACATTACCGCTGAGAACCTAACTCAGATCCCCTGAAGAAGAT  
CCCACCTTAAACCACTGCTTATCTCTCAGTCCATGCTCTGCATAATGGCAATGGCACATATCACATGGGCCTACAGAGG  
TGATAGAATTTGTAGAGCGTCACACAGAGAAAGGTGAGAGCATGAAACACTGGTGAATTTGGATTGAGTTTGGCGAT  
TGTTCAATGCTGAGTTCTGGCTTTGGCATTCTAAAACAGTTATGCAAGACACTACCATTGGAGGAAACTGGTAGAAGAG  
TGTTCAAGGTCCCTGTATATTTTTTCTAGCTTCTTTGAATCTACAATTATTGAAAGTTTAAAAATGGGTTCTAAAA  
AAATAATTTTAAAAACTGAAAATGCTCATCTTCACTAAGTATTGAACACATGACAATCCAGCCCTTCCAAGTAATTC  
CATTATTGAATTATCAATTTGTGGAGTTTGAAGAGTCTGAAAAGCAAATGAGCACACATTAGCAGTGTCTCTCTGTGCCT  
CTGGTTGTGAAACTCTAAATGATTATCTTCTCATGGACAGGAGACATGTGTCAACATGTATTCAAGTTCTCCAGTGCT  
CAGTCAACACAGAGGGTATCTGTCTGGTCACTGCCTGCTTCTTGTTCATAATAGCTTTAAAAAAATTCATTAAGCCTGT  
AGTAGTTTGAATAAGAATGGTCTCATAACCTTATATATTCAAATCCTTTGTCACAAGGGAATGGAAGTGTGAAAGGA  
TTAGAAAACTTAGAAGATGTAGCTAGTGTGCTACTGAGGGTGGGATTAGAGGTTCCAGAAGCCCATGCCTGGCCAGCTC  
CTCTCACTCCACTGCAGATCAGGATATAGTTCTTAGCTACTGTTCCAGCACTACATCTGCCTGCCACCATGCTCCCTGCC  
ATGATGCTAGTCCACTAAACCTCTGATACTGTAAGCCAGCCCCAATTAAGTCTTTCTTTTATAAGAGTTGCTTTGATCAT  
GGTGTCTCTGCACAGTAATAGAACAGTGGCTAAGACACAGACCTATAATTCCAGGCACTTTGGTCCACATTGAAGACATT  
AAAGATGAGCAAATATGTTTCTTTCTTCAAAAACTCATTGGTAGTAAATAGATCAAACCACTGAGGAGGCCAGGAGAT  
ACTGGTCTCTAGAAGAGCAGCAAAAGTTTTTAACAATGGATCCATTTCCCGCACTGAGCTTTATCATTTCTGATGAGT  
TCCAGGAAATGGAATCTTACCTAGAATATAAGACAGGTGACCTCCTAATTATAGCCACGAGGGCAAGCCAAATGCAGAT  
GAAGATGCTGAGCAAAACCAAAAGCCACCTAATTTTATGTAAAGGTAGAATGCCTAAAAACTGCTATAAAATCC  
TGCTCTGGGATTTGGTAGCCCTGTAAGTAGCTTCAAGAACTGCTCGTAAAAATCTGCTCTTAAACCTTTTGGACCATAGATA

TTTACATGCACTTCTAAGTTTCTTTGAACCTAAGGCTTGGTGCATGCTGAGTAATCAATCACTCTGCTGCCAGGCTAACAT  
GAGATAAGATCCTGCTAAGTTGCCAGGCCTCAAACCTACAAGTAATCCAGACAAGTATCTGATATTACACCTGCAGGAA  
CTGTGCTCAGCTCTCTATTCAAGGCTGTGATGACTTTTTTTTTTTCTTATTCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCT  
TCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCT  
TCTCTCTCTCTCCCTCCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCTTTCTGTTCTTTTCTTTTTCATTAGTTTC  
TACGAATGACTAATGACTAAATTCACAGTCGACTTTAATTCTAAAAGATCCATGAATGACCATTTTATTACTATAGAAA  
TGCTTATATATCTTGCTATAATCTTCTTACCTCCGTTGGGGGCACAGATTTTTGCACAGAAACGAATATCACATCATTATTT  
AACATAATGAAAACCTAAGAGTCAGCCTAAATGGTTAAAGGTGTTTAAATAGTCAATGGATGGGTCAGTGAACCTAATCATG  
AAATGAAAAGTAACTTTAATAACAGAATGTGACACAAGACCATGTGATTTTAAAGAAAACAGTACACAGCCAGAAGC  
AGCAAGCATGGCTCCCTCTAGATTGTACGGTTAGGAAAAACAGGTTCTTTGGTAGCAATTGCCAAATCTACAGCAAATTT  
ACGTCATCCTGCAAACCTCAGTGAATGAAGTATAAAGCAGTCTTGTGGTTAGACCAGAGAGTTGGCTCATCAATTAAGAG  
CACCACGACTTCTCTCCACAGTACTTGGATTGATTTCTAGCGCCCAAGGGTGGCTCCCAACCACATAGAAGTGCAGCT  
CTAAAAGATTAGATACCCTTTTCTGACCTCCTCAGTCACTAGGCACACATGGTACACAGACATCCATGTGAGCAAAACAC  
CCATACATATAAAGTAAAGTAAAATTTAAGTGTGAAGTACTCTTGTGGTGAAGTTGAGCTTCTAAACAGGACTGGCTGT  
CAGAGATTCTAAGATGCTGGAAGTGCATGGTTTGTAGTGTATGGTTTCTGTCTAGCCTATGGGGTACAAATGGTGAAAAC  
AATGGTTCCCTGCCAGTCATTAGTCTCCACACTGTTGTTCTGCGTGTAAAGGACAAAGCAGTATAAACTGGTCTTGCATGAC  
AAAGAGCCAGAAAAGTAAAATTTGTAACATTTGATGAAATGCCCTGGTTTGTGTAATGGTTCAGGGTCTGGAAGGTCTT  
GGTTTGGCCACTGTTCTACCAGTTTACCTTGACCTCTTGACCTCTGTTAGGGCAACATGGACTCACAGGAGATTGAGGCA  
AATGTTAGTAGAAAAGTTTGAAGATACTACAGTGGAGGCAGGATGTGGTGAAGCCAGAGGCAGCAAGGGGGAGGCTG  
GGACTATGTTTTATTAATTTACCCAGTGATGTTGGAGAGGTGAAGATGGATCAGATAGGGATCCTGTGTAGACGCTACTG  
CCACTATAGGGAGGGCAAATCACAGAGCAGACATCTTACTCTCTGTTAAGACAATCTACCTATATGTCTACTTAGAA  
GTGTGTGTATACAAGTGTGCATGTATGTCTGTGTGTATGTGCATATAAGTCTTGGCTTGTGTGTGTGTGTTGGGGAGGG  
GTACTTTTAGCAGCACAAAAGACCGTGGTTCTGTGTAGAGATTTGAACCCAGGGCTCAGGAAATGGCTTAATGGGTA AAC  
TTCTATTGTGTAAGCACGAGGACCTTCACTTGATCTCCAATGGCCTTGTAAAGCCACGTGGTACATGCCGAAATCCTG  
GAGCTGGGAAGCCAAGGACAGGTAGATCTTAGGGGTTCTGTGGCCATCAGTCTAGCAGAATCTGTGACTTCCAGGGTCA  
GTAAGAGACGCTGTCTCAAAAATGTCTGTGGAACAACATGGAGGAAGACGCCAAAGATTGACCTCTGGTTCCTCATGTGC  
ACTCTCATAACGTCGCACAAGCACAAGTGTCTACGTACTCACATACTCACACCACAGAGACAATGGTGCAAAACATG  
CCCTGGTGACCAAGCAATAAAGGCAGGAGCTGAGAGGGAGCCTTGAATAAGAACAAAAGTACAGAGGAAGTAGGGAAA  
TTAAAGGTTGTAACCTAAAAGTGGTCCCCCAGTCATTGAAATAGCAGAGTAAAGCTAACTAACTAACTAACTAACTAA  
ACAAAAGCTTCATCAAGATTAATTGCTTACATATACATACATATACACATACACACATACATACACATACACACAC  
ATACATACATACATACATACATATATATACCTATAGGTATATATGCATATACATATATATACATATATACATGTATA  
TGCGTATACATATATATACCTATAGGTATATATACATACATCCAGAGAATCTGCATAAACCCAGGTCTGTTTCCCTCTGA  
AGAATTACAGTGCTATTAGCAGGAGGCCACATTCCCCATGGAAAATTCAGCTAGTCAACAGAGGCTGCCACCTTCAAT  
GGAAGCCTGGCTCCTCCTCCTTTTGGCTGCCTTCACTTGAGAATATGACCTTGCTCAGGCTTTTCAGACCTGAGTCTAAG  
AACCTCACGTTGAGAGCAGGAATGACCACTTACCAGGGCAAAGAAGGCAGGAAGCCTGTGACAGACAGCCCTGTGAA  
ATGCAAGTGAGGATCCTGTGAGCCACCTCCTCAGGGAAGCCAGGTCCTTCTCATCTGAGATCTCTGCCCTAGAAGGAGG  
GAAGGGGGGAAGAAAGCGTCTCTCAGGAAGAAGGGAAGTATGAGAAATCAATGAATGGAGATTTTCAGAAAAGCAGA  
GATCAGAGAAGTGAGCTTGCTCATCCACTGGCTGATCACTGCTTCTGTTTCCAGGATTTCTCTGCCCTCAACGGTCATGACT  
GTCAGGGAAAAGAAAAGTCAAGAAAAGGAGGAGTGGGGTGGGGTGGCCAAACTCAGACTCTTAAATGCTTACACATGTAT  
TTGTACATGAGCTCATACCATGGTCCCTTTATTTATTTGGCTATTTTGGAGGTCTTATTAAGTTCTAGGGGGCCTCAGGA  
AAGATATTTCTCAGATTAAGGAACTTTGCATAGGTCGTTAATATCACAGAGCTCTAGCTTCTTTGTCTGTTAGAAAAGTT  
GAATGGAGCCGGGCGTGGTGGCGCACGCCTTAAATCCAGCACTCGGGAGGCAGAGGCAGGCGGATTTCTGAGTTGAG  
GCCAGCCTGGTCTACAGAGTGAGTTCCAGGACAGCCAGGGCTACACAGAGAAAACCTGTCTCAAAAAAAAAACAAAA  
ACAAAAACAAAAACAAAAAAGAAAGAAAGTTGAATGGTTCCAGACTTTGTGAGGATAAGGAGTAAGAGGAAGAAG  
ATCAAAGTGGAGTGGAGTGGGATGGAGCATGGAGTTTCTGTGATGGGCAGGGTCCATGCTGAGAATTTCTATAGCTGTC  
ATCCAATCCTGACAGGGGCCAAATGGGTTAGAGCTTTTCCAACAATGGAAAAGAATGAGAAAAGTGGTTACGCCGCTAG  
CTCAAGGTCGCACAGATAGTAACCAGAATAGAAAGATAGAATCACTTGAGAAGTGCCAAGTCATACAGCATTACAGGAAA  
TTAATATTAATAATAATAATAATAATAAATGGCATGGTGCATCCATCTGTCTCTGACAACAGTCATAAAAATAGAATAG  
ATTCAATTTCTATACCTACTGAAGGGTACACAGGCTGTGTATCCTTGGAACTCAGTTTCTCATATGTCAAACATTTTAC  
ATACATTGTAAAGATTAATGAAGGACTGAAGGCATACAATAACAGCAAGGAGCCTACTTCAATTTGTTGGCAGATCCTG  
ACTTAGTAGATACTGACCCACAGGCTGGACCTACAACCTAGGTATCAAGTAGAATGAATGCCAAGGGGAGAGAAATAT  
GGCCCTACCCTAAGGTGTAATAAATTTGTTATTTACCTGATATAAATTATCATCTCCAAGGCTTACTGCCTCAGTCGGCTAAG

CTAGGCCTAGTCTGGAAGCTTCTAGCCTCTGTATAATCTTATCTATAATCTTATCTATGTTTTACGCCTCTAAGACTTACT  
GATGAATAAACTACCCATTCTAGTCTTTCCCTCTCCGGCTAAATGATTCCGGCTCAGTCTTCTGGCTCAAACCTCTCT  
CCAAGCTGACTGATGCAATCTGGCTTCTCTCAATTTCTGACTGAATTGCTCTGCTTAGCCTCATACTAACTTTGGCAATCT  
GTTCTAATCTTCTGGCTCTTCTCATTCTCTGGTACGTTCTATCTTTACCTGTGTCTAGCTTGTCTCTCTCTGCAACAAATG  
TCCCATTAAGTTGCCTCTTTTGTCTGTGTGCTCTCTCATAAGTAGCTTCCCTTTTCTGTCTTCTCTCATGAGAGCTGG  
GCATATCATATTTTGTCAAATCCTTCTCTGATTTCATCACTTTGTCTACCACTCAATTAGACATCACTTCTAAACATGGGTGC  
TTCTTCCTTCAAACCTAACTTTACCTTATTGTTTGGGATCAAAGGTGTGTGCTAAGGGTGTGTCTGTATTCCAGCCAGAGG  
AAAGAAAGGTGTGTGTTAAAGTTGAGCCACGCCACAACCTAGAAACAGATTTTTTCAGTAAACAATACAGTATCAGGGTT  
CAAGGGGCAGTGTGATCAAATATCCTGCAACCTAAGGCTCTCAAGCCAAGAAAATTGAACACAATGAGAAGCCATTGT  
GGGGATGAATAAACTGTTTTCTGTTTGTGAGGAAGACACAGGCATCCTGAAAAGAGTATTTTGGCCATGTAGAGATT  
TGTCATTGTGAAGGCAAGGGAAGGAGCCCCAGGCACAGGAACAGCTTATGTGGTATTCATGGAAGCAAAAAGCTTCA  
GAGAGCTGGAGGTCAGAAAAGAGTAGCTGTGGGCTATAACTAGCAGGTAATTTGTATAGAAGAGTGATAAAAATCGAA  
AAGTAAACTGGATTTAGATTGTGAACAGCATTGCTCAGAAGTGTGACCTAGCTTTTTAAAAGAAAGGGTCTTTTAAAGTAA  
GGAAGTTTCATAGCCAAGAGACGGAGATGTCATAGTCCACACCAGGTGAGACAAGAAGTCCAAAACCTGGCCACTAATGA  
ACCAGAAGTGGTTGATGAGTAAAGAAAGGCAAGGGAAGTGACATAAACCAAGCTCACACAGGAGTCACTGCATGAAA  
ATGACCCGCACACGTCTGCCTGACCACCGCCATCCAGGGGGCCAAAAACAAGAGGACACTTCTTTTTAAAAA  
TAACCTCTTTTGTATTGTATGCAAAATAGGCCAGACACAGTGAAGCCACTTAGAAGCAGTATTTATCTCCAGGACA  
AGACACACAAAGGTCACGGTTGGTTTTAGAAATGTCTTCAAATCTCAGCTTTCCCATTAAGAGCACCACCGGTGT  
AAGGCTTGTCTGATTGTTTTCAGTCTAAAGAGAGCTTAAAGGGAAGCCCTTTCAGAAGTGAGGCTCAGGATGAGTGA  
CTGTGGATTCATCAAGATCTCTCTAAGTAGCATATCCAATGGAATCTTCTAAGAAGATAGAAGAGTGTGAAGGGAGT  
AGAAAGGAGCTGCAAAAGTTTTTCATGAATTAATACTAACTAACTAACTAACTAACTAACTAACTAACTAACTAACTAACT  
GGTCTGCACCACTAACTTGAAGTAAATCCAGGTGTGTGAATGCACATACAAAGGGTTCACCAATGTCCCGCTCATTG  
CTTCTGGCTTAAAGATGTATGCAGAAGTGAGCTTTAGGATCTTCAGAGGTCCTTCTCCACCCCTGTGGTGAAATAGA  
AGCTTAAAAAATAGCTTAAAAAATTTAGTCATTTATATAGTCTGTGTTCTATGTGCCCCGACCTATTTTATTTTACTTTA  
CCATTCACATCTTATTAGACCCCTGCCAGATATTTTTGCATAAGGTAATTTCAAATACTGGCTTCTCAAATTTGAA  
ATATACTGTCAATTTCAAATAATGTGTTACTTTTTGTATGCATGTTCTGCCCTCTCTGTAAAGAAAAACATGGACCGATG  
TCTTCCAGCAACTTTGACATTTAGAATATTACCTCATTCTGCGTTTTCTAAAAGAGGGTCTGAGGGAAATGGCAATTTCTC  
AGAATGGATAAGCCAAGAGGGCACTCGGTATGCAGAGCCTGAGTTTTCTTAGTCCCAGGCATGTTCAATCACCTGGT  
CAGACACCTGACCTTGTGGATGGGGACAGGTTTCTGCTTCAGCTCCAGGTCCCAAGAGGGCAGGGACTATTCTTCTCC  
AGCTCTCTTGGGCCAAAGCCAGATATCTCAAATGGTGAATGACATCTTTGATGTGATGATTGTTGGAAAGACAGAAA  
ACATTTAGGAATACAAAGGAATAAAGAGAAATCAGGCCTGTGTGTCCTCTGTGTGCTCTAGAGTCTGCAGTTAAACC  
AAGGCTCTGAGTAGCTCCTTCCACGACATGTCTGGATGCCAGTAAGGCAGGCAAGATAGGAAAAGTCCCTTGAATGTCT  
TCTTAGAATACCCTGGTTGGTCTCCAGTGTCCCTGGGGTACTGGTGATCTCCCATTACTCCCACATGGTCTTCTCAA  
CCTTATCCTTGCTTCCCTGACCTATGGTCTGTCTTTGTTCTATGAACCAGTGGGGTGTTTACACACGCTTCCAGGAGCC  
CCCATTCTATTCTGCTGTGCTTCCACAGGCTGCAATCTCCCTCCCTCAGACCCTGGATGTTGGGATCTCAGGCCTCATCT  
GCTGCAGCTATAGTCACTAGCCGAGGTCCACCAGGCCAACCTTCTCATATTTCTGCTGCCTATAGCATTAAATGTAACCT  
ACATCTCTGCAGACGCTCCAGCTCAGCCGACCCTGCCTGGAGTATACACACCCCCACAGCAATTTTATCTACTCAACC  
ATGAGCTCCAGGTTTTAATAAGTCCCTCAGTAAAGTGAACGATGTCTTCAAGTACCTAATTGTAGGCTGCTGTAAA  
GTTTATAGGTTTTGAAGCTATCTGTGTGGGAAGAAAACAGAGTCTTTGCACTCAATTGAAAACCTCCCTGCAAAATACC  
TAGGTGGCTTGCTTTTCTGATTTCTCCCTTGAGAACATCCAGGTGAAGTATGTCCCTGGGTCTGGGTGGTAGGTATTAGG  
TTCAGAACTGTTAGAATGCATCTGACAGACAATAGACATTGGTTTCTAGACCGAATGATTAATGAGTGTAAATTTGCA  
TCACAAGAAAGTGAATAAAGGACAGCTAAGGAAACAGAGAAGCCAGCATGGGGCTAGTGGGGCAGATCGGGAGGTGGT  
GGGGTGGGGAGTGACAGAAATCTGTTTGGAGCTTATGAAAAAGAGGGTCCCTTCTATGTGCTGACTTACTTGTACAACA  
AAAATAAAGGCTGAAAAAATACCAGGAAAGAAAAACGGAAACCTCAAATGCTTTTAACTATATAAGATGTGCTCATG  
GGATAGACAAAGAAAGCATCTCTCTCAAAGAGAAATCTACCACATTTCTAATAGTGTACTCTAGAGAGAGAAAGAAA  
GAGAGAGAGAGATGGAGAGGGAGAGGGGAGGGAGAAAGAGAGGGAGGGGGCAGGGAGAGAGCGAGGGAGAGGGAGA  
AAGATAGATACTTGAACCTTTACTTTTCTTAAATGTATCTGACCCACAGAAAATGGTGGGTTTTTTTTTCTTCACTTAC  
TTAAGGAATTGACATAGGTTTATGGTCTGCACCAGAAAATGCATAAATTATCGAGAGCAGCTATAAATACAACATTGG  
AGATTTTTCTCAGAGAGGCTGTATGCATGGCATTTTGATGCCCTGAGTGGACCATGGGGAAGTGAGCCTTCCAATGCTAA  
TTCACTTTCCACCACTGAGGAGCTAAAATGTACATTATTGATTTAGTCGCTTTGCCAGGAATCAGTATGTGTGGTTAG  
TGTGTGTGTCTTTAAATTAATAGCTTTTATTTTAAAGAGTTTATGATTTCTTTTTTCTTAAATGAGCAGATAGTACA  
GAGAATCCCACCTCGCTGTATCTACCAAGCACCAGCTTCTCTACTATTACCATCTTCAAGTGGGTAGTATAGTTGTTAG

GACCAATCAACAGGTGTTAAGACATTAGTATTGACCAAGCTCATGATTTAGAAGACTAAGTTCTTTCTTATGCGTTACAT  
GGGTTTATCAAATGTGTACTGCCATGACCGCCATTACCTATCATAACATGATGGTATGCACCATCTGTTTATCCCCACC  
TTTGATCTTACGGTCTCCATGTGTTTTCTTTTCATGATATCATGCTATTGGAAGTGTATAGTATGTAGGCTGTTAGATT  
GGCTTCTACTCAAGTTGCAAACATTTAAGTTTTCTCCATGATTTTCATATCCTGGTGGCTTCTTTCTTTTATCATTAAATC  
ATTACATCATTGCATGGATGTATAAGTTGTCCGTGCACTTATTGAAGAGTATCTTTTTTTTTCCATGTTGACAACCTGAAT  
GTCTTCTTTGAAGAAGTCTACTTAAGCATTTTTTTTTAAATTTTAAAGACTTATTTTTATTTTTAAATTATATGCATGTAAGTGT  
GTGTGCACTCATGTACATGTGAGTGCAGACACCAACAGAGGACAGAGTCTCCTGAAGCTGGAGCTATGGACAGTTGTGA  
ACTGCCTGACACCAGTGTGAAATCAGACTTGGGTGCTTTTGTGCCAGCTTTTAAAGCAATTATAAACAATTTGGCATT  
ACTATTTGTGAGTAGGTGTTTGTGTGGGTGTTTTTCACTCCACTGAATCAATGCTTTCTGAAGTGTGGTTGCCATTACATC  
ATTGGAAATATTGCGGTTTTTAAAGAACTGTAAATGGTCTCCCTGGCATTCTATCATTGTTTTTCCAAAGTAAATGAG  
TGGATGCTGCTGTTTTCTCCATATGGTATCAGCATTGATAGTCTCTGGTATTAATCTTGCATCATTGACTGGCAGCTC  
TGTGGTGGCATGGCACTGGTCTTCTTGCACAAATATTTGTTCCCTGTACCCTTTCTTCAGCCAGGTACATAATCAGATCT  
TTTGCCAGTTTTACCGTGGGATATTTGTTTCTTGTCAATTATATTTTTAAAATATTTTAAATTTTATTTCATGTGCATAAG  
TGCTCTATTAGCATGTATGCCTGCACAACACATCCCAGATGGTGTGAGCCACCAGATGGGAATCGAACTCAAGACCTCT  
GGAAGAGCAAACAGTGTCTTAACCACTGCACCATCTCTCAACCCATTGTCATTGTATCTTAAGCATTCTTTGCATATTT  
TAGATCAGAGCCTCTTCATCATATTAGGTCTTTTGCAACTATTTTCTCCAGTCTGTGGTTTATATTTTTCCCTTTAGTA  
GCGTGTGTGTATGCCTTAAGGAGGAAGGCTTCTGCATGTACAGTTTTACAGTAAACAATAAAAAGGAAAATTCAGTGTGAAT  
GTTTTGTGTGTTGCCAGAGTATAGGAGGGAAGTGTGGACTCATCAGAGGTTCAATAAAAGGGCCGAGTTATGCCTAG  
GGATGGTGACAGCTATCCTGACTTATTAGAATCGTGTGTCAGAGTTGAGAGCTAGAAAAGATGCTCACCTCTAGACTGCA  
CTAATCTTAATTAGGAGAAATGGCTGCTCCTCCAGAGGACCAAGATTGATGATTTCCAGCACCTTAGTGGCTCACAAAC  
CATCTTTTAAAACTCCAGTCCCAGGGGATTCTACACTGTCTTCTGGCTTCTGCAGGCACCTGAACACATGGTTCTCAGATAC  
ACATTCATGGAAAACACTCAACATACATAGAAAAATAAATAAATAAATTCATTTTTAAAAAAGAACAGTTACGGAATCT  
GTTCAAAAACACATTTTCATTGACCTTGCATGGGTGAATGTGTCTAAACTCTGTTTAGGAACATATACGTACACATGAAAC  
CTTACTTCCCTTATGCAGTGTGTGAGTGTGCGTATGTGTGTGTATGTGGGGTAGGTTTGTGAGTGTGTGTGCAGGGGTGT  
AAGGGTGTACTGGGGTACTGGGATTGAACCAATGTTTTGCAGATTCTGGGCAAATATTCATCAGCACGCTACACTCT  
CAACTTTATTTTCACTTTTTGCTTTGAGATGGTCTCAATGTGTCAACCATGATGGTCTCGAACTCCTTCTGTAGTCCAGGCA  
GGCCTTGAACCTGCTATCTTCTGCCTCAAAGTATAGGAAGCCAGTTCTCTATGTTTCTTTAACTCAGTGAATCCTACT  
ACTGAACCAGCATTCTGCCCTGTCTTAGTTAGGGTTTTACTGCTGTGAACAGGCACCATGACCAAGGCAACTCTTACAAA  
GACAACATTTAATTGGGGCTAACTTAAAGGTTAGAGATTCAGTCCATTATCATCAAGTCAGGAGCATGGTAGCATCCAG  
GCAGGCATAGTGCAGGAGGAGTTGAGAGTTTACATTTTTGTTCTGAAGGCAAACAGGAGAAGACTGACTTCCAGGCAGG  
TAGGACAAGGGTATCCAAGCCAGATCCATAGCGACACACCTATTCCAACAAAGCTGTACCTTTAATAGTGCCACTCCC  
TGGGCTAAGGATATATAGACCATCACATGCCCTGGGGCAGCAGATTCCATTCTGCTGGTATACAAGAGATTCTTCCC  
ATGCTTCAAGATCCAAGAGGTTTATCTGGTGTCTGATAAAAGATCTTGCATTTGTGCTGGTGTATGGGGATAAGAGAA  
CCTGCGCTACTTCAGGAATATCTGTTGAGACTGCAATCTGAGCTGAAGCTAGTGCCTCTTAGGTGTGAGTCATCCAGCC  
CTTAGGAAATCACTACCATGGGAACATGAAGGGAAGGGTGTGGGTGTCCAAGTCCCTTCAACCCACACGTCTCCTTT  
GTCTTCTTTCTTCTTGCAGTTCAAAGGGAAGAAATATTCTAGGGTTGCAGGGCACCTACAAGGATCACCTATACCACG  
GGTATTCAATTTCTATGTCCCCTTGCCCAGCACACATCTCTGTATCAAGAATACTCAGAATGCAAAACACAAACAAACAC  
CACAAAAATAATGCCATTATAAATATTTCTGGGAACCTCTTGTCTGTATTGAAACATTTCTACATCATCAAGAATCC  
TTTTAGACTATCTCCGACACAGGCGACAGAGGGCCACTTAGCAAACAAGTGGCTATAGTTGAAAAATGGAGCTAGACA  
CCTGTTTGGGTGTTCTAAATGTCTTTGGGTTTCTGGTCTGTCACTCAGGATATAAGTCTCAAGTAGTACTCCCAGCGGC  
CATCTCTTGGGCAATGATTGGGTGTGGCTCAGGAAGGCACACTCCTTGCAGTGGCCAAATGCCATCTCTGCTTCTCTCC  
CTCCCCTGTTTTTATTGTAGCTTTGGGCTGAGCTGAGAACATCTGGGAGTGAAGTGGGCAGAGAGCAGCTTCCCAGGTTG  
CAGAAACTTCTTCTCGACAAGCACAAGGAACCTATCATTCCACTCTGCCAGCACCATCTCTCTGGCACCTGTTTCCCCT  
TCACCTCTGATGGCACGGATGAGAGTCAGAGAGGACTTTTAATTGACTGAGAGCTAGCCCTAAAACACTGACACAGAGAC  
AAGAGTTGGGGGGTGGGGAGGTAGAGACTTAACCAATGTGTTAAAAGGAAATCACATTAAGCCAGCCTCCACCTCTTT  
TTTAAAGACAACATGAGCGTTGACGCATCAGAGATGATGCTGATTCTATGTTTCTGAAATGGCCCTGCTGAAATGTATGTT  
GCTCACTGTGGGAGAGGGTGTGGTTCGAAAGAGGCTGTGATTAGGGTCTTAAAGACCATAACTAGTGGGGAGTGATT  
GGGTCAAAATTTCTGGTAACTGGCTGAGAGGCAGATCTACGGAGGGATTTTGTATCTGCTTTCAGCAATCTAAAATAGTGC  
AGGGATATATTTCTGGTATTCTAGGAAGCAGGACAAGGATGAGTATCTAAATGGCACTTATGGGTCCATCCAGAGCCGA  
GGAGTGGTGGACTTAGGAGTGTCTCAAAAATGTCTTTTCATCTAGTTCTTTAACAGGTGTGTATTTTCTAGTATGACA  
AGTGTAGTATGGCAAGGCCCTGGGTCAATCCCAGGGGTGGGGTGGGGTGGGGAAGGAACTCGATAGCAGCATATT  
AAATGTAACCTACCTGTATTTAATATCCATATTTAAAGATTTATTTTCATGTGTGTATGTGTGTATGTGTGTGCATCTGTG



AAAAGGGAGTGAAAACACTCCTTTGCTATTTGTGAATCCGCTAATATTCTCATGTGTGGGCATACTCTGTTCCCGAACG  
AGTGCAGAAAACAACAGCTAAAGAACAGAAAACAAAACGCAGGCAAGAAAAGAGCCAAAGGGGATTTGCTCCAAGGG  
GATATGAGAGTCTCAGAGATGACTAGGGTATGGTAGGAGACACGGCTGGGGGTGGGGCGGGGCGAGAGGAAGCAGAGC  
TCAGACTGAGTGACGATTGGCCATAGCCAATGGACTCCATCTCCAGTGCCCGCCAGAAAACCAGGAAGCATTGAGTCTCA  
GTGAGCATCCTGTGACTCGGCTCCTTCCAAACGCCCCACAGTTCCTCCTCTGGTTTCCTTCCCTCCTCTTTCTGGTCCCTG  
AGCCTTTGACTATTAGCCTCATGGGTCTCCAGTCATCCTGATAGTGTACTCACTCTTGCCTGGCCACGGATGGGCTATTA  
TCTTAAGCTTTCTGCATTGGTTTTTTTTTTGTGGTTGTTGTTGTCTTTCCCTTTCCGAGACATTAATTCCAAACTTCCAATTT  
ATTGAACCAGATGCAAATTTCTTATCTGACTTTCCAGCCTTGATAAGCTCTCTTGCACTATTTACAGAAATGAATTTCCCA  
TTACTTGTCTAGTCTAGACTTTTCCAAAGTTCAGTCAGATAAAACAAACAAACAAACAAACAAATAAAAACTTGCTA  
TGAAGGATTTGGTTATCCCTTCATTTCCAAGTCTCCTTAAAGGCTATTCTGTGGGCTGAAAGGATTAATTTGGGGCTAAG  
GGAATAGGAGCACTGTCTGCTTCTAGAAGACCTTAGTTCTGTCCCAGCACCAACTGTAGCTAAACACTGCCTGTA  
ACTACAGTTTTGGGGAATCTGACACCCTCTTCTGGCTTTGAGAGTACTGCATACATGTGTTGCACAGACTTACATGCAGG  
TAAAGCACCCAAATAGAAAACAATAAATATTTCAAATGTATTCTAAAGTGATTCTATTTGTTGTATCTCAGAACTATGA  
AAGTCATAGAACATTAAGCATAAATGTTCTAAGATGAAGAAATGACGAAGATTTGAAGTGATGTTGTAAGACTTCTC  
AGGATCTGATCATCACTTCTGTATAAGTGTTTTACAGTACTACATTGTATTTATAATGTACATATTATAAAACATATGCA  
ACCATTATATATCAATTAACAACAAGAGATTGGGCTGGAGGTGTTGTTCAATGTTAGCTTGTGTACAAGCCCTAGGCTC  
CATTCCTGGCACTGCAGAACGAACAATTTGAGTAAAAAAAAAAAAATTTCTCAAAGAATATTATAACCAAAAAAAAAAAAACT  
TTGATCATTGAACTCAGGATTACGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTATGAAGACTGTAATTTGAACATTTAG  
TCGTGTGAAGTCATCGGCATTTAAAAGTGACTTGCTGACGGAGCCTCTTTGATTTATGTTAGGCAGATGTGTAGGGTGTG  
ATAGAGTGAGGACCAGTCATAGACTGTCTTGGAGGAAAGAGTTACTGGAAGCTTGAAAAGCCTTTCACAGTCAAAGCA  
GGTGCCAGCCATATCAAGTTGAAAATTAACGGTTGTTGATGGTAAAGGAAGAGATCGACTCTCAGAGGAGAATTTCTGA  
ACAGTGGGTGGCTCAGCCTAAAACCTCATGGGCAAAAGTCTCAGAATGAGTGGCCAGAGCCAACACTACGTAGGGAG  
GGTTTCATCTGCCAGACAGAACTGTCTCCAGCAGCCACTCAGTTGTCTGGCTCTGAAACCAGCCACTGTCTGGCCCA  
GTTCTAAAACCTGCCATTTGCTTTATTGGGGAGCGGGGTAGGATGACTGTAGGTAGGAGTGCTTGTCTTGGCCCTTGACTC  
GTGGAAGATCACTGGTAGTCAGCTCATGGTCTCTGTAGTTGGGAACATCCTCAGAAGACAAGAAGACACCATACTGCC  
AGTTGTGTTAAACTAAAAAAAAAAAAACAAAACAAAAACAAAAAAGAGGGCTCGGGTGGGACAGAGGGGAGA  
CGGGATGCCAGGGACCATCTTTACCTTTGCCCTTTCCAGGACTGTGATGAGACGCTTGGTTGTGGGATTTAAAGTTAT  
AGCGCTCAACCACACAGCAATTAAGAATCTCCTCCTTAAAAGGTCTATTCCATATCATCAGCCTAGGTTTTACTTGAGCT  
GTTACAGCTGGTGGGTGCATATAGGTCAGAAGTCCAGACTCTGGTTGTGGCTGTTACAAGTTCTTTCCCTGGAGCTGAAA  
TCTGGCTCCCTGTGACTTCTAGCGGAGCTGTGTGCTTACAGCAGCAGCGTCCCCCTCTCTTCTGGGGGAGCTCTCACT  
CTCTGCCCTTGGCTCTCAGATCTGCAGCCCTCTCTCTTTCAGGTTTGTTTACCTGGGTCTTTTCAGTGTTCCTCATTT  
ATTTCCCATCATCTCTAGTGAACCGTCTGCCTTTCACCTTGATAAGCTCCACTTCTGTCACTGTCACTCAAGTCCAACCC  
TCACCTTGCTGTACAAGAGGTCACAGTGATGGTCTGATCATCACAGATGACGGCGGGACAGATGCTAGTTAAGACAG  
AATTAATGTGGCTTGGGGTGTGGCTCAGTGGTGGGATACTTGACTAGTGTGCCTCAGGCCCTGAGTGTATCTCCATCGTC  
CTCTGCCTCAAAGAGAAGGACCAATTAATGTTGATGGCTATTATGTCACACTAATACGGCATAGTTTGTATGCATAA  
GGTATTTCTCTAGTTCTGTACTCCACTTACACAGTCTTATCTTAAAACCCAAGCTAACCCCTTACAGGGCTGGTCTGATT  
CCTATCTCTCCTTAGGTTTCAATGAATATTTGCTTGACTAGCTTTAGGTTAATTATTAAGTCAATTTGCATATTTGAAATGAAT  
GGTGTTTTCTATTGCTTTCATTTACAGTTTTAATAATGTGTGAAAATAAAACAACAACAATAAAAAAATGGAGAG  
TCCCATAGTACCCAGAGCTCTTGTAGGTTTTGGTCAACTTGACACGAACCTGGGTCATCTGAGTGAGAACTGGGTCCCTT  
AAATTGGCCTGTATGCAAGTGTGTGGGAGCACTTCTAGACTAGTATTGATGTGGGAGGTCATCCAATTTGGGGAGG  
TGGTGTGGGGAGTAAGAAATGAGAGCCTGAGGAGTAAGCCATGAAGCAGTGTCTCCCATGCCCTGCCTCAGTGTTC  
CTTGCTCGGGGTCTCTGTTTGTCTTACTTCCCTCTATGACAGCCTGTGATTGTGACATGTAAACCAACGAACCCTTCCC  
TCCCTACATTTGCTTTTCTGTGCCTTTTATCACAGCAGTAAAAGACAAACTAGGACACCCAGACAGATATGCTAAGAAT  
GATTCAACTGTCAATGAATGAATGAATAAATGAATGAATGAACTAACCCCTTGGTCATGATTAATCCATCAGCATAGC  
CCATTGGTTGTAGTCTTATCTTGTATTAATCCACTTCTACTTTTTTTTTTTTAAACCACCACAGATCAACTAGCCATCAC  
TTTCACTCAAACACTCACTGTGAGACAGGCTTCTCGAATCTTCTGGCTTCTCTGATACTCAAATGTTATAACAAAAACAA  
ATCTTTTTGATGTAGAATTTGATTATGCACTCTGCTATTATTACTTTAGTCATAATAAAGAACAAAATCTTTAACTAAC  
CCACAAGGCAAGTGTGTTCTGGCCCATGCTGAGCTTCTTGCCTTGTCTCTCACTCACCTGCATGTCAACCACAGATACTC  
TCAAATCTTCCCCCTGCCAGTGCCTTTGATGTGATAATTACTTTGGCTCAGAACCTTTCTACCTTGTACCCCTCCCAGC  
CCTTCGCCTGGTTAGTGCCTCTGGCTCTGTTTCTTTAGATGTACATTACAAACGTTCTCAGAGGCAAGGCTGGACCATT  
CACTCATACAGTTCTGGGTTTCAAGATTTGGCCTCAGGGGATTCTCCATTTCTGTGGTAAACAAGGGCCTGATTTGACT  
GCCATGAGTGGATGGCATTGTCTGGTAGCTTAGCAGATGCTGGTAGCTTAGCAGGCTACGCTGAGCTAGGACTTTTGC

CTAAACTTACACATGGGAGCTCTGGCACTGTGATGGCAGGACAGAGGAATATCTTACACGGTGGGCTCAATCCTTAGAA  
AAATACATTTTTAGAAGGTCATGTAGGGTGGGAAGGCTTTTTGTGTCTCAGAAGTTTCAGAACATTTTTAATGCTTCATCC  
TAAGTTAGTTAAGGGCCAACCTTGGAGTCAGGAGAAGTGATTAGACTCCACCTCTTTGTGGGAGGGTATCAGGACACAG  
GTGGCAATACTGAAGCTGCCACTTTATCCTTCAAATAGCACTTTAGACGAGTCACATGAAAACTTTCTTCAGCACCACGC  
AGACCTCTTGGTAGCACTCTTCATTGTAATAATTTTATATTTGTTTTATGTTAATTGACAGTTATTTGCTCCTTGGCCAAA  
CTAAGCAGCTGTACTAAGCAAAGCCATCTCTGACTTTGCTCATCTCTGTCCCCAGCACTGAGCAGAGTGTCTGGCTCAA  
TGAATGTCTGTTGAAGCGTGAATGAACACAGCACCACCCGAACCTTGACGGCAGTGATTGCGCACTGTTCTCAAGCGCGT  
CATTGTGCCGAGCCTTGTAAACAGTCGAAAGCACAGGATCCCAAGCGATGCCTATCCTTCACAGTTCAGAACTTCAGA  
TGAAAGGAAACAGCCCCACCCTTTCTCTCAGCGTCTCAACGATAAACTAGCTGCTGTTAGCATGCGCCTTTAGCTTTT  
GGGACTCTGTGAAGAACCCAGTACTTTATGGCGCAGTAGAGGGCAACAGAGGCTCCAGCAAGGAGTGTCTTGGGATC  
TATGTCCCTCTGCCAGCAGATGGATCCACCACAGTAGGCTTGTGAGCCGTAAGTATGTACAGACATAGAGGAGCGACC  
AGGCCCTAGTGCCTTGGCGACCCGATTGGGTCCTTCTCTAGTGCCATGCCATCTGCTGATTGCTCCTAGCAAGAAC  
ACCGTACACCTCGGGAGGAGCTAAGTGTGCGGCTCTCCACGGTGTTTCCAGCTTGACTTATCCTGGACACCCTGCCTT  
TCTTTTTAGTGCTATTTGAAGGATCCAGGCCTATGTATCTTTACATCTCCCTAGACCTTAGAAGAAGCTTTAATGCTGAAA  
ATACTCAGTAAATATTTGCTTTAAGACAGTGAATGAGCAACCTAGCTGAGACAATGCTCCTCTTAGTAGCATTTCCTAC  
TACCTGGTTACCGTAAGTTCAGGGCAAAGTCTTTCCATTGATGGCCTCTGATTGCTCCAGGGAACCATTTCCCACT  
TTCTCTTCAGAACAGCGTGGTCTTTGTGCCACCTCATCTCCCCTTTCTGCTCAGCTAGATCCAGTGCTACGTAAA  
GCCTGTTGCTGTGAGGTGTGGAACAGGGTAGTGTCTACCTGGCACATAGTAGGTGCTCAAGCAGCATCTGTGGAATGA  
TTTGCTACTAGAACAAAACCTCCCATGATGCAAATGGAGGCTTTGACCCCATCTACCCACCTCAGGGTCTCCCAAGG  
GTCTGTAAATGATTTTTAGGGTATGTTCTGGTAGTGCCTGTCTCCTTATCCTGCCAGTGGGAGATTGGAATCTCTTTG  
CTTGCTGCCATGCACTACTGAATCTGGTTGGCATTGTGTTAAAGAAAAATCAGTAAAGTTGGATCAGTTTGAATCTCAG  
TTCTGCTATTACAGTTTCATGGCCTGAAACATATCTTACCCTTTGAAACTGGTCTTCATCTGTATTATGGGGTTAAAC  
ATCTCACCCAGACATCAGAAACCAGGGTGTGGTCACTCACCCACCCTTACTTGTGTAAGAGTGTATATAAAGTC  
AGCGAAGATGGTATTACCGGCCTTTGCTTTCTAGACTGTAACCTCTCCCCCATCCCCCTCCCCCTCCTCCTCCTCCTC  
GTTTTTGGATGCTGAAGACAAACATCTTTATTAAGATACTACCAAAATTTGGCAAACAACCTTCTTGTGTGAACAGTC  
TTCCTTTTTAGGCTTTTCGCTAGCTCACCCACCCTCAGACCCGATTCTGCTTCTAGTGACAGAAATCTGTCAGAGAATCC  
CCCCATAAATCTTAGGTTCTTCTCCTCCTCCATTGCGTCTGCTGAACACCCGCTCTGATAGTAAGAATTTCCATTTCTTGGG  
CCATCTGGTAAAAGCCTTGTGTTGGTGTGGAGTTGGGGGACGGTTCATTCTGGGGAAGTGACAGCTCTGTTCTGAGCC  
AACAAGAGTGGAGAAGCTAGCTTCTCACACACACACACACACACACACACACACACACACACAATTTCTAAA  
GGAAGTTGTGTCCGTGTTTTAGGAACGGGCAATGGAGTGTCTGCCAGGCTGGTATGCAGTCTCCTTGTGAGCATTCGTG  
ATGCTCCTCTAGGGAACCTGGACTGTCTGGCAAGGCCAAAGTGTGAGGTGTAGAACTTTGCCATCCTCAAGCTCTAAAT  
GGCTTTTGTGAAGCCTGGCTTACTGTGGGTAGTTTCAGGGATCATGCATTTGAGACAAAACCTGAGCTATAGAGCAAGAC  
CCTCTCTCAAATCCTTACCCTGCAAACAA  
ACAAAAACAAAACAAAACAAAAGCAAATACTCACAAAGCTGGTATCAGTCAACTCAGAAAGTAGTGAAGGAGGCT  
GATGTTTCTAATCAGGAAAAGACAAGTTTCCAAAAGAGAAAGTTGCAACAGTATGGACTTCTGGGCAGGGCCAGAGT  
TTGCCCCACCCAGTGAGTTTCAGGGACTATTTGTTGAGATTTTGGAAAGGCTATTATGCAGGGGCTCTCAACCTTCTAAT  
GCTGAGACCCCTTAATACAAGCTGTGGTGACCCCAACCATACAATTTGTTTTCATTGCTGTTTCATAACTGTAATGTTGGC  
ACTGCAATGAATCGTAAGTAAACATCTGATATTTCTGATGCTCTCAGCAGCCCTGTGAAAGGGTATTAGTCCCAAAA  
GGGGTCAACCCACAGATTGAGAACGCTGCCGTAATGGTTCATGTGATTACCTGAGTTAAACTAATCAATTAAGTTTA  
TAGCATAGGGTCAATTTGATTGGAGACCTCGTGTGTTGACATGTCAGGTGGGAAAAGTTCTCTGATTAGATCCAGTGT  
GTTGACTTTTCAGGTATTATACAGACTCCTATATTTAGGGAGGAATTCAGACCTAACAAGGCCCCAGCCTTCAGATCCAT  
GATAAATAGGATACTGTGAGTGACTTACTGTGACAAAATAGGCAAGGGTCCCAGGCTCTGCCACGTGCCATGTCTGCT  
ATAGCTCAACTGACAATGCTAAACCCTAACATCCATTACAGTACTGGGAGAGAGGGAGAAAGCTACTGGGAGCTAGAC  
ATTTGGTTCTCACACAAAACATCTAATATTTTGGCAGCTGAACCTTACTTGTAAACATTATCACAAAAGCTGCTAAATTTCTATA  
TGGGAAAAAAAAAAGAGCTTCTACAGTTTAAACAAGAGAAAGTCAGACTCAAGACAGGATGCGGGGAGGTGGGGCGGA  
GAGGGCTGTGTGACGAATACGTGGCGTAAAGAATACAAACGTATTAATCATGTGGCAGGATACTCAGATTACATAAGAGAA  
ATTTGTTTTGAAATAACAGTGGAAACCACCTACCAGATGTGGCTTAGACTTTGAAAAGCAAATCAGAAAAAAAAAAAAAT  
GTCGCCCAGGATATGGAGAAATCCGTTATTGGTTGCCTTTGATGGGAATGTGAAGTCTGGTGGACAGTGGTTCCCTCAGA  
GGGTTTAAATAGAACTCCATATGACCTACTTCCACTTCTGGTTTGTATCTAAAAGAAGTGAAGCAGAAAACCTGG  
GGAGAAATTCGTACACCTCATGTTACAGCAGCAGTCTTACGGCACTAAAAGATGTACATAAATCAAGCAGCCCTCTG  
CAGATGGGCACAGACGCTGAACCCGGTGTGAGCATCTCAGAAGAGCAGGGATCCCAGCAGGCTCACAATGAGGATGG  
CCCCCTAAGGCAGCGCTAAGTGAAGCAAACCCACCACAGAAAGCTAAATACTGTAAGATTCCACTTCCATCTAAAGAAC



TCAGGTCCATGGAGACAGAAGGTGGTTTCTGAGACCGGGTGGGGAGTGGGGGGCAGGAAGGAAAAATGAGGAACGAT  
CGCTGTTGACTGAGTCCAGATTTCCATCTTGCAATGTGAGAAGACTTGGGGATACTGTGATGTTGATGGTTGCACAATG  
CAAATCTTTCATGTGCTGCTGCATGTTTGAAATGATCAGTCTAGTAAACATTGTATGATTTTACCATATTTAAAAAAC  
TACGATGAGAGGGTTGAGGAATTCAGTCAGTGGGGCACTTGCTGGCTAGCGCAAGGCCCTGGGCTCAATTTCAAGCAC  
TGTCAAAAATGTATAATGAAGCGTCATTTTAAATCTTAAATGGTACAGATCAAAAATTCACAAATTTGAAAACATTCCCC  
CCCCAAAACATGTGAAAGTAAGTAGTCTCCTGTCGGTGGAAAGTTTTAACGTATAATTGTGGAGGAAAATCTTCTGTATC  
TGTGAAAACATAAATCCATTACTCGTCAGCTCTTGGTCAAGAGATTCTCCTTCTGAGAAGTGGCCAGCTCCTGCAGGTAT  
GAGGCAGAATATAATTTGGGTTTTCTTTACAACAGAAAATTAGGAGCAACTAATCAGGCTATTTGCATCAAGTAGATTA  
CAGCAGAATAGTATGCAACTGCTAATATGATAGTGTAAATATTATGGATATAAAAATAATCCCTAAGCTGGTAGCATCTA  
TGTAAGATGATGATTGAATGCTTCTATTTGTGTTTTAAATCAAACGCTAATACATGTGGATCTGAGTTATTACTTTGTT  
GTATTTGTCTAAAATAAGTGAAGGCAAGAACTGAAAATAGGTAAGTGGTCAATCCAGGCACACTTTGGAAAGAAAGTTA  
GATGGCCAGGGACCAGAGTCCATAGGGATCCTGGCTTCAACTATTTGTCACCTCTGATAGCTAATAATGGCTGCCAACTT  
GAATCACAATCTAGAATCTGGGATGTTGTAAGTACTGGGTTATTTCAAGCCATCTCAATGCAGCCTGCATCATTGCG  
TGGGTTGGGGTCTCAGGCTGAATAAAAATGGGAAGGCAAGATGAGTACCAGCATCTTCTCTGCTTTCTGAACTGAGGGT  
ACAATGAGGCTGGGTGCCTCCACCCCTGCCCCACCCATGATGTCCCTGAAATTATGGGCTGCACCCAACTGTAAAG  
CCAAAACAAGCCTTCCCTCCCTTCTTATGTTGTTTTATCAGATATTTGTTGCAACAACAGAAGAATTAAGTATACCTC  
ACCATTACTTTAAACAATCAAACAATCAAACAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAAC  
AAAGCTCACTAGCCTGGCCTAGGATTCAGTGAATAGATGAACATTTACCTCTGCCTCCCAAGTGTGGGATTAATAATGC  
ATCTGTACCATGTCCAAGACTCAGCTTTACTTTAGCATTTCATGTTATGTTGATATATAATCTCTAAAAATTTCTTAATTA  
AAAAAATACCCTCTCGAAGGATTAAGCACACACACAAAATACACACACACACACACACACACACACACACACACACACA  
CTGTTTAGCCACTGCCCTGTGCCAAGCACTATAAGAAAAGAAGGAAGTATACAGACACGACCTGAAGGATGGAGAAT  
GGCTGTAGACAGTCCACCCTCAAGGGAGAAATTTCTGCTATTGAATGAATAATACTTGTGTGCTTCCCAAAGCACCAC  
TTTCTTTTATATACAAAGCTGAGTAGTAATCCACCTGCTAGGTTTCCCTTTTATATTAGCCATTAACCGCTGCAAGCC  
AAATTTGAGTGCACCTAATACTAGGTGGTTCATTCTAGGGTAAGCAGTTAGCGTGGCCTTGTATTGGGATCTGTCCA  
AACTTTGGTAAATCGATTTGTTTCCCCACCAGTCTAATGTTGGTCTTTATCCTGTGCTTCTAGTAAGCTCTAACATCTTTTG  
GTCTATATCGAGCGGTTGAGTCGAGAAGCAGAGAGAAGCGGAGAGGAAGAAGAACTAGACATTATAAAGTCTTGCCTG  
ACGTTTTTTCTTTAGCATGCCTTACAGATGAAGTGAATGATGTCAGGTAGTTAGACATAGGCTTCAATTTCACTTATGGCCA  
GATGCTCTGTGCACGAGGCCAGGAAAGTGTGGCAGCTCTCCCGTGACTTTCCATGCACGCGAAACTTTGAAAACC  
ACGGGAAAATCAAAGGAAGTTCGATTTACTCAAGGGTCTCGGTATTCTCTCATATTTCCCTGCATTGGTTGAGACAAAAG  
TAATGCCTTGTCTACCATAGAATGTCCCACAGCTTTGTCATCTAACATCAAGTACTTCTGGCTAATGTCACAGTCTCGAT  
CAGCATGGGAAGGGTGTGGAGGGGTGGAGAACGCTGTTTTATACTACTTCACTGCTGGAACTTAAAGTCTCTGCCTTTATG  
AGACGTGGGCATCGTATTAGCCCTTGCCTTTTCTGAGATTTCTGAGTCTGGGAAGGAAAAGGAGAGAGGAGTGGGG  
AGGGAGAAGAGGGAAGGAGGAGGAAGGAGGTAGGGGAGAGAGGAAGGAAGAGGGAGGAGGAAGGAGACCCTGT  
TACCATGTTTGAAGCAGCAGACATATTTCTGCCCCAGTATCATGGCCTGCCTCACTGCAAAGGAGGCTGGGAAATAT  
GGCCTGTGTATGGAGCTAGGTGGGGAGAAATGACTTCAGTGAATGTGGGAACCTACACGAATTTTAAACTCTTTCTAG  
TTCATGTTTCAGTGAACAATGTTTTAGTCTCACTTTCTAACTAAGTTTTATCTTGTCTTTTTAAACTCCAGCACCATGGG  
CTTGGCAATCCTTATCTTTGTGACAGTCTTGTGATCTCAGGTAAGAACCCTTTTCTGTGTAAGTCTGGAGTCCCTTCTGC  
TGTCAATCAGTGAATCAGAGCACTGAAAGCCAGGCCTGAGAGTGTGGTATGGTTGCTCACGTTGACTTGAGTTGC  
CGAAGACTCCATAGCAAATAGCTTTCTAGAGAGTACGGAAGGATCAGGACCATGGCCAGCTGTCTGGGCATCTTCTCC  
TCTACAACCAACCCAGGACCTCAACACACAGCACAAGGTGGAGTGTCTGTCCAGGACTTTAGAGGGGTAAGAG  
AGCCATGACAGTAAAGCCTTAACTTGACTCCA  
CACATCTGGTCTTTTCACTCCCAATTTTCACTTCTCAAGCCCTTAGAAAATTGCTGACAGCTTTCAAAGGCTTCTTCTTG  
TAATACTGGCTCACCACCACATCTTCTTCTTCTAGCCTGTGCCCTAACTCATACTGGTCTGCTTTGTGACTCTGGACCTCC  
AGTTAATCATGCCAGCCACTGTACCAAGCTAAAGTAACTAAGCTAATGCTTCAGGGCTCCCCCTCACACAGGCTCCCC  
TTTCTAACCCCTAAGGACCCAGGAGGACCTCAGCACTATATCACATATCTTACAACCTGGTAAGATTTGGATAAGATAG  
CCACAATTAATTACGATTGCCTCCCCCACCCTGACATCACTGTCTCTGCTGGGTGACATCTTGCAATTTGAATTATGT  
GTTATTTTTCTAAAAAGCTCACTAAAGTTTGAAGTGTGAGGCCTCCCTGAATTCAGCCCTTCTGGCTCTCTGCTCTCTG  
GGATGCACCCATAAACAGCTGGCTGGAGGCCTTGCCATGCATCCTGCAACTGAATGCCATTTTGTCTGCTGGCCACTC  
TTTCTGTACTCACTTTCTTCTACCTCAGTGTGACAGAGAAGCCATCTCAGTCTTGGTATCAGCAGACAGGATAGGTGA  
GCTTCCGGTGTGCTGACAGCTGACAGGCCACCCCTGACCACCTGGCCTCTGACTAACCAGCTCAGCCACAAAATCACC  
TCTCTATAATTTGTACACAACAGTCCCTTGGCCACTGCCCTTAGCCCTGGCAGGGTAAAAGAGGAGGAGTTGAGTATTAT  
GAAGAGATATCCCTTTAGACCTCAGCAGATACAGTCTTTTGTGATTTGTGCTTTCTGCTTAGCACTCAAGGCTTGCAGAG



TGATATTCTGGTGAGGTCATAGACTCACAAAGTGGGACTCCAGGGTTTCTGTCTGCAGAGGTCCTTCAGTATTCTTG  
ATCACTGGTTCCTGAGTGGGAGATATGTGGCTGAATTCCTGTGTCTTGGCTCCTGGCTGCATATAACAATCAGTCATA  
GCTAAGTCTAAAGCATTCTTTAAACCCACATGTTAGAAGAGGGAGGATTTCTCAGTGTCTTCCACCAATGGAATTCTAGG  
GAGTCACTTGTCTTGGAGCCCAAGTTCTGGGGACCATAACAGTGGAGGCCTGAAGGCACTGGGAAAAGAACAGACCTT  
GAGTCAAATCTTCCCGATATGGTCACAGCTAAGATATGTCTGCTTGGTTCAGAGTACAATCAAGACAATCAGGGTCTGAT  
GACAAACCAAGCATGTGGAATGTGAAATACTTTCAGTTCATTGCAATGGCTACAGAGTAGTTTCTCGCCCCGTGGGGA  
GGAGAAGGGGACTGGAGAGGTAGAAGTGTATGTGGCTGGTTATCAGCTCTGATCCCCTCAGCTTCCCAAATAGAAGTTC  
ATGGTAAAATGCAGGTTCTGATTCAGATCTTGTGTGGAACCAGAGAGTCTGTGTTTCTGACCAGCCCTCAGGTGAGGCCA  
AAGGCTTTGGTCTACTTTTTATTGGTAGGTAAAGAGGGAACTGAGGGAAAGATGAAGTCCCTGTACTTTGTGGGAGAGGG  
GGACTGGGTGACAGAAAGTTGGAGAGGGAGTGAATGGAAAGGAGATTGGGTACTCTGGGTCTCCACAGAAGAAAAAGAG  
TCTGTGTGTGAGCGGATGTAAGAATCTCAGAGTGAGTTCACTTCTAGACCCAGGAAGTGCAACTAAAAACTGGGCAATA  
TAAGAACACACCAACCAATAGCTGGCCAGTGCTTGGCTCAGCTGCCTGCTTGGTTTCTCCATCAGAAATCATTGCCCCAG  
AATCACAATAAGTTAGAGCCAAACCAGAATATGTCTGCCCTCCGCACAGTCCACCAGTCCCTCACCAAACCTTCAACATT  
TACAGTAGGTGGCACTCTTCCCTCCTCACTTAAGAGATTAGCAGAGGTGGAACAAAAAGCCAAATACAATAAATTTTTCTT  
AGGTCAATTTTTGGTATTGTGGAACTCAGTGATCTCCCTCTTCCCTCTGATGCAGACATGCATGTGTCTTACCGGATG  
TCTGGAGTATCTCTGAGACCCCTTGATTGTAGGTTCTCATGGGGTGTCTGCTTTGCCAAGTCCATGCCATCGTACCTGC  
CTATACTATTTCTGTTTAAAGGGAGGCTAATTGGTCAGGTCAGTTAACTTCTGACTCACCACCCTGTGAGTGGGACTC  
CTCATCTCCCTCACCCATCACTGGCCCTCCCTTCCCTCCCTTCTGAAAGTCCCGAAGGACGAGCTGTTTTATGAAGACTC  
TCCTCCATTCTTCTCCCCATTGCAGCCTCCAGCTTCATATGAGCCTTAAAAAGGCACACCCACCTCACCTTTCACCTTTCAC  
CTTTCACCTCTCGCTCTCATCTCCCTCTATTTATTTCTTGGTGTGAGTCTCCAGCAATTCGTGGCTAGAAAAAGTCCCA  
TAAGCTGGCTTATGCCAGTGGCTCTCTCTGAACCTTTCCATCATTGCTCCCTTTGGGTTCTAAAAGTTCCAGGGCACT  
GCAGCCAGGAGTAGCCATTGGTTTCTCAGGGTTCTGCAGTATGACAAGGCTCATCCTCACCTTCCACATACAGTTCT  
CTCCAGCAGCTTGTCTCATCTTCTTAAATATCCTGACCTTATCATCTCCCAAGAGCCATTACATTTGCCAGCTTCTTTT  
CTGGTCCCTGAAAAGATTCTAGAGAGGTCAGTGAATAGAGACATTGCTTGCAGTCTTCAAAACCCCTTTTT  
CTCTGGCTCTGGGAGTGGAGGCTGTGGGGCAGGAACTAGTTGAATGTCAAAGAAGTGAAGTCAAGTGGGCTCCCAAATA  
ATGGAGACTAATAAAAGGTGGTAGCAAGTGAAGAACCATCCATCATCAACAATCTTTAAAAAACAAAAACAAAAA  
CAAAAAACCCAAAAAACCAAAAAATAGCAGACCAAAAGTATAAAGGGATTGCATGGGGCAGGCAGGGTTTAGGCAG  
ATGGCATAGCAGTTGTGGAGGCTGTAGCAATTATGATGATGGTAGTCAATGCTCTGGTTTTGAAATTCGCAGAAGCACA  
GAGAGAATCTAGAACATTACTACAGACCACTTCTTAACTGTGGTGAAGAAACAGATTACAAAAGTTTGCAGCCTGCACA  
TGTGAACCAAGTGGAGCAAAACGAAAGCCTGAGCTTCAGACGTCAGCATGGATGCCTGGTTCCAGATCTAGACCCA  
CCTCTCCAGTACTATCACTGCCTGACAAGCTGGAAGCTGGGTGCTGTTTCAGAGCAAGGGATCTTCTCTTGTCTCCT  
CTTCTCAATTTCTCAGTTTTTCTATTTTAGATGCTGTTTCCGTGGAGACGCAAGCTTATTTCAATGGGACTGCATATCTGCC  
GTGCCCATTTACAAAGGCTCAAAACATAAGCCTGAGTGAGCTGGTAGTATTTTGGCAGGACCAGCAAAAGTTGGTTCTGT  
ACGAGCACTATTTGGGCACAGAGAACTTGATAGTGTGAATGCCAAGTACCTGGGCCGACGAGCTTTGACAGGAACAA  
CTGGACTCTACGACTTCACAATGTTGATCAAGGACATGGGCTCGTATGATTGTTTTATACAAAAAAGCCACCCACAG  
GATCAATTATCCTCCAACAGACATTAACAGAACTGTCAGTATCGGTATGTGGTCAAGTGTGTTTATAGATTGTGGGCTG  
CTCAGATGAGACCATGACTGAGCAAAAGAAACATTGAGGGTGGATATTTGAACAGACTGGAAATGAAGGCAGAAGAGAG  
TCATTCTAGAAAGTCCATTTGGAGGGAATGTGGGGTCTGAGAGTGGGGAGCTGAAAGCCCTTGTACTTTGACAGCTTG  
TTTCTTGGAGATCAGTGAAGAATTTTTGAGATAAGATAGGGCTAGGTGAACAAAGCAACACAGACAGATTATAACAATG  
GACAAATGTAGCCACTCCTTCTATTTTCTCTTTTAGTCTAAGATTTTTTCCACCCGTAGTAATCTGGGTCTCTTGGTTTATC  
TCTTAGGGTCTGTCATTCTGAGAATAGCGTATAAATGGAGCTGAACTTTAATCTTAAAGATGAACCTTTTTTATTTCAGCA  
AAATGCCTTTTGTGTTTCATATAAGTTGAGTGTATCAAAAATTTGGAAGTTTTATTTTTTTAATTGATGAATTCATTATA  
CTGTCAATCACTGAAAGATACTGGGTTGTTCCAGTTTGAAGCTGTGACAAACTGAGCTGCTATGCAAGTGTGAGCCTCT  
GTGTGGATGTATTTGTATTTCTTAGTGTAGATTCATTCTGAGGCATAATGTTGCTGGACTCGAATGAATTCTTACGAAC  
TTGGAAAAGGCAGACTGACACCTTTTGAAGAAATAATCCTCTAGAATGAACCATTCTAAATCCACAGGATAAACCCACAG  
GATAAAACAGGCAAAACCCAGACACAGCATGGAGGGTGTCTCTCTTGGAGCTGACTTGATTGAGTGTGGTACAGGGC  
TTCCATTTAAACAGGTGCTAAGTTTGGGTTCTCAGGGTGTGGCAGGCCCTTTGGAGAAAACAGTGTGTTTTAGGAGGGGG  
CACAGACCAGCCTTTAAACAGGTTGTCTATTCTATTATAATGTGTATCAGTACTACAACCTTAACTCATGACTGCAAAAGA  
GATTGTTGATGAAGCTGAATGGACTCTAGCAATCTTACCAAACATCAGCAGAATGTTGAGGGAGCACAATGAGATTGCA  
AAAACCTAAAAGAGGATGGCATGCAAAATGACTTCCATTGTTACATTGTTACATTGTTACATTGTTACATTGTTACATTGTT  
TGCTTATGAGTTCCGCTTTAGTGGCTGAGCCATCTCCAGTTTCTGACTCAATTATCAACTAATATGTAGAATCCACAC  
GTGTCAGGTCCAGGATCTTTGTGCCAGTGTACTTCAGCCCTAAAAACACACAGTGGTAAACAAAGAGGAGAGATTTTG

AATTTGCCATATGAATCATTTTTTTTCAGCAGAGTGGTCTGCAACCTTCCTAATGCTGTGACCCTTTAATATACTTCCTT  
ATGTTGGTGGTACCCCAACCATACAATTTAGTTTCTACTTCATAATGGTAATTTTGTACTGTTATGAATCATAATGT  
AAACATCTGATATGCAGAATATCTAATACATGAACACCCCCACCCCGCAAAGGGGTCACAACCCATGGGTTGAGAAT  
TACCACTGTTACAGCACATAAAGTTAGACTATGATAGTCATGTCAAAAAACCAACAATCTAAGTTTGTAAAGCAGAAAAGACC  
TCCCTTATTACTCTTACTTGTAGGTTCTTAAAGATGAGACCCAGAGCATGCAAGGACCATAAACCTGTGAGTTCCTGATG  
GAAATTTACCTCATCCCTGAGTGGGAAGGTGAGATGTTTCCCTGTGGGAATGGAGGCCAGATAGTTAGAGTTGAGACCCC  
AGTTCCTAGAGTAGTGGCTTCACTATAGACCTTGGTAAGATAATTTAGGTAGCCTATGTCTCAGAGAGCATTCTCTAGAG  
GAACAAGTAGATGTCTTGAAGATAAAGTACGTTTATTATGCAGCCCTCACTATGGGCTGAGGCCACATGGAATATAC  
CTTGAGATGGTCAGGCTATTCTGATCAGAAAAGTGGCTGTGAGTCACTTGTCTTCTTGTATCGACATCTACATTTAG  
GTTGACTGATTCCATCTTATTCTGCTTCCAGCCAACCTCAGTGAACCTGAAATAAAAAGTGGCTCAGAATGTAACAGGAA  
ATTCTGGCATAAATTTGACCTGCACGTCTAAGCAAGGTACCCGAAACCTAAGAAGATGATTTTTCTGATACTAATTC  
ACTAATGAGTATGGTGATAACATGCAGATATCAAGATAATGTCACAGAACTGTTCAGTATCTCCAACAGCCTCTCTCT  
TTCATTTCCGGATGGTGTGGGCATATGACCGTTGTGTGTCTTGGAAACGGAGTCAATGAAGATTTCCCTCAAACCTCT  
CAATTTAGTAAGTCTGCTTCTAAGTATTTATTTACAAGGTGCTATAAGCAAATCTTTTATCCAAATTATCCAATGTTT  
ACTGATTGCTGAAAAACCTTCTAGCAGACCACTAGGAAGGAGCCAAATAGAAGGCTATTTTTACATTTTCTGACTCAAG  
ATCCAAGCTATACTTGAAGAAACATGGTCTTACCCCTGAAAAGTACCCAGTCTTTGGAATTATCCTTGGATGGAGGACAA  
TGAGATGCTGTGGATACAAAATAGAGGATATTTCTAGCAAGAAGCTTTCAACTGACTAAAAACACACACACACATAC  
ACACAAATATATATATATGACAATCATATATACCTGCCTCTCAATGGTACTTATTATGCATATAGACTCATTGTAGTCATT  
GTTGGCTGTAAAGCTGAAAAGTCTAGAATATCTTCTAGTCTTGTGAGACTCTCCAGGAAAAAAGAAATCCACGATGTA  
CATATATGACAACCAAGTTTTTTTTAAAAGATGAAATTCAGTCTAAATTATAGCTCATGGAAACAAGTGCCTAAATTTA  
AAACAAGCTGATCATCAGTTCTATGAGCATTGAGAGGCAAGATCTTTGAAAGTCAATGTAAGTCTTCTAAAGGCAC  
TGGGGCCTTATCCTACTGTAAAACAGTTACTGATACTGATAACAGACTATTGGACTTAGTAAACATGACAAAAATAGAAG  
GGAGGGCGATATAGAGTTCTCTATGAAAGACCCTCACATTTGCAGTACTTTCTGCATGCTCAGCCAGTGAAGAACAC  
AGCAAATAGCTGTACCCAAAAGGAGCAGGAAATATGTTCAAGAAAAGACTGAGTGAAGGCATGCTTGCAGCATCTTCT  
TGATGTGCTCCACAGTATGAAAGAGAGGTTGAAACTCAGTGTGAGCTTTGCCCATAGAGAGCTAGCCTAACCTGTA  
CCCCACTTGTGACAAGCCACCATTCTTCTAGAATGAAGGCACTCGGTTCCCACTTGTGCTCATCATTCTGTTGTTTA  
TTCTAAGGTTTATCCCTTCCACACCCCAACCCACAGCCACCTGCCTTCTGCTTCTACGGTCCCTTTTCCAGCCC  
TCTAACTATTTTGTCTTCTGATGGCACCATCCATCTTTTCTTCTCCCTGGCTTTGCCTCGCTTAATCTGGTG  
GCTCCCTCAGGAACCTGGCTATGGGCATACTCTGAGAAACATCCCATGGCTAGCACCTACACCCTACAAGTGAAGCTA  
CCCCCTCTCCAGTACTGATTTCTTTTGTGATGATCGCAGCCACTCAGAATCTAGTAAAAGATGTGGTCACTTCAAGCTG  
TCTGTTGCTCCCACTGAAACATTTTCTAGAAATATAGAAGATACTCTAAGCCATACCTGAAGCTTATCGCCTTCAAGTA  
ACCACCAGCATCAGGCTTCCCAACCTTGTCTACAAGTGAAGGCACTCGGTTCCCACTTGTGCTCATCATTCTGTTGTTA  
TAATATCTTAGAAGTGGCCAGTACTACCATCCGAAATGCTTACGCCCTGGTACCTCATCCAAGAAGTGCATATCT  
GTGTCCTAAATCCTTGGCTGACCAGAGATAGGTTAGCTATTATCTTAGTTATGGTTTTATTGTTGTGAAGAAACACCAT  
GACTACAGCAATCTTATAAAGGGAAACATTTAATTTGGGTTGGTTTATAGTTTCAAGGTTTATGTCATTATCATCATGG  
CAAGAAATACAGTGGTATGCAGGCAGACATGGTGTAAAAAAGGAGCTGAGAGTTTACGTCTTGTCCACAGGCATCA  
AAGATCATAGCTTCAAGCAGGAGCTTCAAGTCTGCCTCCCACTGACATACTTTCTTCAACAAGGTGACACTTACTTC  
AACAAGGCTACTCTTTTCTAATAGTGCCACTCTTTATGGCCAAGCATTCAAACACATAAATCTATGGTGACCATTACTATT  
CAAACCACCGCAGTACTGAATCTTTTTGTGTATCAAAGGCAGAAAGTCTCCATATAAGGCCATAACCTCCTTTATTGG  
AAATCCCAAATAGATTCAAGTGAAGACAAAAGGGACACACTCAAAAAGGTATTAATATGGTCCACAATGCCAATAATTA  
TTTTCTTACTATTCTAGGAAGAGACATGCCTAAAAATGTATCTAAACTATGGTATATTTTGTATCTAATTTTCTAT  
AATTTAGGATTAACAGAAAGGTTGTTCTTTAAATGTCTATTAAGTGAAGTACTTACTTTTCCATTAATTTCCACTACTGC  
AGTTTAGGCTTCTTCTATTCTAGGAAGTAGTTGCTGGCCTTCAAGGATCTGATTCTCTAGGGAATGAAGAAATAGCAAAGG  
TTTCTAACAGAGAAAGCATACTGAAAGTCAAGGATGAGGAAGCCTGGGGTTAGCTCAGTAAAATTAATAATCAAATACT  
TTGAAGTATTTGTTCTGTTTCTCAAATGAGAGGTGATCTAGAGAGTAACTCAAGATGATGGTGGATGGAGGAACCATT  
ACAAAAGCTCCTCTAAGTTCTTGTGATTTCAGTTTCTATGGCTCTAGGACCCAGGGGGAGATCTCACACACACACA  
CACACACACACACACACACACACACACAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGACAGAGACAGAGACAGAGAC  
AGAGACAGAGACAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAACAGACAGACAAGAGAGACACAGAGAGAGAG  
AAGGAGGAAGGAAGGAAGAAGAATAGAAGAGGGGAGGGATGATGAAGGCAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAGGGA  
GGGAAGGATGAAAGAGGAAGGAAGGAAGGAAGGCAAGTTGTAATTTGAACCTTTCATAAGTGAAGTTTCTTACTAATGGAA  
AACTTGTGGTCATTTCTAGCTCAAGAGTTCCATCTCTCAAACGATTTGGAAGGAGATTACAGCTTCAAGTACTGTGGCC  
CTCTCCTTGTGATGCTCATCTTGTATGTCACAAGAAGCCGAATCAGCCTAGCAGGTGATGAGTGTCTTTGTTCTGT

CTAAAGATCACCATGTA AAAATGTGTTTAAATGAGCATATGAGATGAGGAGGAGGAGGTAGCTCCGTGTTACGGTGTAGT  
GTAAAGGTGTTCCCTTAGCAATTTGGTCTCCAACACTGAAGAAAGTGTTTTTACATGAGAATATGAAACAATGGGCTTTGTT  
GTGACACTCACACAAGCAAATGCTGTACTTAGCTCCTCATTGTCATCTCCTGTCCCTGCCAACACACACATACACACAC  
ACACACACACACACACACACACACACACACACATACCAGTTACCCTCTTCTTGATAAATCTCAGGAGATAGATGGTTGTT  
CCATCCTCAGGCTCTTACATTCTTTCTGCCCATCTTCTGTGAAGGTCCCTGAGCCTTGGGGTAGGGATGTGCTGGTAGAT  
ATAGATGTCTCATTGATGGCTAAACAAAGTCACTTATTTTCAGCACTTTGAACAACAATGTGTCTCTGCACTAATCACTAC  
CCACACCAATAACAAACCTCTCTGGCCAACGTTGGGGGCAATATAAGTCTACAGATATAAATATAAATATTTAGAAGGC  
AATTTGATAACATAACCATTTTCATAGAACAAGATCAGTAGATTCCCTCCTAGAGTCTGTGACTTCCCTCCACTTCACT  
GTACTAGGCATGAATTTATCCCCACAAAACAGACCTCAAATCCCACCAATAGAGCAGTTGGAATGTCCATAAGGTTACA  
GTTGTGAGTGGGCATATTTGGTCTAGAAAGCAGATGTGGTAGCATGCAGAGACCAGTGTCTGTAAGACCATTGATGGC  
TTTTCTCTGAGCAGCCTTTCAAACACCTTCTAGCACTATGAAAGCTATCTGGCAGGGAGAGAGTTTCTGGGCAGTTCA  
AAATGATTCTTCATGACTTGAACCACAGTATGTTGTGTCTTCAGCAATAGAATCTGACTATCCAGTTCAGATGAGCAT  
TGTTTTGGATGTTCCTAGGTCCTCTGACAAATTTTATTTCATTGCTTTTTTCTCTCTAAAGTTTGTTCAC  
ATCCTCTATGACTTGTGTAACATAATCAATGGAATCTTTGTGTGGTTCTTCAGGCTGCTTTCATTAGAGGCATATCTATT  
AGGGGGTTGGGGATTGGGAATAAGGTATGTTGTCTGGGTTGGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG  
TGTGTGTGTGTGTGTGTCTTTCTTTTTCTGCACTGGGTGGGTCTTACATATGCAAAGTGACCTGTGATTGACATGCCTGCCT  
CCTTTCTTTTATTCTTTGTCTTGTATTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG  
TCAGGGGAAGCCATGTTCCCTATTTCAGTTCAGGTGTTCTGGATGAAAAAACCCAAAACCGGGTCTTTGTGTATCTCTA  
TGGAAGTGTCTGTCCAGTTTTTCCATGCAGAAGACTGTCTCTCCACCTGTGGCTTACTGTTGAGCATCCCTTTAGCT  
GTGTGACAGTTGCATTTGTACGTCATGCTGTTATTTCTGAGTTACAGGAGTCTTTCTGGCCCTAACTGCTGGCCCTAT  
CTTGAGTGTATCCTATGCGTTCCTTAAAGTGTCCAAGAAGGCAGTTTATTTTCATTAAGATCTTACCCATTTTAAAT  
AGAGTTTCTTTACAAGGTGCAAAGTAGAGATCTAGTTGTGGTCAATACATGGATATTTAATCTCTGGGCATCATTTATT  
CTCTTCTCTAATATATGTTCTTGGCACATTTGTTAAAAAAATAGCCTATAGTTGCACGGGCTAATTTCTGAATCTTT  
CATCTATCCCATTGTCTGCCTGTCTAGTTTTGTGCCAGTATCATGCTAGTTCTGTAGCTGTGCCTATACAATATGATTTG  
AGATCAGATATTTGATATATTTCAATTATGTGGGTTTTTCTATATCAATTTATGAATTTCTCCTATTTATATGATAAT  
ATTTGCAATTTATTGAGATGGAATGGAATCTGTACAGTGCTTTTGGTAATATATCCATTTTCCACCATTTCCAGCCTGCCT  
GTGAGCATGGAGAGTTTCTCCCTCTAGTACCTCCTTTCAGTCTTTTTCTCTTCAGTGCTTTAGTGCTCTCATTTTGAGGTC  
CTTACCTTCTGAGTTGGGCATCCACCTAGGTTTGTCTGTTGTGCTTATTGTTGGGTTTTGTTGATGTTGTTTTGATAGT  
GCTAGTTGAACTCAATATGTAGACCAGGCAGGCTCAAAGTACAGAGGTCCACTGCTCTGACTTCCAAGTGTGAGA  
TTAAAGGAGTGACACTCACGTGCCCTGCAAGACAGTGCCACGTCATTGCTTTTCCACGGTGTACACCAGGCTAGCTAGC  
CCATGAATCTGTGAGGAGTCTCCTGTCTCCAGCTCCCTTCTGCCACAGAAGCATCAGGGTGGCAGATTCTCCTGCTACTC  
ATCTGTATTTTACATTGGTTCAAGAATTTGAACCTTGGGCTCTGGCGCTTGTGCGGCAAGCCCTTCCACCCACTGAGCCCTC  
TCCTAAGCCCTGATGCTCCTCCTCAAGCCTTACCTCCTGTCTAGTCTAGTGGCTTTCCATGGGACTTTTAAATTC AATT  
CATTGGGTTTTCATTTCCAGCATTTCTGTTCTTTCTTTCCAAAATGTGTTGCTTGTGGGTTTTCTATGTATGCTGTT  
GACTTCCACATTCGTGCTCTGAATTAATTTCTTAAATAATTGGGTTACTTGTTAATGCCTTCTTAGAGGTCATTAATCAT  
TTTTTTTTTTTTTGCTAGCAGGTTTTTTGATTATTTGCCCAAATATCTTTGTGTTGAGAAGTTAAGGAATTACGATCTTTT  
AGAGGTACCATGTGCTACCTTGTPTTAATGTATTTCTTTGCTCTGGGTGTGGTGAATATCCATTGGGATGGATGTCA  
CTTCTGCTTGGCAGGCAGCTTTCCCTGATGGCTCAGACTCCAACAGCACTAAAGTATTAGCCATACAAGTAGAAGCGA  
TTTCTAGATGTGAATGAGTAGCTCGCCAAGTTTCTTCTCAGTGAATGAACAGTTTGAACGAGAACAAGGAGAGAT  
GGAATAAAGGAGGAAAAAAAACCTTTCTTCTCCATAAGGCAACCAGAAATATTCGAAACTACATAAGAAAGTCAAGG  
ATGATATGTGTACATGCAAGAAAGAAGTTGGAGGGGATGCACAGAAGCTAAATATGTGTAAGATAGTCATTA AACT  
ATGTTATCAGAAGGCAGAGAACAGGAGAGCATAGCACATAGATGGTCCCCAAAAGAATGGGGTACAATTATTGATAGCA  
AAAAGTTATGCGGTGAGACACTTAGACATGACAGTGTGTTGGTCAAAGAAAGGAACCTTGACAGATCCAAGAAGGAGA  
CATACCATGAATAATCAAGCCATGTAGATATACCATGCTCATGCTTTGAGTTCTATAATAACTTTCTTTGCTTTGTAGAT  
TCTTCTCTGATCTCCACTGCAATAAGTAAATTACTTCTTTTTCCAAGTTCAAAGCCAACAATGATGGCTGAGCTTCTATTT  
CAAAGCTTCTATTTCTTATACCTAAAACATCATGTTACCTTTTAAATATGGATTGTTTTTATTTCTACATGTGTGTGCATT  
TTGCACTCATGTATATGTGACTGCATATATATCTGGTACCCTTAAAGGCCATAAGAGGATGACAGAACCCTGGA ACT  
AGAATTATAGGTAACCATCAGCTCTTATGTGGGGCTCAGA ACTGAACCACGGTCTCTGCAAAAAGCACCAAGTGTCTT  
AACCCTAAGCCACCCCTCCAGACCCTCTGGATGTTATCTTATAAGGCACAAATTTATATGAGCCGAGAAACATACCCA  
GGTAGGTTAGAAAAGCTATGCTAAAAGAAAAGGAGAGGCATATGAGATCTGGAGAAAAGCTCAGCCATCATTTGTTGCTTTG  
AACTTGGAAAAAGGACATAAAACAAGGAATTCGAATCACTTCGAGAGGCTAGAAAATGGTTCTCACTTGATAGCCAAG  
AAACGAGCAGTCCATTGAGCTCTACAACTCCAAGA ACTGAATTTCTGCCAACAGGCCAATCAGGAGTGTGATGACCTA





### 3. LentiCRISPRv2 Plazmit Sekansı (14873)

TGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGAC  
GTCAATGGGAGTTTGTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAAT  
GGGCGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGCGCGTTTTGCCTGTACTGGGTCTCTCTGTTAGACCAGATC  
TGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGT  
GTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGAAAAATCTCTAGCAGTGG  
CGCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGC  
ACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGG  
TGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGAAAGAAA  
AAATATAAATTAACATATAGTATGGGCAAGCAGGAGCTAGAACGATTCGAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACAT  
CAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAA  
TACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAA  
GAGCAAAAACAAAGTAAAGACCACCGCACAGCAAGCGGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAA  
TTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGA  
GTGTGTCAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGG  
GCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAG  
GGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCTGGCTGTG  
GAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTGGGGTTGCTCTGAAAACTATTTGCACCCTGCTGTGCCTTG  
GAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAAC  
AATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAAT  
TAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTAAACATACAAATTTGGCTGTGGTATATAAATTAATTCATAATGATAGTA  
GGAGGCTTGGTAGGTTTAAAGATAGTTTTGTCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCG  
TTTCAGACCCACCTCCCAACCCGAGGGGACCCGACAGGCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGA  
GACAGATCCATTGATAGTGAACGGATCGGCACTGCGTGCGCCAATTCTGCAGACAAATGGCAGTATTCATCCACAATT  
TTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTA  
AGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGTTAATT  
AAGGTACCGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATT  
AATTTGACTGTAAACACAAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTGACGTTTT  
AAAATTATGTTTTAAATGGACTATCATATGCTTACCCTAAGTATTGAAAGTATTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGG  
AAAGGACGAAACACCGGAGACGGTTGAAATGAGCACACAAAATACACATGCTAAAATATTATATTCTATGACCTTTAT  
AAAATCAACAAAATCTTCTTTTAATAACTTTAGTATCAATAATTAGAATTTTTATGTTCTTTTTGCAACTTTTAATAA  
AAATGAGCAAAATAAAAAACGCTAGTTTTAGTAACTCGCGTTGTTTTCTCACCTTAATAATAGTACTCCACCCTTG  
TTCTAAGCGGTCAGCTCCTGCTCAATCATTTTTTGGAGCATCTTCAAATGTTCTAACTCCACCAGCTGCTTAACTAAAG  
CATTGCTTTAAACAACTGACTTCATTAGTTAACATCTTCAAATGTTGCACCTGATTTTGAATACTCTGTTGATGTTTAAAC  
AAATTTCAATCCAGCTTCAACAGCTATTTCAACAGCTTTCATGATTTCTTCTTTGTTAATAAACAAATTTCCATAATACAT  
TTAACAACATGTGATCCAGCTGCTTTTTTACAGCTTTCATGTCTTCTAAAACCTAATTCATAATTTTTGCTTTTAATGCAC  
CAATATTTAATACCATATCAATTTCTGTTGCACCATCTTAATTGCTTCAGAAACTTCGAATGCTTTTGTAGCTGTTGTGCA  
TGCACCTAGAGGAAAACCTACAACATTTGTTATTCCTACATTTGTGCCTTTAATAATTTTACAATAGCTTGTTCATAT  
GAATTAACACAACTGTTGCAAAATCAAATTCATGCTTCATACATAATGTTTAAATTTGACGTTTCGTAGCATCTTGT  
TTAATAATGTGTGATCTATATATTTGTTTAGTTTCATTTTTTCTCCTATATATTCATTTTTAATTTTAAATTTCTTAAATAATTT  
CGTCTACTTTAACTTTAGCGTTTTGAACAGATTACCAACACCTATAAAAATAAATTTTTAGTTTAGGTTAGTTCCACTTG  
GGCAACAGCAAATCATGACTTATCTTCTAAATAAAATTTTAGTAAAGTCTTGTCTGCGCATATTATACATTCCATCGATGT  
AGTCTTCAACATTAACAACCTTAAAGTCCAGCAATTTGAGTTAAGGGTGTGCTCTCAATGATTTCAATTAATGGTTCAATTT  
TTAATTTCTTTCTCTGGTTTAAAATCAAGTTTAAAGTGAAGTGAATATGCACCCATTTCTTTAAATAAATCTTCTAA  
ATAGTCTACTAATGTTTTATTTGTTTTTATAAAAATCAAGCAGCTCTGCTATTAATATAGAAGCTTGTATTCCATCTTTA  
TCTCTAGCTGAGTCATCAATTACATATCCATAACTTTCTCATAAGCAAAAAACAAATTTAATCCGTTATCTTCTTTAG  
CAATTTCTCTACCCATTCATTTAAATCCAGTTAAAGTTTTTACAATATTAACCTCATATTTTTCATGAGCGATTCTATCACC  
CAAATCACTTGTACAAAACCTGAATATAGAGCCGATTTTTTGAAGTCTATTTAAGCGTTTTAGATTTGATAATTTTCA  
ATCAATTAATAATTTGCTCTGTTGATTTCCATCTAATCTTACAAAATGACCATCATGTTTTATTGCCATTCCAAATCTGTCA  
GCATCTGGGTCATTCATAATAATAATATCTGCATCATGTTAATACCATATTCAAGCGGTATTTTTCATGCAGGATCAAAAT



TCTGGATTTGGATTTACAACATTTTTAAATGTTTCATCTTCAAATGCATGCTCTTCAACCTCAATAACGTTATATCCTGATT  
CACGTAATATTTTTGGGGTAAATTTAGTTCCTGTTCATTAAGTGCCTAAAAATAATTTTTAAATCTTTTTAGCTTCTTG  
CTCTTTTTGTACGTCTCTGTTTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTGAAAAAGTGG  
CACCGAGTCGGTGCTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCA  
GAGCGCACATCGCCACAGTCCCGGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCG  
GGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTA  
GTCGCCGTGAACGTTCTTTTTGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGACCGGTTCTAGAGCGCTGCCACCATGGACAA  
GAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCAGC  
AAGAAATCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCG  
GCGAAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAAGATAACACCAGACGGAAGAACC GGATCTGCTATC  
TGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTCCACAGACTGGAAGAGTCTTCTCCTGGTGG  
AGAGGATAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCTGTGGACGAGGTGGCCCTACCACGAGAAGTACCCACC  
ATCTACCACCTGAGAAAGAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTATCTGGCCCTGGCCACA  
TGATCAAGTTCGGGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCA  
GCTGGTGCAGACTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAAACCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCTGTCT  
GCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCGCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGTGGCTGTTTCGGA  
AACCTGATTGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGATGCCAAACTGCAGCT  
GAGCAAGGACACTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACTGTTTCTGGCC  
GCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCTGCTGAGCGACATCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCG  
CCTCTATGATCAAGAGATACGACGAGCACACCAGGACCTGACCTGTGAAAGCTCTCGTGGCGCAGCAGCTGCCTGA  
GAAGTACAAAGAGATTTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGTACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAG  
TTCTACAAGTTCATCAAGCCATCTGGAAAAGATGGACGGCACCGAGGAACTGCTCGTGAAGTGAACAGAGAGGACC  
TGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCG  
GCGGACGGAAGATTTTTACCCATCTCTGAAGGACAACCGGGAAAAAGATCGAGAAGATCTGACCTTCCGCATCCCCTACT  
ACGTGGGCCCTCTGGCCAGGGGAAACAGCAGATTGCGCTGGATGACCAGAAAAGAGCGAGGAAACCATACCCCTGGAA  
CTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGCCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCC  
AACGAGAAGGTGTGCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCAAAGTGAATACG  
TGACCGAGGGAATGAGAAAGCCCGCTTCTGAGCGCGAGCAGAAAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAA  
CCGGAAGTGACCGTGAAGCAGCTGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCCGGC  
GTGGAAGATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATACCAGATCTGCTGAAAAATTAAGGACAAGGACTTCTGGACA  
ATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATATCGTGTGACCTGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACG  
GCTGAAAACCTATGCCACCTGTTTCGACGACAAAAGTGTGAAAGCAGCTGAAGCGGCGGAGATACACCGGCTGGGGCAGG  
CTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACAATCCTGGATTTCTGAAGTCCGACGGCT  
TCGCCAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCAGAAAGCCAGGTGTC  
CGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCCCCGCCATTAAGAAGGGCATCTCAGACA  
GTGAAGGTGGTGGACGAGCTCGTGAAGTGTGAGGGCCGACACAAGCCGAGAACATCGTATCGAAATGGCCAGAGAG  
AACCAGACCACCCAGAAAGGACAGAAAGACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGGGCATCAAAGAGCTGGG  
CAGCCAGATCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACTGTACTACCTGCAGAAT  
GGGCGGATATGTACGTGGACCAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCGTGCCTCAGA  
GCTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACC GGGGCAAGAGCGACAACGTGC  
CCTCCGAAGAGGTCTGAAAGATGAAGAACTACTGGCGGACGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTT  
CGACAATCTGACCAAGGCCGAGAGAGGGCGCTGAGCGAACTGGATAAGGCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTGG  
AACC CGCAGATCACAAGCACGTGGCACAGATCTGGACTCCCGGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTG  
ATCCGGAAAGTGAAGTGTACCCCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTACAAAGTGCG  
CGAGATCAACAACTACCACCACGCCACGACGCCTACTGAACCGCTCGTGGAAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCT  
AAGCTGGAAGCGAGTTCGTGTACGGGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAA  
ATCGGCAAGGCTACCGCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGACCGAGATTACCCTGGCCAACGG  
CGAGATCCGGAAGCGGCTCTGATCGAGACAAACGGCGAAACCGGGGAGATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGGC  
ACCGTGCAGAAAGTGTGATGACCCCAAGTGAATATCGTGA AAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGGCTTACGAAA  
GAGTCTATCTGCCAAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAAAAGGACTGGGACCCCTAAGAAGTACGGCGGCT  
TCGACAGCCCCACCGTGGCTATTCTGTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAAAAGTGAAGAGTGT  
GAAAGAGCTGCTGGGATCACCATCATGGAAAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCATCGACTTCTGGAAGCCAAGGGC

TACAAAGAAGTGAAAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCTAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAA  
TGCTGGCCTCTGCCGGCAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAAATATGTGAACCTTCTGTACCTGGCC  
AGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGTCCCCGAGGATAATGAGCAGAAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAGCACTACC  
TGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTGGACAAAAGTGCTGTC  
CGCTACAACAAGCACCCGGATAAGCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATCATCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTG  
GGAGCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGACACCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACAAAGAGGTGCTGGACG  
CCACCTGATCCACCAGAGCATCACCGCCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCTGGGAGGCGACAAGCGACC  
TGCCGCCACAAAGAAGGCTGGACAGGCTAAGAAGAAGAAAGATTACAAAGACGATGACGATAAGGGATCCGGCGCAAC  
AAACTTCTCTGTGTAACAAGCCGGAGATGTCGAAGAGAATCCTGGACCGACCGAGTACAAGCCACGGTGCGCCTC  
GCCACCCGCGACGACGTCCCAGGGCCGTACGCACCCTCGCCGCGCGTTTCGCCGACTACCCCGCCACGCGCCACACCGT  
CGATCCGGACCGCCACATCGAGCGGGTACCAGAGCTGCAAGAACTTCTCCTCACGCGCTCGGGCTCGACATCGGCAAG  
GTGTGGGTCGCGGACGACGGCGCCGCGGTGGCGGTCTGGACCACGCCGGAGCGCTCGAAGCGGGGGCGGTGTTCCGG  
AGATCGGCCCGCGCATGGCCGAGTTGAGCGGTTCCCGGCTGCCCAGCAGCAACAGATGGAAGGCTCCTGGCGCCGCA  
CCGGCCAAAGGAGCCCGGTGTTCTGGCCACCGTTCGGAGTCTCGCCCGACCACCAGGGCAAGGGTCTGGGACGCGCC  
GTCGTGCTCCCGGAGTGGAGGCGGCCGAGCGCGCCGGGTGCCGCCTTCTGGAGACCTCCGCGCCCGCAACCTCCC  
CTTCTACGAGCGGCTCGGCTTACCCTCACCGCCGACGTGAGGTGCCGAAGGACCGCGCACCTGGTGCATGACCCGCA  
AGCCCGGTGCCTGAACGCGTTAAGTCGACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAAC  
TATGTTGCTCCTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTT  
CTCCTCTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTGTACAGCAACGTGGCGTGGTGTGCAC  
TGTGTTGTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTACAGTCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCT  
CCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCTGCCTTCCCCGCTGTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATT  
CCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCTTCTTGGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCT  
TCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGACCTTCTTCCCGCGGCTGTGCCGGCTCTGCGGCTCTTCCGCGTC  
TTCGCCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCGGCTCCCCGCGTGCCTTAAAGACCAATGACTTACAAGGC  
AGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGACTGGAAGGGCTAATTACTCCCAACGAAGACAAGATCTG  
CTTTTTGCTGTACTGGGTCTCTCTGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGAACCCACTGCTT  
AAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGTAGTGTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTC  
AGACCTTTTAGTCAGTGTGAAAATCTTAGCAGGGCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTG  
CCAGCCATCTGTTGTTTCCCTCCCCGTCCTTCTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTCTAATAAAAAT  
GAGGAAATGTCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGCTATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGG  
ATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAAGAACAGCTGGGGCTC  
TAGGGGTATCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCCGTACA  
CTTGCCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGCGGCTTTCCCGCTCAAGCTC  
TAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTGTCTTACGGCACCTCGACCCAAAAAATTGATTAGGGTGATGGT  
TCACGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTG  
TTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTATAAAGGGATTTTCCGATTTCCGGCTATTGG  
TTAAAAATGAGCTGATTTAACAATAAATTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGAAAAGTCC  
CCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCCG  
CCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCCG  
CCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCATTTCTCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGACAGGGCCGAGGCCGCC  
TCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGAGCTTG  
TATATCCATTTTCGGATCTGATCAGCACGTGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACAA  
GGTGAGGAACTAAACCATGGCCAAGTTGACCAGTGCCTTCCGGTGTCAACGCGCGGACGTCGCCGGAGCGGTGAG  
TTCTGGACCGACCGGCTCGGGTTCTCCCGGACTTCTGTGAGGACGACTTCGCGGCTGTGGTCCGGGACGACGTGACCCT  
GTTATCAGCGCGTCCAGGACCAGGTGGTGCCGACAACACCCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCTGGACGAGCTG  
TACCCGAGTGGTTCGAGGTCGTGTCCACGAACCTCCGGGACGCTCCGGGCCGGCCATGACCGAGATCGGCGAGCAGC  
CGTGGGGCGGGAGTTCCGCTGCGGACCCGGCCGCAACTGCGTGCACTTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACACGT  
GCTACGAGATTTGATTCACCCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGCTGGATGA  
TCCTCCAGCGGGGATCTATGCTGGAGTTCTTCCGCCACCCAACTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAAATAA  
GCAATAGCATCACAATTTACAAAATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTTGTCAAAACCTCATCAATGTAT  
CTTATCATGTCTGTATAACCGTCGACCTTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTATAGCTGTTCTGTGTGAAATGTT  
ATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACT

CACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAAC  
GCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGCTGC  
GGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAAGAATGTG  
AGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGAC  
GAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTG  
GAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGTTACCGGATACTGTCCGCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGG  
CGTTTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCC  
CCGTTCCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTG  
GCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACT  
ACGGTACACTAGAAAGAACGATTTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCT  
TGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGAT  
CTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTACGTTAAGGGATTTTGGTCATG  
AGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAAGTAAAGTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTA  
AACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTACCCATAGTTGC  
CTGACTCCCGCTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACC  
CACGCTCACCGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTT  
ATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCAACGTTGT  
TGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGCTGTTGGTATGGCTTCATTACAGTCCGTTCCCAACGATCAAGGCG  
AGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGTTAGCTCCTCGGTCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCG  
CAGTGTATCACTCATGTTATGGCAGCACTGCATAATCTCTTACTGTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTG  
GTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAAT  
ACCGCGCCACATAGCAGAACCTTAAAAGTGTCTCATCTTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACC  
GCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAAGTATCTCAGCATCTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGG  
GTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTT  
CCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAA  
ACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCGACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATG  
GTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGA  
GTAGTGCAGCAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGG  
CGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATT  
ACGGGGTCAATTAGTTCATAGCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCC  
CAACGACCCCCGCCATTGACGTCATAAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAAT  
GGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTC  
AATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGT  
ATTAGTCATCGCTATTACCATGG

## 9. TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve bütün çalışmalarım süresince bana rehber olan, yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. H. Barbaros Oral'a,

Bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tez çalışmamda maddi ve manevi her türlü desteğini esirgemeyen hocam Yrd. Doç. Tolga Sütü'ye,

Bizleri danışmanı olduğu öğrencilerden ayırmayan ve her zaman öncülük edip yol gösteren Prof. Dr. Ferah Budak hocama,

Tez çalışmam boyunca yanımda olan, bilgisini ve deneyimlerini benden esirgemeyen doktora öğrencisi Mert Aras Kaya'ya

Beni hayatımın her döneminde destekleyen ve bana inanan, kararlarımı her zaman saygı duyan sevgili annem, babam ve kardeşime,

Desteklerini esirgemeyen ve beni yüreklendiren sevgili arkadaşlarıma,

Çalışmamıza maddi katkıda bulunan Bilimsel Araştırma Projeler Birimi'ne (HDP(T)-2017/30) no'lu 'Raw 264.7 hücre hattında CD80 ve CD86 ekspresyonunun Crispr/Cas9 gen düzenleme sistemi kullanılarak baskılanması' isimli proje,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Elif ARDAHANLI**

29/08/2019

## 10. ÖZGEÇMİŞ

11.09.1994 tarihinde Bursa'da doğmuştur. Lise öğrenimini Malcılar Lisesinde tamamlamıştır. 2012 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesinde Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde başladığı lisans eğitimini 2016 yılında tamamlamıştır. 2016 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans eğitimine başlamıştır.