



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.

Adı-Soyadı

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. H. Barbaros Oral

Üye

Prof. Dr. Ferah Budak

Üye

Doç. Dr. Ahmet Ata Özçimen

Üye

Üye

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- γ ile Uyarılması.....	45
3.11.2. Akan Hücre Ölçer Analizi.....	46
4. BULGULAR.....	48
4.1. LentiCRISPRv2 Vektörünün Ligasyona Hazırlanması.....	48

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

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- γ ile uyarıldı. Ardından bu hücreler CD80 ve CD86 monoklonal antikolarıyla muamele edilerek akan hücre ölçerinde okutulup analizleri yapıldı. IFN- γ 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- γ 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- γ 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)

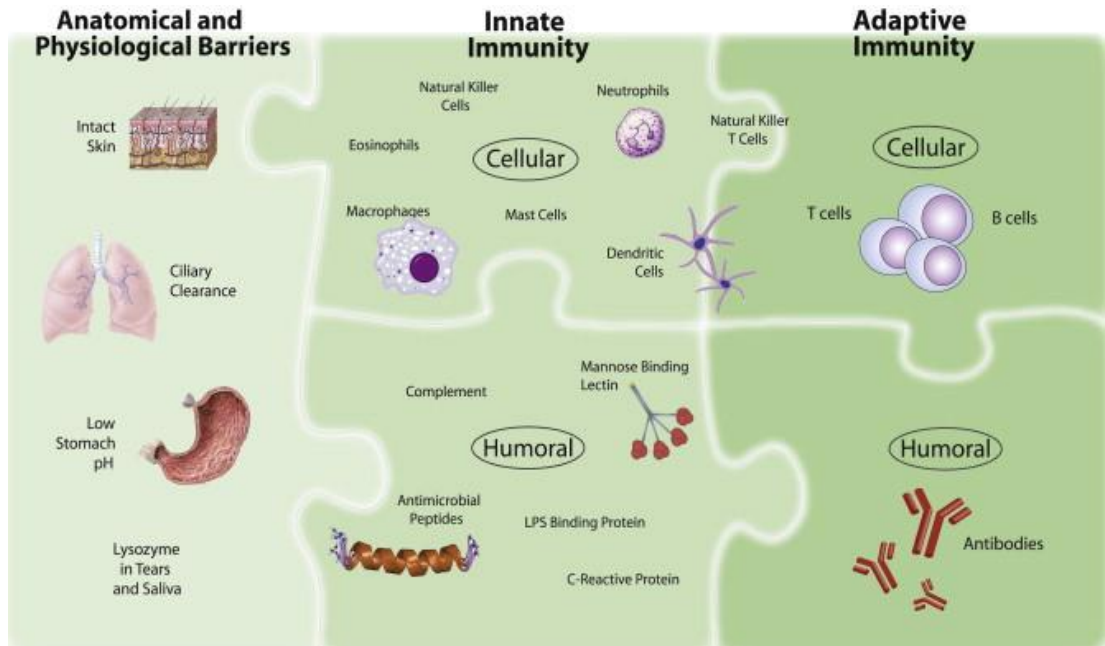
Bu tez çalışmasında da profesyonel antijen sunan hücrelerden biri olan makrofajlarda, eş uyaran molekülleri CD80 ve CD86 genleri susturulup, T hücrelerinde anerjinin tetiklenerek otoimmün hastalıklara karşı tolerans geliştirilmesi amaçlanmıştır. Aynı stratejinin transplantasyon toleransını sağlamak amacıyla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

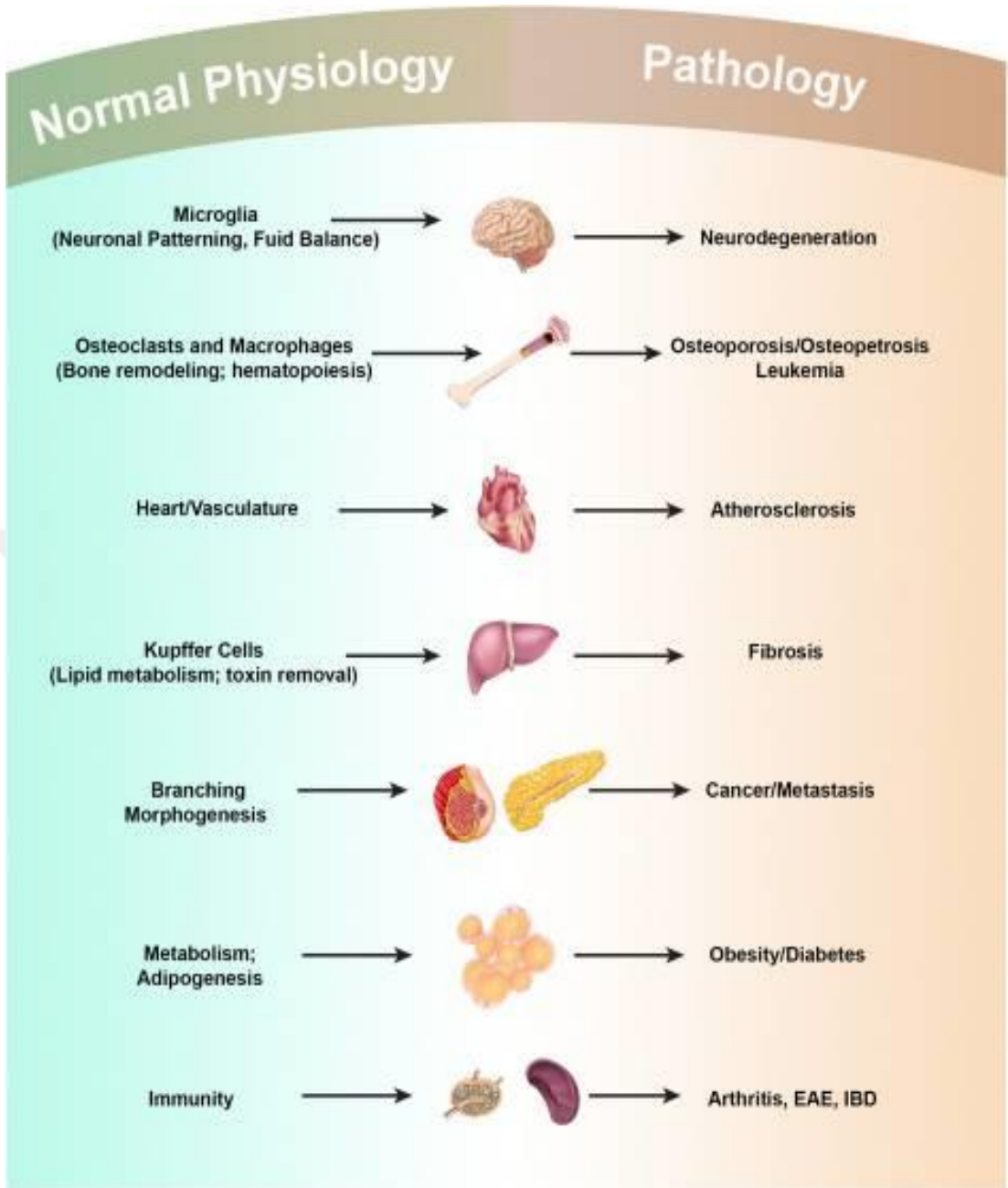
2.2.2. Makrofajlar

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, obesite 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 mikroglial 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

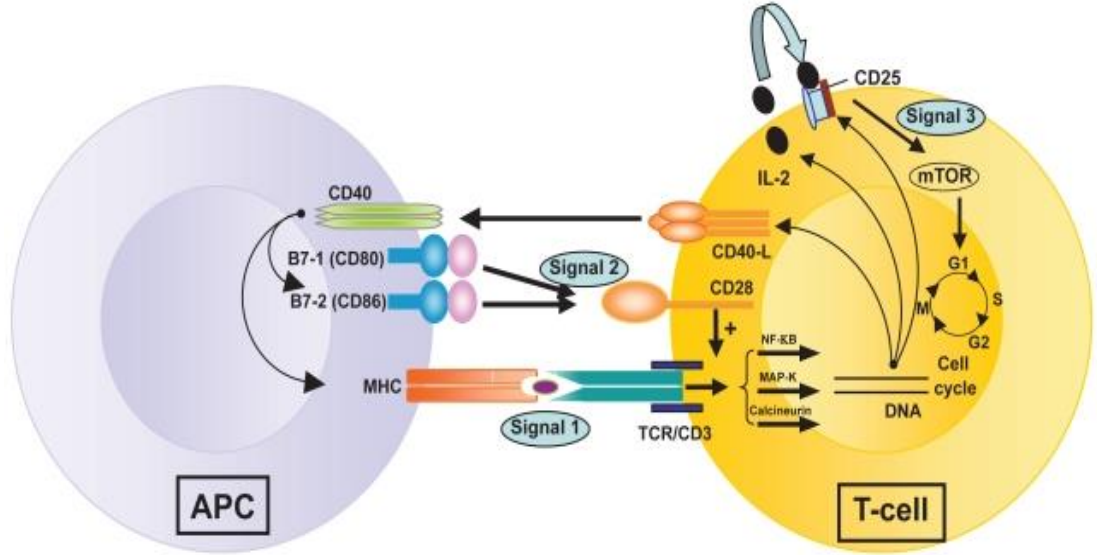
Makrofajlar mikroplara karşı hem doğal bağışıklığın bir elemanı gibi tepki gösterir hem de mikroplar için özgül olan edinsel bağışıklık elemanları olan lenfositlerin yanıtlarını tetikler. Bu nedenle makrofajlar edinsel bağışıklığı düzenleyen doğal bağışıklığa ait hücreler olarak bilinir (Hekim ve Alkan, 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 tanıyıp 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 kostimülör 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 molekülüne 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 molekülüne 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- γ 'yı salgılar. Uyarılan makrofajlar uyarılmamışlara oranla mikropları daha iyi parçalarlar. Bu yol ile makrofajlar hücresel bağışıklığın etkinliğine katkıda bulunur.
- 3) Hümorale 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

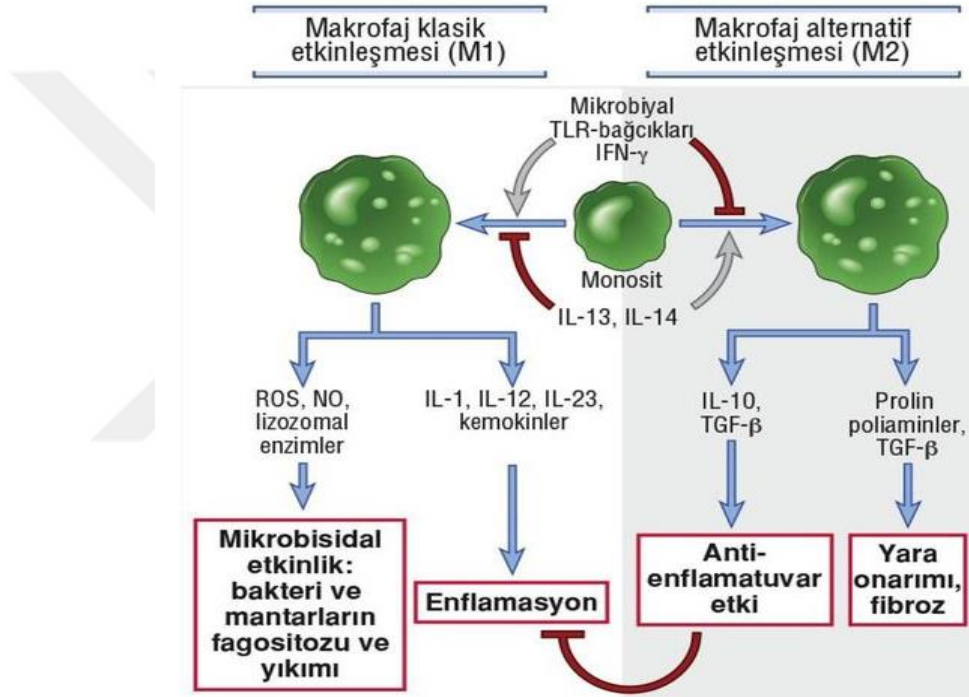
Mikroorganizmalar ve yıkıma uğrayan hücreler, TLR'ler ve NLR'ler gibi örgü tanıyan reseptörlere (Pattern Recognition Receptors; PRR) bağlanarak işlevlerini yerine getirmesi için makrofajları etkin kılarlar. Makrofajların fagositik işlevleri, mannoz reseptörleri ve doğrudan mikroorganizmalara bağlanan 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- γ 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 yol açan antijen immünojenik olarak tanımlanır.
2. Lenfositler işlevsel olarak etkisiz kılınır veya öldürülürler ve sonuçta o antijene tolerans gelişir; bu tip yanıtı yol 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 repertuvardan 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
- ifadelenme 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⁺ 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⁺ 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. Anergik 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- α 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 hücrel 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 yonteme 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 genlerin 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).

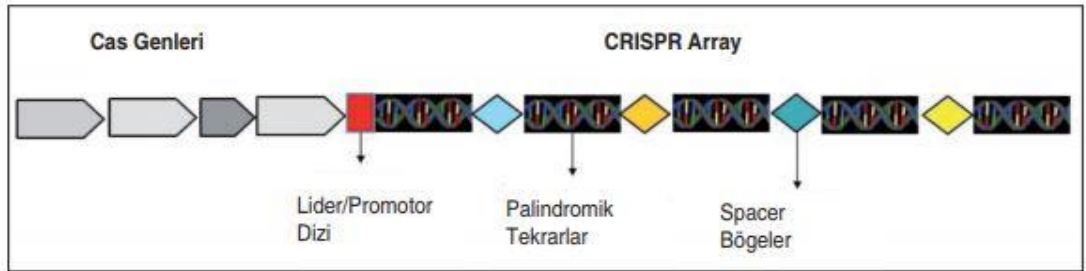
2006 yılında CRISPR'den türetilen bağışıklığın RNA aracılığıyla yürütülebileceği bildirildi, 2007 yılında ise cas genlerinin, spacer bölgelerinde sorumlu olan bölge olduğu keşfedildi (Chen ve ark., 2016). Zaman içerisinde CRISPR dizilerin esas olarak farklı bakteriyofajlara ait sekanslar içerdiği ve 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

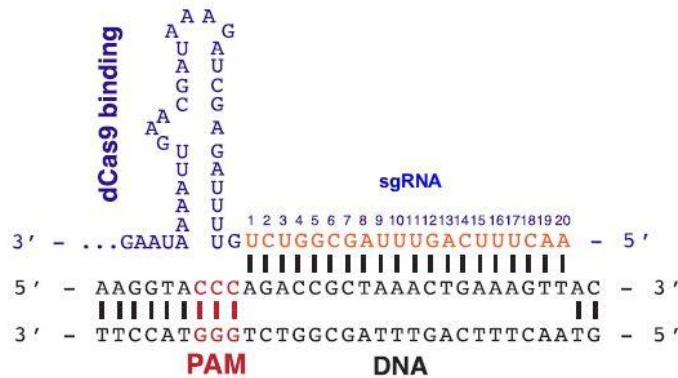
Modifiye edilmiş ve günümüzde araştırmalarda kullanılan CRISPR sistemi temelde 2 parçadan oluşur: Rehber RNA (single guide RNA; sgRNA) ve Cas9 nükleazı. Rehber RNA hedefi belirlerken, Cas9 nükleaz fonksiyonel işlemi gerçekleştirir.

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 ddH₂O (Merek Millipore,USA) ile tamamlandı. Bu karışım 55°C de PCR cihazında (Eppendorf, Mastercycler, Germany) 2 saat inkübe edildi.

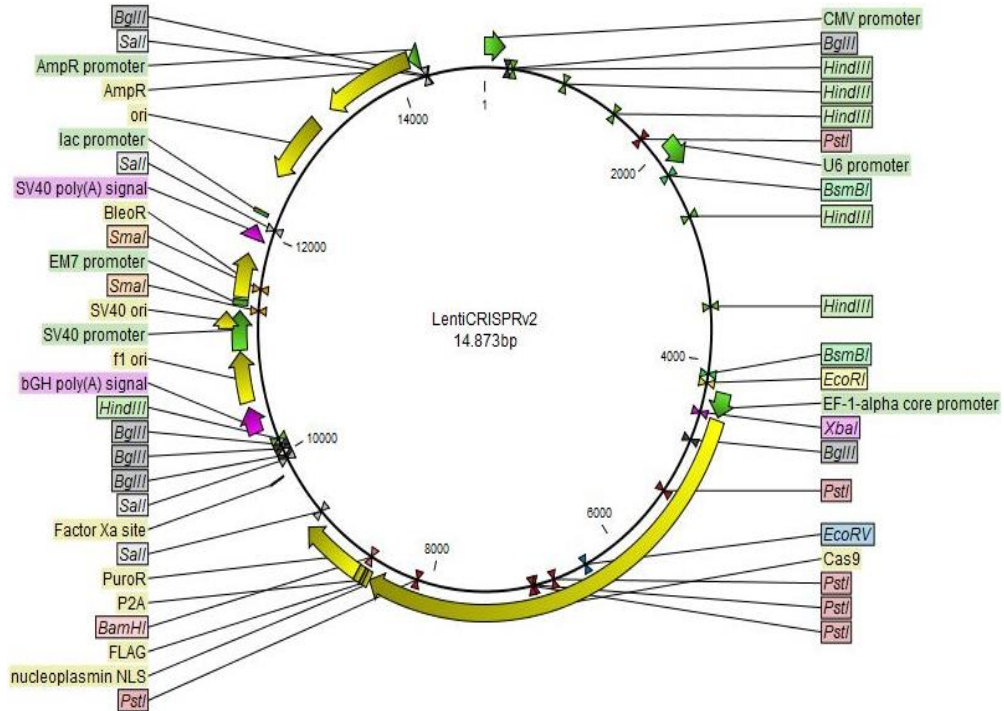
BsmBI kesiminden sonra vektörde açık kalan uçlardan fosfat gruplarını uzaklaştırmak, böylece vektörün kendi üzerine katlanmasını önlemek için; yukarıda bahsi geçen, BsmBI ile 2 saat inkübe edilen 30 µL'lik karışımın tamamı, 3 µL CAIP (Claf İntestinal Alkaline Phosphatase) enzimi (Fermantas, ThermoScientific, USA), 5 µL CIAP 10x Tamponu (Fermantas, ThermoScientific, USA) mikrosantrifüj tüpüne konuldu ve son hacim 50 µL'ye ddH₂O (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 banttan, 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 ddH₂O (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 ddH₂O (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 ddH₂O (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 ddH₂O (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 (Membert, 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 (10⁴u/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 ddH₂O (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 cm²'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 CO₂ inkübatöründe (Binder, Germany) 37°C'de %5 CO₂ içeren bir ortamda inkübasyona bırakılarak çoğalmaları sağlandı.

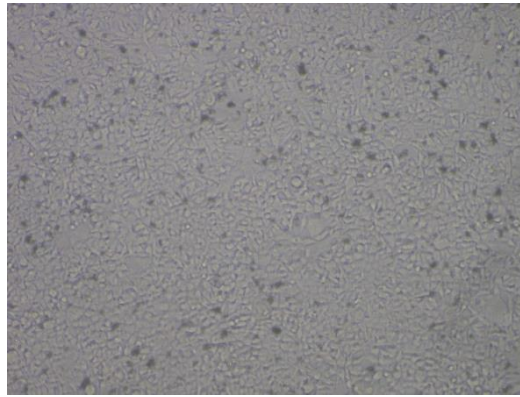
3.4.3. Hücrelerin Pasajlanması

3.4.3.1. HEK293FT Hücrelerinin Pasajlanması

T25 cm² 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 CO₂ 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 cm² 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 CO₂ içeren inkübatöre konularak çoğalmaları sağlandı.

T75 cm² flask'a ekilen hücreler bir iki gün sonra kontrol edilip % 80 doluluk oranına sahip olduğu görüldükten sonra yukarıda anlatılan işlem tekrar edilir.

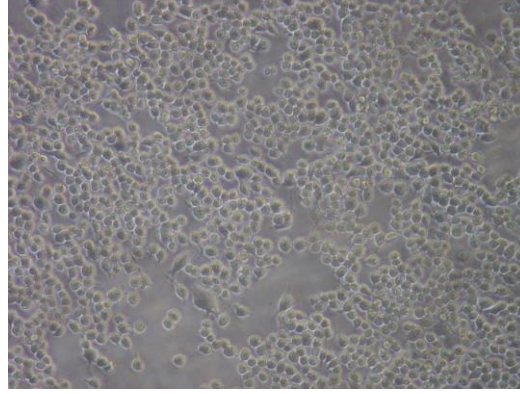


Şekil 9. HEK293FT hücrelerinin inverted ışık mikroskopunda 20X büyütme objektifteki görüntüsü

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 CO₂ 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 flastktan 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 cm² 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 CO₂ içeren inkübatöre konularak çoğalmaları sağlandı.

3.4.3.2. Raw 264.7 Hücrelerinin Pasajlanması

T25 cm² 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 aracılığı flask yüzeyi kazınarak hücreler yüzeyden kaldırıldı. Mikroskop altında hücrelerin yüzeyden kaldırıldığı gözlenerek biyogüvenlik kabini içerisine alındı ve flasttaki 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 cm² flask (Corning, USA) içerisine aktarılıp total hacim 15 mL'e tamamlanacak şekilde DMEM besiyeri (GIBCO, USA) eklenip hücreler 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatöre konularak çoğalmaları sağlandı.

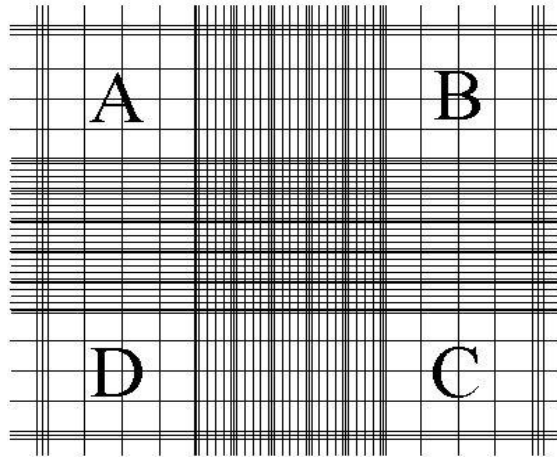


Şekil 10. : Raw 264.7 hücrelerinin inverted ışık mikroskobunda 20X büyütme objektifindeki görüntüsü

3.4.4. Hücrelerin Sayılması

Hücre sayım yapılacak flasktaki hücreler bulundukları 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 μ L tripan mavisi (Sigma, Germany) çözeltisinden ve 20 μ L hücre süspansiyonundan alınarak pipetleme yapılır ve 1-2 dakika bekletilip Hemositometrenin (Hausser Scientific, USA) olukları arasına 10 μ L alttan ve 10 μ L 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.

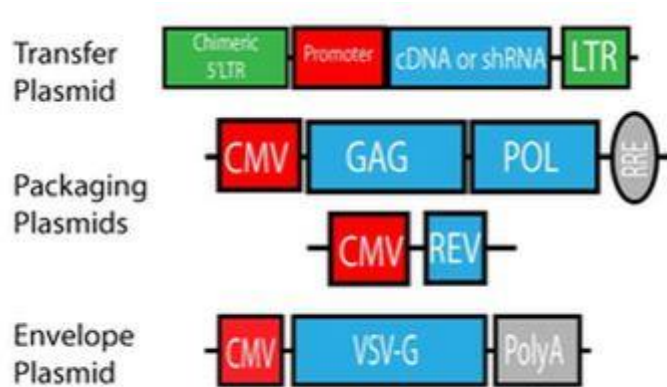
İlk olarak Poly-L-lysin 0.22 µm'lik filtreden geçirildi. Sonrasında filtrelenmiş Poly-L-lysin petrilere konuldu. Büyük ölçekli virüs üretimi için 150 mm'lik petrilerin herbirine 5 mL Poly-L-lysin konuldu. Küçük ölçekli virüs üretiminde ise 100 mm'lik petrilerin herbirine 2 mL Poly-L-lysin konuldu. Ardından 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 ddH₂O kullanılarak iki kere yıkandı ve her bir yıkama işleminden sonra ddH₂O 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 CO₂ 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 ddH₂O ile 450 µL'ye tamamlandı. Sonrasında üzerine 50 µL CaCl₂ 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 CaCl₂ 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 petripler 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 hazırlamış olduğumuz karışım mikropipet yardımıyla yavaşça bu petrilere eklendi. Plazmit içeren karışımın hepsi eklendikten sonra petripler 8-10 saat 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı. 8-10 saatlik inkübasyondan sonra petriplerdeki 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 CO₂ 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 ddH₂O ile 900 µL'ye tamamlandı. Sonrasında üzerine 100 µL CaCl₂ 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 CaCl₂ 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 CO₂ 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 CO₂ 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 kabinlerdeki 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 CO₂ içeren inkübatörde 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 CO₂ 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			
0,1µL						
0,5µL						
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 CO₂ 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 CO₂ 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 μ L virüs örneği 2000 hücreyi enfekte ederse

1000 μ L 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 4×10^6 virüs partikülü varsa

A mL'de 2×10^6 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^2 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_2 içeren inkübatör de 16 saat inkübasyona bırakıldı.

On altı saatin sonunda kabin içerisine alınan flaskaların besiyerleri aspire edilerek uzaklaştırıldı. -80°C 'de (Forma, Thermo Electron Corp, 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_2 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 CO₂ 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 CO₂ içeren inkübatör de inkübasyona bırakıldı.

3.11. Akan Hücre Ölçer ile CD80 - CD86 Taraması Yapılması

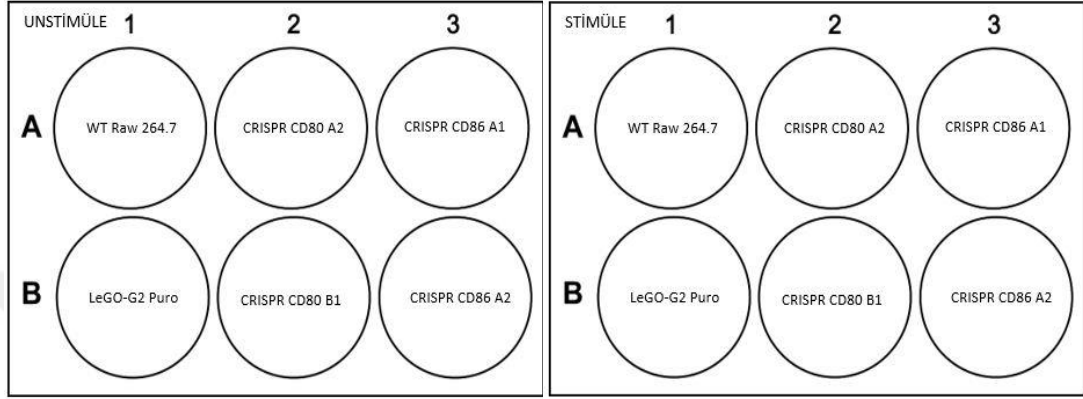
3.10. da anlatıldığı gibi yapılan seleksiyonda hayatta kalan hücrelerde CRISPR'ın çalışıp CD80 ve CD86'nın susturulduğuna emin olmak için monoklonal antikolar kullanılarak akan hücre ölçer ile bu hücreler değerlendirildi.

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 CO₂ içeren inkübatör de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün stimüle edilecek plak inkübatörden kabin içerisine alınarak her kuyuya 10 ng/mL IFN- γ (Sigma, USA) konuldu ve hücreler sonrasında 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatör de 1 gün inkübasyona bırakıldı.



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

3.11.2. Akan Hücre Ölçer Analizi

IFN- γ ile uyarılan ve uyarılmayan 2 plak 24 saatlik inkübasyondan sonra inkübatörden kabine alındı. Ardından her kuyudaki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılır ve 700 μ 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 μ L toplanan hücre süspansiyonundan konuldu.

Ardından 2. tüplere 1 μ L IgG APC (BD, USA), 1 μ L IgG PE (BD, USA) monoklonal antikorlarından konuldu. 3. tüplere ise 6 μ L CD80 APC (Tonbo Biosciences, USA) ve 5 μ L CD86 PE (Tonbo Biosciences, USA) monoklonal antikor eklendi. 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 şekilde 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- γ ile uyarılmamış hücre
- 2. tüp (İZOTİP)** = IgG PE ve IgG APC monoklonal antikoruyla muamele edilmiş IFN- γ ile uyarılmamış hücre
- 3. tüp (CD80-86)** = CD80 APC ve CD86 PE monoklonal antikorlarıyla muamele edilmiş IFN- γ ile uyarılmamış hücre

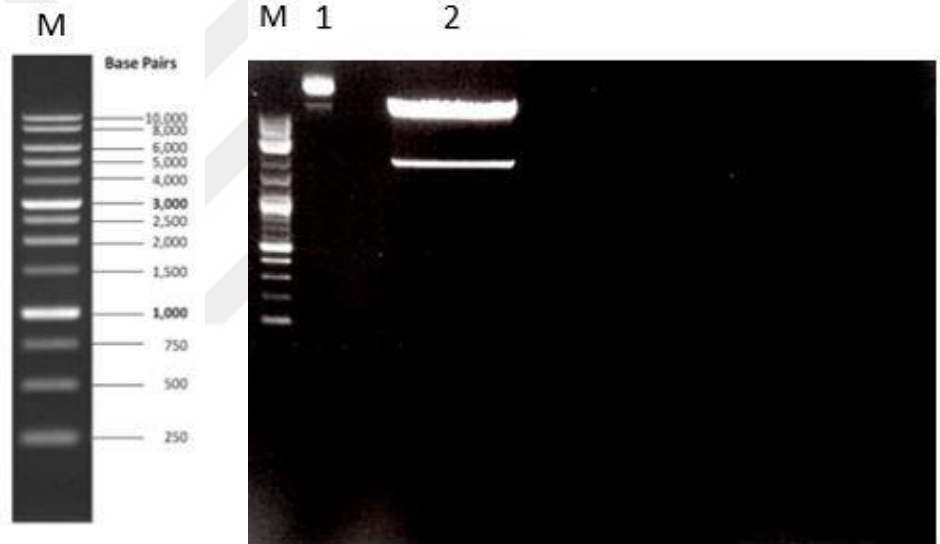
Uyarılmış (STI;Stimüle)

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

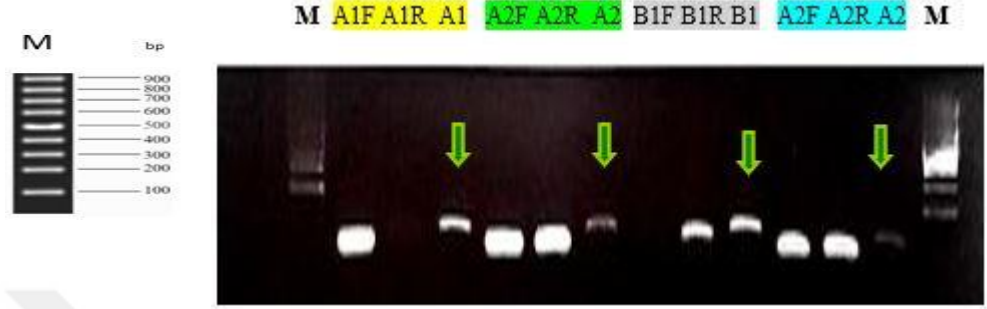


Şekil 15. LentiCRISPRv2 vektörünün BsmBI ile kesiminin %1 lik agaroz jel görüntüsü M: Moleküler ağırlık marker (New England Biolabs inc.,USA), 1 nolu kuyucuk; kesime tabi tutulmamış LentiCRISPRv2 vektörü, 2 nolu kuyucuk; kesime tabi tutulmuş LentiCRISPRv2 vektörü. Jel görüntüsünden de anlaşıldığı gibi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

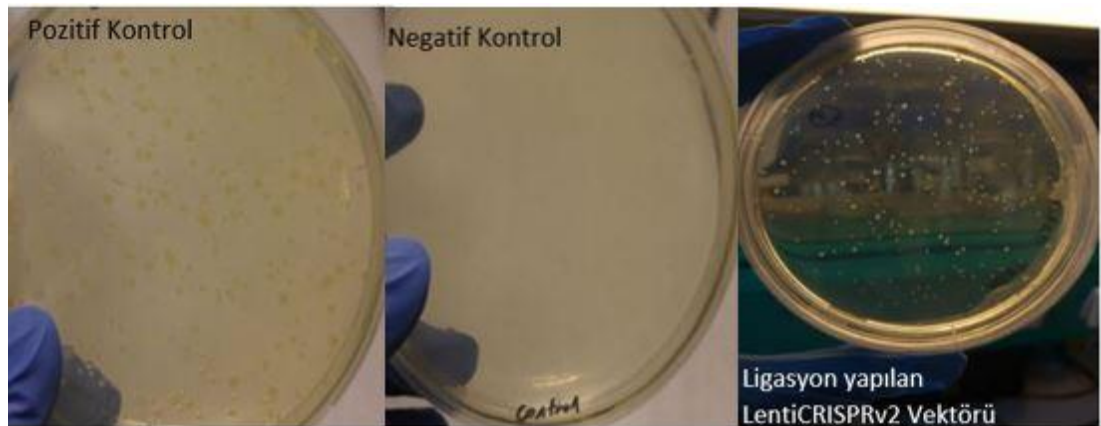
Dubleks olan oligolar olmayanlara göre agaroz jelde daha yavaş yürüyeceklerdir ve jelde diğerlerine göre daha yukarıda yer alması beklenmektedir. Ayrıca kontrol amaçlı olarak her bir oligonükleotitin üst ve alt olarak dubleks işlemine tabi tutulmamış halleri de jele yüklendi ve böylece dubleks olan ve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

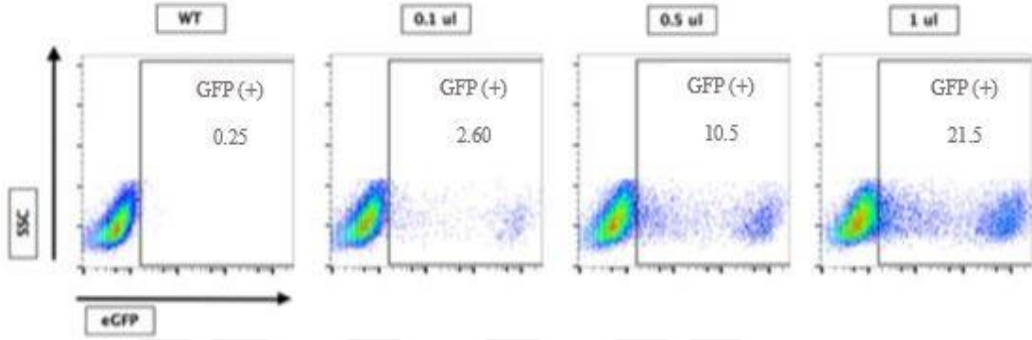


Şekil 18. Ligasyon yapılmış LentiCRISPRv2 vektörünün %1'lik jel görüntüsü. Pozitif kontrol olarak kullandığımız LentiCRISPR vektöründe kesim gerçekleşti. M: Moleküler ağırlık marker (New England Biolabs inc.,USA).

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.



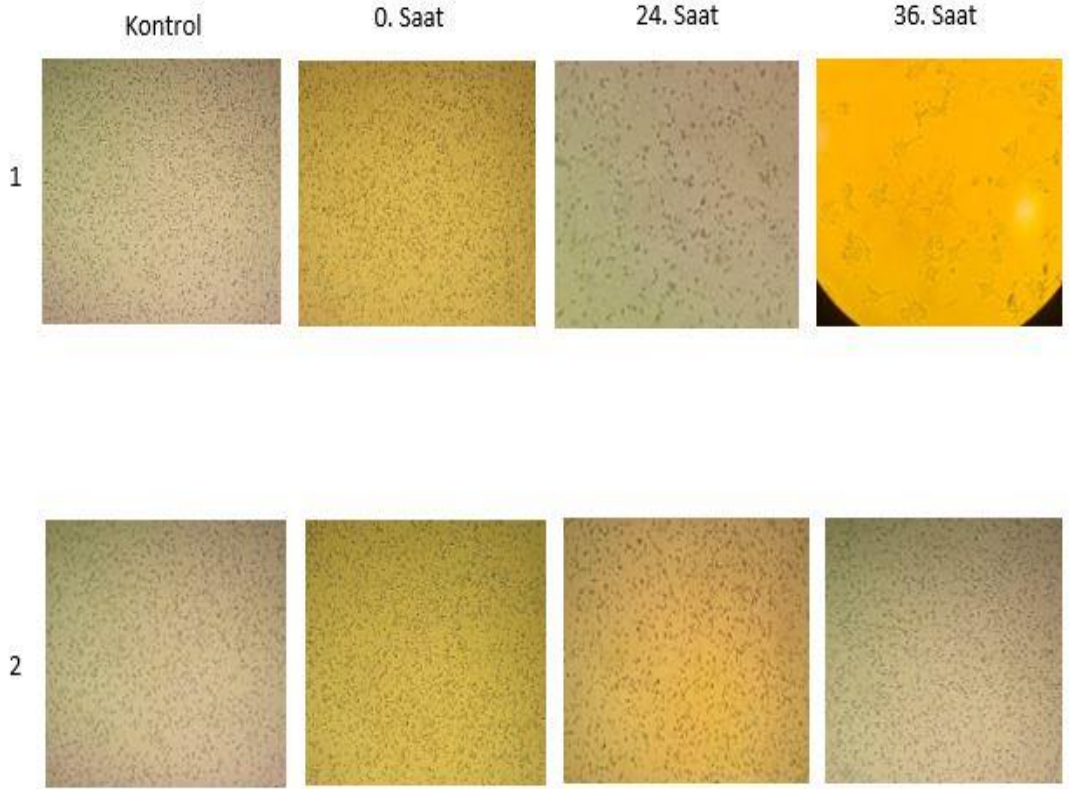
Şekil 19. Akan hücre ölçer sonuçlarının görüntüsü

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

Virüs Miktarı (μL)	GFP ⁺ 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).



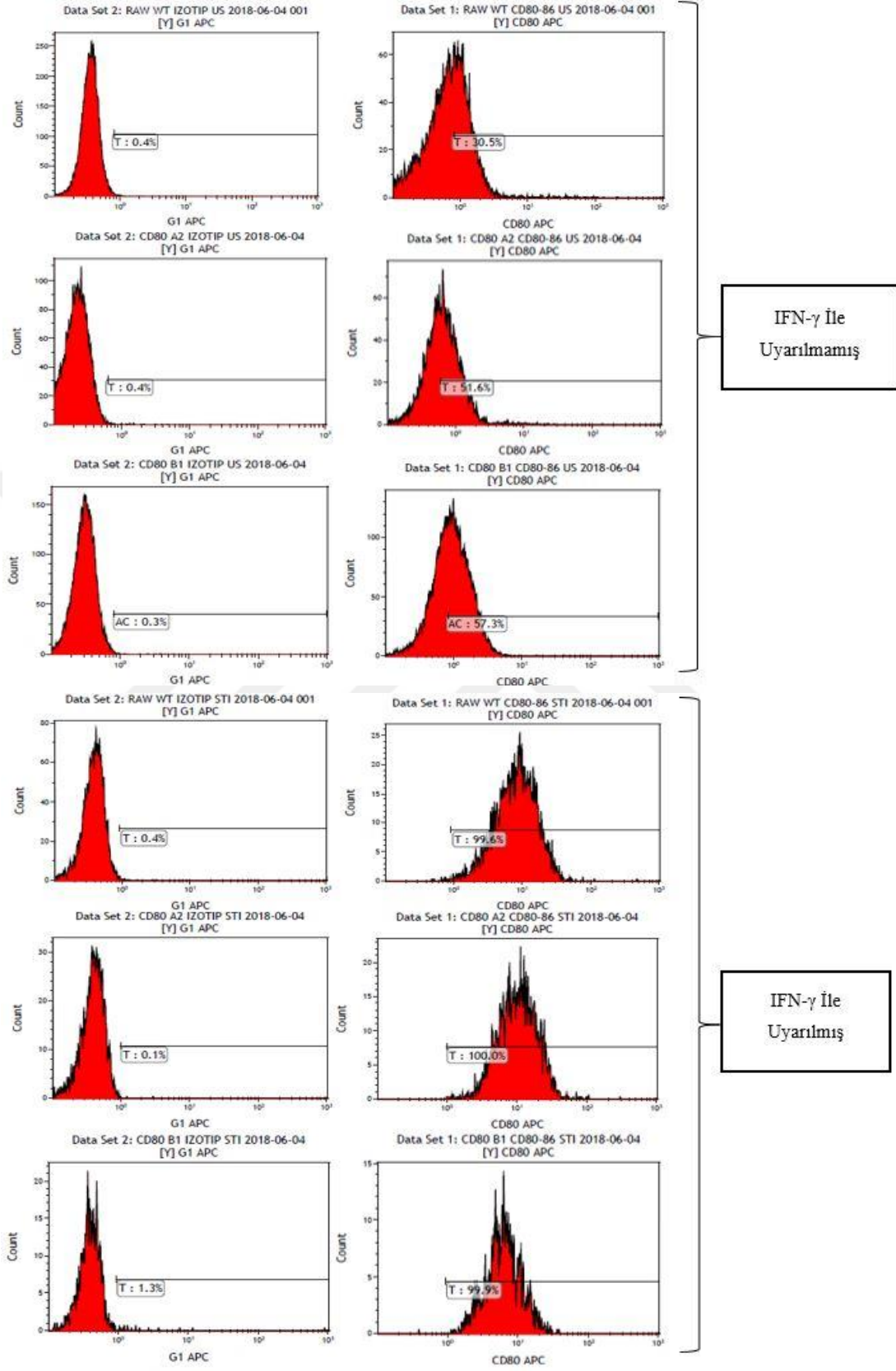
Şekil 20. Transfeksiyon sonrası puromisin seleksiyonuna tabi tutulan Raw 264.7 hücrelerinin görüntüsü. (1) Seleksiyon sonucunda ölen hücrelerin görüntüsü, (2) Seleksiyon sonucunda hayatta kalıp çoğalmaya devam eden hücreler.

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- γ ile uyarılmayı takiben %99,6'ya kadar arttığı; G2 Puro (boş vektör) virüsü ile transdükte edilmiş uyarılmamış hücrelerde %41,9 olan CD80 ifadesinin IFN- γ uyarımı ile %98,1'e yükseldiği; CD80 A2 CRISPR vektörü ile transdükte edilmiş ve IFN- γ 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- γ ile uyarılmayı takiben %99,9 olduğu görülmüştür.

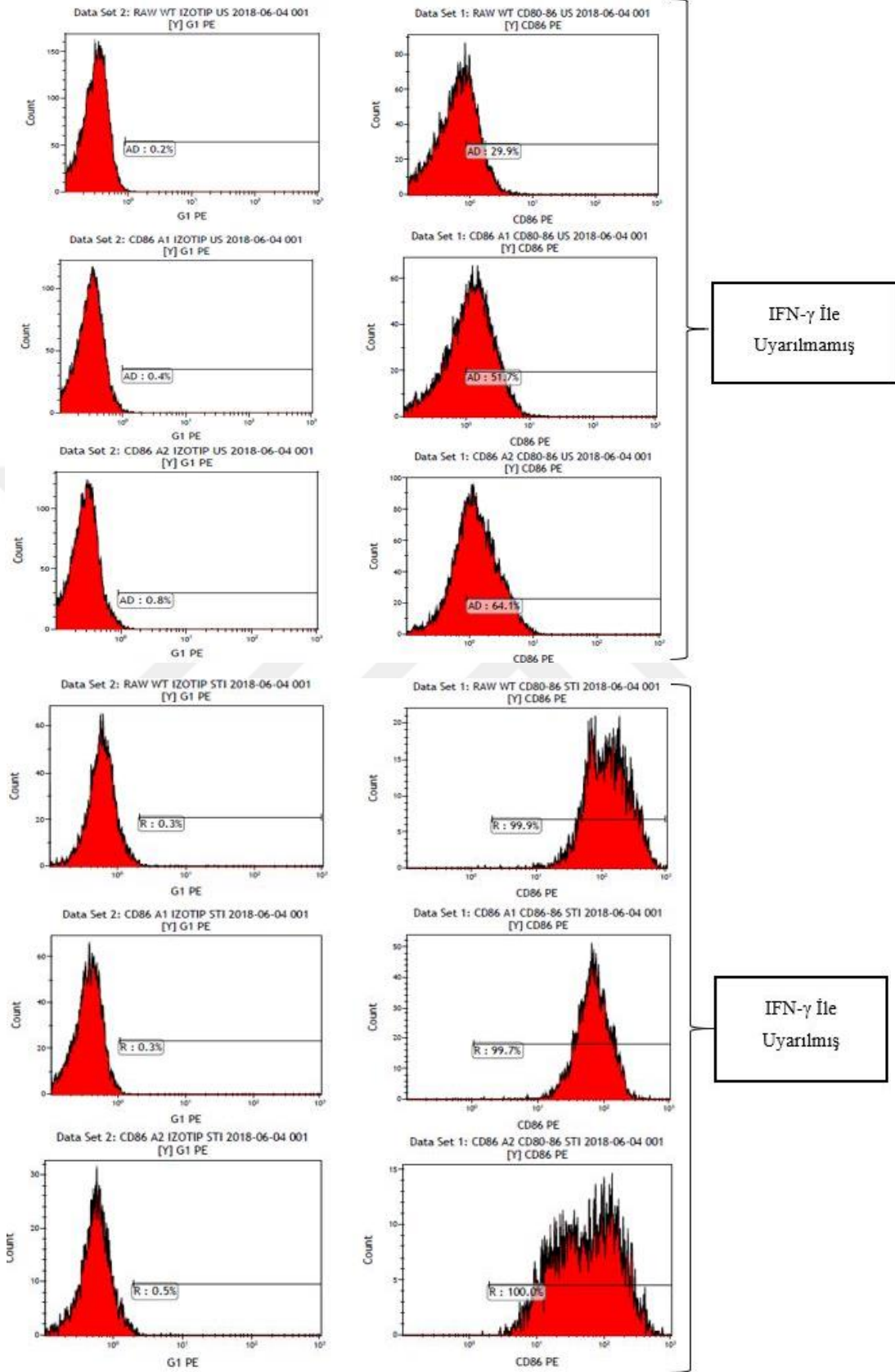
Ayrıca, CD86 A1 veya CD86 A2 CRISPR vektörleri (uygunsuz vektörler) ile transdükte edilmiş uyarılmamış hücrelerde sırasıyla %50 ve %65,6 olan CD80 ifadesinin IFN- γ ile uyarılmayı takiben sırasıyla %97,5 ve %99,5 olduğu gözlenmiştir.



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- γ ile uyarılmayı takiben %99,9'a kadar arttığı; G2 Puro (boş vektör) virüsü ile transdükte edilmiş uyarılmamış hücrelerde %41,1 olan CD86 ifadesinin IFN- γ uyarımı ile %99,9'a yükseldiği; CD86 A1 CRISPR vektörü ile transdükte edilmiş ve IFN- γ 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- γ 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- γ 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 susturulmadığı görülmüştür.

Ayrıca, CRISPR'la transdükte edilmiş ve ve IFN- γ ile uyarılmamış hücrelerde CD80 ve CD86 ekspresyonunun IFN- γ ile uyarılmamış WT Raw 264.7 hücrelerine kıyasla beklenmedik şekilde daha yüksek olduğu gözlenmiştir. CRISPR'la transfekte edilmiş ve ve IFN- γ ile uyarılmış hücrelerde CD80 ve CD86 ekspresyonunun ise IFN- γ 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 ettirirler bile aktif hale geçip antijene yanıt veremezler. Böylece T hücreleri tanıdıkları öz antijene karşı yanıtsız kalırlar. 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- γ 'nın ekspresyonu düşerken IL-10, TGF- β 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 özgülüğünün 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 Scholar.

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, Mahdavinezhad 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

α
 β
 $^{\circ}\text{C}$
 γ
 μg
 μm
 μL

Açıklama

Alfa
Beta
Santigrat Derece
Gamma
Mikrogram
Mikrometre
Mikrolitre

Kısaltmalar Açıklama

Bç
CaCl₂
CD
CO₂
DMEM
DNA
ddH₂O
DTT
EDTA
g
GFP
IFN- γ
IL-
IDO
LB
NaCl
NaOH
mm
mg
mL
mM
ng
PBS
PCR
RNA
Rpm
sn
TBE
TGF- β
u

Baz çifti
Kalsiyum klorür
Farklılaşma Kümesi
Karbon dioksit
Dulbecco's Modified Eagle's medium
Deoksiribonükleik asit
Duble Distile Su
Dithiothreitol solüsyon
Etilen Diamin Tetra Asetik asit
Gravite
Yeşil Floresan Protein
İnterferon Gamma
İnterlökin
İnsan indolamine 2,3-dioksijenaz
Luria Bertani
Sodyum Klorür
Sodyum Hidroksit
Milimetre
Milligram
Mililitre
Milimolar
Nanogram
Fosfat Tamponlu Tuz
Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Ribo Nükleik Asit
Dakikada devir
Saniye
Tris-Borik Asit-EDTA
Transforme Edici Büyüme Faktörü- β
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
TCTACCGACCAAGTCCCATGCCAGTCCCTAACTCCCCAACTTCACTGCTTTTTAAACATACATAACAATCATAAATTGCC
TCAGAGCAGTCTCCTGGGTCTCTTATTCTCAAGGCTGCGGCATTCCAACACTGTTAGAAAAACACCATCAGGATTCTTT
GTGTTTCTAGATGCAAAACATTTTTGTAGGGCGAAGTTGAGGTTTTTCTAATCAAGAAAATGCCGGTAACAAGTCTCTTCA
AGCTAACTGGTTGGCTAAGGGGTATCTCTCCAAAAGAAGAGATCCACATGTCAGGCCAGTTGTAGGCATGATGTCTGTCT
CCCTCCCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCT
AGGGTTTCTTTGTATAGCCCTGGCTGTCTGGAACACTCTGTAGACCAGGCTGGCCTCGAACTCAGAAATCTGCCTCTG
CCTTACCTCCTGAGTGTGGGAATTAAGGTGTGCACCACCATGCCCGGTGGGATGTCATTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTT
TTGATACTTTATGGAAGAAAAAGAAAAGATAGACAAGCCTTTCATGTAATACTCCATAGTCTCAATAAGTGGTGTTCG
TAACGTGGCTTCTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTT
TTCTTTGGTTTCTTTTAAAGATATAAAAGAAACATTTTCTTAACTAAAAACTGCCCTTGGACAAAATACTTTTGGCAGTC
ACTCTGTGTCCAGAATGGAATTTAAGCTTTTCATGGCCTAGCTGTAGTGAAGGTTCTCTGCTTTTTTTGGCTGTTGTATGT
GAAATGGGGTGGGTGGGAACCACTCACTGTGTCTAGTGTAGTACACCCACCCCGCAAGCAGAATCCTTTTACCCA
GCTTTTTACCCAGCTGTGCTCACCCGGTGTCTAGAACAGGCCTGGACAAGTCACCTCCCTAGAGTTCTGGGGACCTTTG
AGTTGCCCTCATGGCCACACCCTGATTGAGAACTCTCACTCTGTGTAAGATAGAGCTACTGGGGAGTTTTATACCTCAAT
AGACTTTACTAGTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTT
ATCATCTTTAGCATCTGCCGGGTGGATGCCATCCAGGCTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTT
GGTGCCTAAGCTCCATTTGGCTCTAGATTCTGGCTTTCCCATCATGTTCTCCAAAGCATGGAAGCTATGGCTTGAATT
GTCAGTTGATGCAGGATACACCCTCTCAAGTTTCCATGTCCAAGGCTCATTCTTCTTTGTGCTGCTGATTCTGCTTTT
ACAAGTGTCTTCAGGTAAGGAAAGAACTTTCAGGAACCTGACTTAAGCTCGCTGGGGTTTTGAGGGAGATGATGCTGTCT
GTGCCGTATCTCTCCATTCACTTTGTGACACTCCCTGTTCCTTTGTGAACTGGAGAGCCCTTCAGAGTATCTCTGGAG
TACTTTAAAGCTATGAAAGTTCTGGTTCGATGAGGTTAAAGGATGCGGAGGGTCACACAGAAAGTTATACAGCAACTTA
AAGCAAGAACTTCAACTCTAACACAGAGGTGGGGACATTGCCATTTCAACAACACATAAAACCAACGAGCAGCTTAGAG
CTGTGGCTCCTTCATCGCTATTAGATGTTTACATCTTGTATGTGCCAACAGCGTTGGTCTGGGGTCTGGTTTCCA
AAGTGCCTTTCTATGATACAACTTAATTAATGTAACCTACCTCTAAGATAATGTTGATCTTTTCTTTGGGGTGGGGTGGG
GAATTGAGACACTTCTTAGTATGGAATCTTCTCTTAATATTTCTTCTTAAGTGTGCTTTCTCTCTGCGCAGCCAAACC
CAAGATGTAGCACAAAAAATTAGCCTTAAAGATATTTCTAACGGGCTGTGTGTTTCTTATGATGTTCTTCAAAGAATATTT
TGTTCTCGATGCATTTCTGCTTCTATGAAGGCAGTCTTACAGAAGCTCACTTCCAGGATTATTCAGAGGCATGGGAGA
TCTGTGCAAGCCATGCCTCTATGTACTTGGACCACCATGTCCTGCATTACTATTTTTTAAATGGGGTAGCTGACACATGTA
ACTTTTTAAGTGCAGAAAACAAAAGATCTGCTTTCTAAGGAGTGGTGTATACATTGGTTTCTCACAAACAAGGAGGAAGC
TGGACTTCCGAAACCGGACTGTCCGAGGCCCTGCTGTAAAGCAGCTCACCCAAAACCTGCCCTGAATATGAAAACT
GTGAGAGACAAGGAGAGGGCAGGGAGAGGGAGGATGAAAAGTGCATAGACCACTGGCTACAAGTAGTGGCAGTTTAA
ATTTCTGTCCAAGTTGTGAAACTTAGTTGCAGAACCCAGAGTACCATGACGTAAGTCTCATTACACTTCAGGTTCTG
GACACGGTTAAATGTCCAATAATAGCCGGGTGTGGTGGCGCACGCCTTAAATCCAGCACTCGGGAGGCAGAGGCAGGC
GGATTCTGAGTTTGAGGCCAGCCTGGTCTACAAAGTGAGTGCCAGGACAGCCAGGGCTACACAGAGAAACCTGTCTC
GAAAAACAAAACAAAACAAAACAAAAGTCCAATAATTACATAGTTACAATCTTTTTCTGGAAATTAGGGGGCACC
CTCAAACTCAAGTCTTCAGGAGAAAGTATAGAAACCCAGAGACTGGGCTGGGAGTGGATGGGTGGGTATTGTGAAAAAC
TTTCAAAAAGTTAGAGAAGAACTGGCAAAAATTTAAACCAAGCAATTTAAAACCATTCACCAGAAAACTTGGTCAAGAT
TAAGCCAAAGTGATACATTTTTAGCCATCAGGAAAAGTACTGTGTGCTATGGCTATGCCGGTTCTTTCTGCTCTGAGTCAA
AAAATAGTCTATGAATATCTTAGCTTTGAATGTCCACCTATCTCAGAGGTTAGTTGAGCCTGAGATTCTGTCTCTCAAACA
AGTTTGCTTATGTAAGTCTGCAGTAACCCCTCAAGAAATAAGGGGGTCTGAGATTCTGTCTCAAACAAGTTTGCT
TATGTAAGTCTGCAGCTAACCCCTCAAGAATAAAGGGTCTGATTACTGCACTGAGGATCTGAGAAAGGAGGGAGT
AGGGGGTGGAGGAGAAGACCTGACGGAGGCAGATGGCAATGGAGGATTGGGGGGCGGGTATCAGACTGACAGGGT
CTCATGTAGCCTAGGCTAGTACCCTTACTCACTAGGTAACGAAGGATGACTTTGAACTTTTGATCTCTGCTCTACCT
CCTAAATACTAGGATTCTAGACATCTACTACCATGCCAGTTTGTGCAGTATTACAGATCAAACCAAGGGTTTCTTACAT

TCTGGGCAAGCACTTTGCCAGTTGGGCTACATTGAAGCTGTGTGGCTTGTCTTTTGTAAAGCATTGAATTCAACAAATAGCA
GGCAGTTTCTGGGTACAAAGATGTGTTTGTGGTCTGGGATAAATTATGAGTCCTTTCCTTCATGTAATCCCTAGTCAC
TGGAAGGAAGAAGACAAGAGATCTTGTAAACCATAGCATTAATATGTGACCACTGCAGAGAGGAGAACTTTGAAGAGA
AGGCATTATTCAGAGGTGCTATTTTCAGTGGCTGGATCACGACCAGAAAGGAGCCAGGCTAGGCTTTCAGGTCACCATTG
AAAATCTGAATGTACTCAAATTGTACTGGGGGAGGGTTGGGAGGGTTTTAGAGGGAGGTGGGGTTGGCACTATCTATAT
ATTATACATATCTAACACCTGGGGGTTTTCTTAAAAGACAGTCTCCAATACAGGGGATTTTTTTTTAGAGAAGTGAAATTAT
TTGCATAACTATAACGATGTATCTATTATGCATAGATGTTTCAAGCACATATAAAGCACACCTCCTAGAGGGAAACG
CTAAATCATGACTTTGGGAGATAATGATGTGTCAGAGGAGGTTTCGTGGACTGTAAACAAATGTGTCACCTGTGATATGGGTG
GCTGCTGAGGAGATGAAGCTGGAAGTCGAGGACAGGATCGGTCTGTGGGAATCCGTCATGCGTGTCTGCCAAATCTGCT
GGGAACCTAAAACCTGCTCTGATAAATACTTCTGAAATATTTTATGTTTCGGTTTTCTGGAGTCAGGGTCTCACTCTGTTGC
CCAGGCTGGCCTAGAATTCAGTACGTAGCTCGGTCTTGCCTTAACTCCCAACTCAGCCTCCAGAGTAGCAAGGCTTAGG
TCTGTGAGCTACCTACCAGGTCCGGCTTTAAAGCCTCATTTAGCAGCTGCTGCTTCTTAGGTGGATTGGAATGGGGCTT
GAGCTTTGGCATCGCTAGGAAGCATGCAAGTGTGCTGAGGCTGGAGAAGTGTACCGTCTCATTTCGAGTATGAGGTCTGT
ATGCAAAGGACGGTTAAAGAAAAACAGGAAATGTGGAGCCAGATGTGTTAGCTCAGGTCTGTACTCCCTGATACACTGG
AGGCTGAGCAGGAGGATCAAAGCATCAAGGCTTCTGGGATAGAGAGTGAAGTCAAGGCTAACATGGACCATACTTGA
AATAAAAAACCTGGGCTGGAATAAAGCCTGGTGGATAGAGTACTCGCCAGCATAACATGAGGTGCTCGGCTTCTCTCTA
GTAAGGTATAAGGCACAAGCCTATAATCTTAGCTCTTTGGAGGTATAGACAAGGAGAGAAATTTGGAGTCAATTTCAAGG
GCATAGTGAAGTTGGAGACCAGCTTGAGTTACACGAGTCTTGTCTTGGAAAAAGCGGGGGAGGGCACTGAAGATATAGC
CCAGTGATGGGTGCTAGAGGCTCTGTGTTCAATCCTTGGACTGAGAAAACAAAAATCTTTTGTAGTTGCTGAAGCGTGAG
GAATGGCTGGTAGAGCAGCCACAGCCATGGTGCAAAAGTCTAACAGGAGGCTGTTTTCTGGAGCCAAATGTATAGGGGA
TGCAATGGTCTGATGAAAGAAAGGTGTTGGGGGGAGTGGATGGGCTAAGGATGTACAATATGAAGCTGGTGAGGACT
GGGCAGTTTTTGGTGAGGATGTGGGTGGCCTGTGGTGCCTGGGGTCAAGATCAAGTCAGGTGAAGTAAGATAATACAGA
ACTGTTTTGGAGTTGGGTGGATGTACTACACCTTCAGTCTGCTCTGGGACAGGAAGCCACACCTGGTGGCATGGTCTC
CTCTCTCTATTACTCTCCAGCCATCTGTACCCAGAGCAAGTTGGCCTCTTTCTTTACAAGAGAGAACTCAGCCATATCC
TCTCTGCCATCAGGTTTCAAACAGGGTCTTCTGAGGTAGAAGCACATGACTGTATTCCAGAAAATGGTGGCTAGGAGCAA
CGAGCATAAATGGGCAGCCTTCCCCCTAGGGCTGGGATCCTTAAAGAAATGGCTCAGCTCTAAGGCTGGATAAAAGCTTC
CTGCGGAAGCCAGCCAATGATGTATTAGGACTCTAGGGTAGAGAAAAAGCTAATGCCTCAAAGTGTACCTCTCATCC
ATTACACACTGCTGTCCAAACAGGACTAGCCAAACGCATCTCATGGGTGTACCTTCTGGCATCATTACCCTGATAATAGT
GGTCCGAATCTCTTAGCCTTCTTACGAACCTAGAATTTAAGAGAAAAAATTTTGAAGATCTGATTTCTATAGAATATAA
GGGCTGTATGTAAAGTGGAGAGAACTCAGGGACCAAGACTGAAATCTTCCAGCAGCTCGCATGCCAGCCACATCTTC
CCTGTGCTACACCCTGAACAGGCCTAATACCAGGCCATGGTATTCACTTAGTGAGAAGCTTAGAAGTACCCATAATAT
CGCCTCCATAGAAAAGACTGTGCCAAACATCAGCAGTCCCCATACAAAGTACTAACAGAGTGCTTAGCTCTCAAGACC
AGATGAGACTGGGCACATTTGGTGTGGTAGGGCTGTAGACCATGTATCAGCATTAAATATCTCAGGCTTAGGAGGATA
GGTGGTCTCATGGCTTTTGTGGCTTGGTTTGTCTCTTTACTCTTCCAAATTAATCTATTTTTTTTTTCTAGTCTGAC
AAAATGCTTATGGAACAAGCACGTTTATGTGTGCACATCAATCTTATTGAGTTGTTTTGCTTTGTTTTTCTAGTCTGAGG
ATCAAACTCAGGGTTTGGCAAGTGATCAACCACCTGGTTAAAAACCTCACCTGGTGGATTGAGATGCTGTGCCAGCTT
GCTTCTTTATTAGGAGACATGGTGATCCAGTACCAAGACGCTCGCCAGGGGCTTGGCTGCCGAGGACGCTCTTCTATC
TGCTTCTGTAGTTAGAATCTAGAAAGGTACATCAGTCTGTGCGGAGAGGAATGCGTTCGTGTGTGTGTGTGTGTGTG
TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTATGTGTGCCACATCTCACATGTGGAGTCCAAAGAAAGTGGTTTTTTTGTTTTTTTTTTCTC
TCTCTACGGTGTGGTCTGGGATAGAATTCAGGTATCAGGTTTAGCATCAAGTGCCTTTACCCCTGAGCCTTCTCA
CTTGGCTTTATTTTACTATTTTTATATCTCCGATTATATTTTCCAATAATATCATAAATATCAGCTTTTAATTTTTTTCTTA
CTCTCATCTAAAACACTCTTTTCTGAAAAATATAAAGCGTGCACATTGATAGCATTCTTTGGTTTAGGTTTGGAGCTTTT
ATTTATATTTATTTATTTATAGGTTTGGAGCTTATTTATTTATTTATTTATTTAGAGACAGGGTCTCACTATGTATAGCTCT
GGCTGACCCAGAACCAATTTGCAGGGTTTTCCCTGTCCAATTACATTAGGGCAGCAGGAGACCTGTGATTGGACAGGGA
AAAGGCAGATCTAAGAGTTGCAGATAAGAAGAGGAGAGTGTGCCAGAGAGAGGAGAAAGGCAAAATGGAGGCGGATA
TGAACCCGTGTGGCTTTAACCAGCCACAGGTAGCTATGCTATCATAAGGTTGGAAGTATTGGGATAATGCTTTTATCATT
ATCCATTGGTTCAGAAATATTGTATCGGCATCTTGTAAATGTGACTTATTGATACATAAATCTGATTGGTTAATTATAA
GCTTTAAGAGTTTTGATTCTACCAGGTAATGGGTGTGTGGTTCAGACCATAGGTGGCTGACGGGGTGGACGGACAT
TACAGTACTGAAGAGAACTCAGGAGCTTGGCCATCGGAGAGTTGGGTAGAGACAGATCCAGTGAAGCCGACGTGGGG
CGAGAGTTGCCTGCACATGTGTGGGAATGTGCCATTCTTTTTTTTTTTTTTAATTTTTCCCAACAACAAATAGGTAGACCC
AGGTGACCTCAAACCTGAGAGATCTACTGCCTCTGCCTCCCAAGTGCCTGGGTTAAAGGCATGCACCACATGGCTG
GCTGACAGCACTTCTCAAAGAAAGAAAAACCTACGAAGCCTCTAAGCTGTAAGCCAATCATAATACCACAAACAAACA

AACAAACAAACAAACAAAGCTTGAGTTATCTGAAAGGCTTTAAAATTCACCATTTTAAAGTGAACCACCATTTCATGGGC
TTTCGTGTCCCATGCTGTTGATGGAGCCATAACTACTCTAGCTTCAGATTATTTTCATGACCTCATACTAGAACATTCA
GCTGCCATTCTCCATGACATCCCGTCTCATCTCTAGTAACCACTACTCTACTCCCCTCTCTAGGACCATGCCATTCTGG
GCATTTCTTACAATGCAAGCATGCATCCTATGGTGTGTGTGTCTGTCTGGCTTCTTTCTTTTAAACATTGTTTACAGGGTTC
ATCTGTGTTGACGTATGTGTTGGAACATCATTTGTCTTAAGAGCTAATAATACACTGCTGTAGTCTGAGTTCTTAAAAGAT
GTGTGGTTTTGTCTTTAGGTCTGTTGGCTAGAGCGTCTCTCTAGGGGATAGTGGTTGGGAGTTGAGGAAGGAAGGAAGA
CAGCAAAGGAGTCAAGAAGGCGGGGACTGGGGCTAACTGCTTAGTGTCCCCTGTTTGGCATCCAGAGGCAACTGTAC
ACAAGTTCATTAGAAGTAAGCAGAGCTGCCTCCTGCTTCTGCCTATTTTCTCTCATAGCCTTGACTCTATCCAGCTGCTGA
CTAGAAGGGGCCAGATGTGCAGCCCAAGCAACTGTGGGCCTTCCATTTCAGACCAGGGTCAGACAGTTTCTACAGTTCT
ATTCTGGGTGTGATTACAGAGAGCAGCAAGCCATAACAAGGCCAGAAGAGCCCTATGAAAAACCCACATTAGGGCTGGGG
ACATGACCCTGGAGGCAAACTTGTGTGCAGCTCTAATGACTCGTTAAGTCTCATAGTCCATGGTGAAGGTCTAAGA
TCTGACCTCTACCCCGTGGCATGTATCCATCCACCATTTCACACATACATAAATAATAAAATGAAACGTGAAAGTAT
GTGTTTTTAAAAAATCATATACTGTACAGTCAGCAAAGATCCTTGTCTTCTCTAGGATTGCTGTGGCAGTTTTGTA
CAGTAGGAAAGATAGCACACAGGAGCTGCTGAAGTGAACCTGAGACCCAGCAGCATTCTCCAGTTCTTCAGGGTCATGG
TTCTAACTCATGCTGATCCAAGTCTAATACTTAGTGTGCATTTCAGCAAGTATCCACTTCATATCTTCTAAGCTAGGCC
CTGTTCTCAATACTGCAGATGTGGCAATGAACAAAACAGGCAAAGCTGCTCATATGGGCACACATGTCATTTATATATAC
AAGCATAGATAGGTAGGTAGGTAGGTACGTAGGTACATAGATAGAGGGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATATAT
AACCTTCCAGGTATAACCTGTATCTGCCAGAGCAAGACTGACGATAAAGCCAAGCATAAGTAGCATATACTTGAATCACA
GCATTTCAGGAGCTGAGGCAGAAAGATTACTCAGTTAAGGCCAGATAAAGAAAGTCTTGATACACAGAGATAAATA
ACATAACTCATCTCAAAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAATCCAAGCCAAAAAGATTGAAGACAGAC
ATATCAAGGACAGAGCTATGGAGTGGCTAGACAGATGAAGTTAGGAGGGGCTGTTTGACAAAGAGAGATAGAGAAGAC
TTTTCTGAGTAGAGAACCAACCCAGACTGGTGTGAACCTGGACCGTGTGGATGGGCCCTGAGGGAGATGTTGGCTT
AGCTCATATCTCAGGCATGATATGAGATATGGTGAGGAGAGTTAAGTACGGTCTGTTTGAACACTCACTCCTGCTTTGT
CTGGGGTGTGGAGTGCCAAAGTGGTATACCTGACCAACTCAGAGATCAATACATCTTCAGGCACTCAGCTCCCCTCCAGA
GTCACCAACAGGCAAAAAGCCTGACCCGCGTTTCTTCCATTTTTTTTCTCATTGCTCGGGTATCAGAGTGAAGCCTGG
TTCTGTGGAACTTCCCGGTCACACAGGAAAGTTCTGATTCTCTTTTTCAGTCTGGTCTTCTCCTCAGCATCAGGGTGTGA
TGTGTGGGGGCTCAGACAGGAATGGAGAGCAACCCATGGTGTGGCGGCATGACCTTTAGAGAAATCATCCATACTTCTCT
CCATGTGACTGCACGAACTCTCAGGAGTTGCCGTCGGAAGGAGACGGTTTTACTTTTGCTCATTGTTTTCTCTCTTGTG
TCATCGGATGCCAAAAATCTGCCAGAAATATTGCATTCTATGGGGATGGGAACAAGTAGGTCTGAGGAGGGGATACCC
CACTATTTGGGGCCAAAGAAATGAGCTGTTTCATGTACAATGTTTCATCAGGCCAAGCGAGACCAGAGTGTACACAG
CTGATAGGATCCCTCAGTGAGATTAAGCAACAGAGGGCAAGATTTGGGACAGACAGGAGGACAGAAGACACCCCT
GCATCAGACTGTATGTCAGGATCCCTCTGTCTATGCCATTAATTGAATTTACTTCCACAGTGTCTAGAACGGGCAG
CTATCACACCCCTTTTACAGCTGAGCTGAGACTAGAATCTAAGTCAATAGGAGCACAAAGTCTAGCTCTGTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTTTTTACCTCTGTAGCTTTCTGTATCTCTAAATGTGTCTAGGTCATAGCCTGATCTTTAGCTCTCAAAGCC
CTCTCAGACTTGTCTTCTACTTCTGTCTAGTTATGACCCGAGTAGGAACTTTGCTCTCAGCAAAGTTGCATAAAGTATAG
CCTGGGAGCTCAGCGCCTCTGATTAGGAACACAATACTTTCTGCTGATGGCTGGCCTGGTAGGAATGTGCCATTGCCCC
AGATCTTGCTTTCCAGGAGCCGGAGGGCCGGAAATGAGGCTGCACACATGAGTGTCCCAAGGACATCTTTGTGACTC
TCAGGGTACAAGCAAGCTACGGGCAGATGAGAGCACTGGTCAAGGGGCTGAGACCTTGGGCCTTAGAGGGACGCTGCCT
CTAAGCCACAGGCCAGAGGCTAGTTAGATAAGGAACTTTGTGGTCTTGATACGTGCTAGGAGCTAGTAAGTTGGGGTTT
AGATATAAAATGTTGGTTTTCTGGGGTATAGTATGAGGAAACATGCCTGATTGTTTTCTTTAATTTTTAATTTTATATG
CATGGATCTTTGTATACCTATATGATGTGTGTGCTTAGTACCACAGAGGCCAGAAGATGCCAGGCATTCCCGGACTG
GAGTCACAGGTGGTTATGAGCCACCTTGTGGTTGCTGGGAATTAGAGAGAAGTCGCTGGAAGAGCAGCCATTGCTCTTA
ACCACTGAACCATCTCTGCAGCCCCAGGAACTGAGTTTTAAAACAGGCCCTACTTTGAAGATCCGAGCTGTAGGATCACT
GCACACACAGATGACAGACAGCTGAGACAAAAGACAGGATAGAGGGGCCATCAAGTAGCTAAGAGGGCAGTCATAGCCC
ACAGATATAAGCAGCAGCCTTGTGAGTGGTTCCAGCCTGAAACCATGAGGTCAAGCCAAAGCCTGAAGAGAAAGGACCTC
TTCTTTTCTATTTGCTGGGTTTTTTTTTTATTTTTATTTTTTTAGTTTTGTTTCATTAGAGACAAGGCTTTTTGTGGTGT
AGGCTGGCCTCAAACCTTTGTGTAGGCAATGATACACAAATTTGAACTCCTGGTCTTCTTCTTCTACCTCCCAAGTGT
TGCCATTATAGCCTCTAGGACCCTTCTTTTTATTGCTTATTTATTTGTATGCACACATGGTACATGTGGAGAGGTCA
AAGGGCAACTTGACAGGAGCTGTTCTCTCCTTCCAAGGATGAAACTCAGGATGCCAGGTCTGTTAGCAGTTGCCTTTACC
CACTGGCTCTCTTCTGTTGAAAAGCTCAATGGAGCAGCCGGGTGGAGCAATGCAGTGTGGCTTCTGTTATTCTGGAAC
GAATCCTAAAACCTAGGCAACCAAGTACCTTGGATTCTTCTTGTCACTATAAGTAAATGGCAGGCAAGAGTAACTAGGG
GAAAGGGTTTGTCTGCCAGCTTCCGGGTGTGCTCCCTCGTGGCAGGGAGGTCACTGCAGCAGTTACATGAAAGGAG

ACTTGCCTCTTTTTAGATGTTGATGAACAACTGTCCAAGTCAGTGAAAGATAAGGTATTGCTGCCTTGCCGTTACAACCTCT
CCTCATGAAGATGAGTCTGAAGACCGAATCTACTGGCAAAAACATGACAAAAGTGGTGTCTGTCTGCTCATTGCTGGGAAACT
AAAAGTGTGGCCCGAGTATAAGAACCGGACTTTATATGACAACACTACCTACTCTTTATCATCTGGGCCTGGTCCTTTC
AGACCGGGGCACATACAGCTGTGTCGTTCAAAGAAGGAAAGAGGAACGTATGAAGTTAAACACTTGGCTTTAGTAAAG
TTGTCCATCAAAGTTGGTAGGATTCTCCTTAAAGGAACATGTCTATTGATGGGGGTGACACGTTTAGCAGAGAAGGAAA
CGTCTGACTTCATAAGTGAGGGTTGAGTCTCTAGTGCTACAGAAAACCTGATTGATCAAGGTGGAGACCTCTACTAATGC
ACTTTCTTGTAGTTGGGATCATTCAAGGTCACGGTAACCATCCCAGGCGCTAGAATGGCCTGAGATGCCTTCTGACTCGC
GGAAGCACAATAACTGTGATATATAGTGGCCGTAAGTAACTGCATTGAGAACTATCTTATTCTGGGTAGCAAGTTAA
TCAGGTCACATATTTTTACTTTTCTGAATCATTGTCATTCTGCCTTTGTTTCATAACATATACTCACCTTTCTCCACTAAA
AGTGACAAAACCTGGGTAACTGAGTCATCTGAGAGATGAAGAGCCAGTCTTTTATTTTTAAAGATTTACTTTGTTTTTA
ACTATGTATATGTGTGTGCTCAGATGCTCAGAGCAGTCAAGAAAAGTATTGGATTCCCCAGGAACTAGAGTTAAAGGCA
CTTGCAGTACCCCAATATGAGTGCTTGTGTGTTCTGCAAGAGTGAGTTAGGAGTATGTGCTTAACTGCTGAGCCATCTCT
TTAGTCCCAAAGGGCTAATCTTTAGATGGTTCAGTCTTGCAAGACCTTCAAAGTAAGCCGGGCGTGGTAGAATATGCCTT
TAATCCCAGTCTCGGGAGGCAGAGGCAGGCGAATTTCTGAGTTCGAGGCCAGCCTGGTCTACAAGTGAGTTCAGGA
CAGCCAGGGCTATACAGAGAAAACCTGTCTCAACCCCCCCCCCAAAAAAAGACCTTCAAAGTAGTTCCTCTAACTCGT
TATCTTGTAGCAGGGCTAGGGGAGAAAGCTGAGGCTGTGTAAAGTTCAGTCAGATAGGAAAAGGTGGCTCTTACTGAAC
TAACCATTTCTTAGAAAAAACAACATGAGTTGTGACTGAGAGCGTTAGGCCTGCAGATTTGTTACTCCAGGTAAAAA
AGCCATGATGTCTGGTTAGAAGAAAACAAAATAAAATTTTTATGTTGACTATCCAAGTAGTATTGATTGCGTGGCATT
AAGGTAATAAGTAGAAAATAATAATGCCAACTATAAATAGGTCAGGAACACATGCAACTTTATTTAAGAACAAGGCCA
TTTTAAATTTCCCTTTGTTTGTAGTTTGGGTTTTGAGATAGGCTCTCACTATGTAGCCTTGGCTGGCTTGGAGTCTAGCCT
CAAACCTCAGAGAGATTTCACTACCAAGGAATTGTTGTTGTTGTTGTTTACAATGACTTCTCTGCAACCAAATTCAGG
GTTTTCCCTTTCTGGTAACTATACTCCGTAATCTTCCCTCATTCTCCCATTTCTCCAGTATCCCTGGGCATTTTCAGAAG
GTTTCTTGACAGCCTGATTTAAATGAGAGCGTCTTCTAAATATATCTGTGTGTCAGGCTCCGTGCTAAGTGGTGTCTT
TCCATCCCTCATCTCTGGAATGCATGGGTATTAACCTGCCTACAAACCAAGACTAAAAAGCAAGGGAGTGGCCACAG
TCACAGGGCAAATCTCTGTTAAGAGCTGCTCTTGATAGTCACTGACCCCTGCTCATAAAGCTCGGTGGCACTCAGACTT
CCAAAACGAAAGCTCAGGGTATGGACTGGAGTAGAGGAACTGACTGCCACAGGAGAGGGGAGGAGCTAAATTCCTAAA
GTCTAAGCATGAGAAGCAAGTGGCAGGAGGTATCCACACTGACTCTAAGTCTACTTTAGCATCTTGTCTGGAGGTCAAAT
ATACAAATGAAATCAACTCCAGGAAGCCTCCTGTCTCTTAAAATGCCAGAGTAGCAAGGAATTAATAAAATGTAGTGG
TTGTGATTACAGATTAATACTGTATATTTGATCTGAGTACAAGCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGAAAATGAGGA
TTGTAGAGGTTGGGAGGTCCTTGGGTAGGTCATGGAACAAGGCTTTGGAATTTAGCTACTAAGACATTAGAGGGCC
AGACTCGGGAAGTGACTTAGTTGTGTGGTCTAATGCTAGCTAAGGCAGAAGCTGAGTACCTTCTGATGTCTTCGCATC
TATGACTTTGCACAAATACAACAAATCTTTGGCCGATGCCCTAACACCACAGTATCCCTAACAGCAACCGCACAAACAG
CACAAGGCAGTAAGCAGTACCAGAGTGCCTGGAATCCTGCCTACCTAGGCATTTTTCTTAAAGATGAAGGCCACTAGAA
CACAAGGCAGGAAGCTGTGCAAGTCCCGCGCGGTGGAGGCGGCAGCAGCGGCGGCTGCTCTGGTCCCGGAGATGGTGGA
GCAGAGGGCCTCCCGCAGCGACGGGGAGAACGTGTTTGTGGCAGCCAAAGATCTATGCCTACATGAGTCTAACA
GTGCTCTGGAATGCGCTCTCCACTTCAGGAAGAGAACTCGGTTGCCATCACGAGGTCAAATGCCGGGGAAACCATTAG
CTGGAATCTACAGGAAGCGAGAAAAGGAACGCCAGGAACGTTATCCGAAGCGCTGTGAAGTCAGATGAACAGAAGAGC
AAAGACACCAGGAGAGGTCCCTGGCGCCTTTTTCAAACCAAAAATCCGAAGCAGCAGAACCTCCAAAAACTCCACCCC
CATCATGTGACTCTACCAATGTAGCAGTGCCTAAGCAAACCTGAAAAAGCCCCTCAAGGGCAAGCAGGCCCTCAGAA
AAAGTCTCAAGGGAAAACCCAGCAGAATAGAAAATTCACCGATTTCTACCCTGTGCGGAGGAGCTCCTGGAAGAGCAAA
GCTGAGCTGCAGTCTGAAGAAAGGAAGAAAATAGACGAGCTGACTGAGAGCGGGAAGGAAGAAGGCATGAAGATCCAT
CTAATTGATGGCAAAGGCAGGGGCGGGATCGCTACCAAGCTGTTTTCCCGGAGGATACTTTGTGGTAGAATACCATGGG
AACCTCATTGAAATTACCGATGCCAAGAAAGCGGGAGGCTCTGTACGCACAGGACCCCTCCACAGGCTGCTACATGTACT
ATTTTCAGTATCTGAGCAAAACCTACTGCGTGGATGCCACTCAAGAAAAGAACTGCCTGGGGAGACTCATCAATCACAGT
AAGTGTGGAACTGCCAGACCAAACCTGCACGACATCGACGGCGTGCTCACCTCATCTCATCGCCACCCGAGACATCGC
AGCTGGGGAGGAGCTCCTGTACGACTATGGGACCGAAGCAAGGCCTCCATCGAAGCCTACCCCTGGATGAAGCACTAA
CCACTTGACCTCCCTGCCTCCCTGCCACCCTGCCTCCTCAAAGGTCAAAGTGCCTCAAAGGGGAATGAATTTTTTTTTTA
CACACACACACTTACTCTTAGCAGATTACTTCAAATGTTTTTAAAAAGTATATTAAGATGCCTTTTCATGTAGTATTT
AAATATCTGTTACAGGTTTCAAAGTGGACTTGAACAGATGGCCTTATATTAACAAAAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGG
AAAGGGTGGCTTCGAACTCATTATATAGCCTAGGCTGACATCATACTTCTCTACTGCAGCCTCCAAAGTATACCTGCCTA
CTGTTGTGGTCCACCACGCGGGCTAACCTTACTTTTTTAAGAAGCAAGGGGGCATTGAACATGGACTTAGGGTGTATGCA

TCCCAAACCTTAAGGCAGCCACTGTGTGGAACATGAGTGAAGGTGGAGGGCGTGAGGAGAACATGCAAGAGAACGGGA
GGAGGCACAGCAGAGCTAGAGGAGAATAAGTAGGTATATCTAGATTATGACATCGATAAGGCCCTGGCCATAGCAGCCAC
AGAAATGAGCCAAGAAGACAAGTTAGCTTTTACGCTTTCTCCATAGAATCTTCCCATGCCAAGTTAGCTCGGTAGGTGC
AAGAATTCAGTTACTTTTTTTCGTGTGCAATATCTATATCGTTGGATATAGGACAGTGCAAGGGAATGCTAGCAATTGTG
TGCCATGAGATGATCTGGCAAAGTAAAAGATTCTCCACAGGTACATACTGAAGAGGTGTAGGATGGGAACCCAGCAGG
AGGAAGCACATCACAAACCGATTCTTTTCTTTCCACAGCCCCAGAAGACCCTCTGATAGCAAGAACACACTTGTGCTCTT
TGGGGCAGGATTCGGCGCAGTAATAACAGTCGTCGTCATCGTTGTCATCATCAAATGCTTCTGTAAAGCACAGTAAGTACC
ATTTTTATTATCACGATCAGTTCCTAGAAGACCAGACACTGTAAGTAGGGCTCAGCACATCTTCAGTATATCAGTCTAATC
TCTGCTCATATTTACAGTAAATCTATGGCAACTTCAGATTTAAAAAAGTTCTCGGGCTGGAGAGATGGCTCAG
TGGTTAAGAGCACTGACTGCTTCCGAAGGTCTGAGTTCAAATTCAGCAACCACATGGTGACTAAACAACCCTGGT
AATGAGATCTGGCGCCATCTTCTGGTGCCTGTAAGACAGCTACAGGGTACTTAGATACAATAATTAATCTTTTTAAAA
AAATGTTCTCATCATGTTCTGGCCACTCACTGTTAAAAATATATATATCTGGACCCTACTGTATGCCTAGCATTCTTCT
AGACATGCAAATTCAAAAGATAAGAAGTTGTTGCTCGGTCTTCTTCTGCGCTGCGCCAGGAGCTGCAAGCACAGGCATC
CCGCCCCTGCCTTCGCCATACCCTTCTCCAACAGCCATAATACGAGAAGCTGCGCTTCCCGCCGAGGATGAATCCC
TGATCTGAGCAGCCACAACAACCATATGGCCAAGGTGCTGACCCCGAGCTGTATGCCGAGCTTCGTGACAGTTGCACGC
CGAGCGGCTTACTTTGGACGACGCCATTAGACTGGCTGAGACAATCCGGGCCACCCGTACATCATGACAGTGGGTGCA
GTGGCAGGCGACAAGGAGAGTTACGACGTATTCAAGGAACTCTTCGACCCATTATTGAGGAGCGGCACGGCAGCTACC
AGCCAGTGATGAGCACAAGACCTACCTCAACCCAGACAACCTGCAGGGTGGCAATGACCTGGACCCCAACTACGTGCT
GAGCTCGTTGTTGCGCACAGGCCGAGCATCCGCGGCTTCTGTCTTACACCCCCCCCGCTCCCCACCCACCCCGTAC
TGCAGCCGCGGGAGCGCCGCCATCGAGAAGCTGGCAGTAGAAGCTCTGTCCAGCCTAGATGGCGACCTGTCTGGCA
GGTCTATGCGATCAAGAGCATGACCGAGGCGGAGCAGCAGCAGCTCATTGACGACCACTTCTCTTCGACAAGCCTGTG
TCGCTCTGTTGCTGGCTCCAGCATGGCCCGGACTGGCCGGATGCTTGTGGCATAATGGCACAATGACAATAAGACTT
TCCTGGTGTGGATCAACGAGGAGGACCACCTGCGGGTCACTCCATGAAGAAGGGGGGCAACATGAAGGAAGTGTTCAC
CCGATTCTGCACCGCCCTCACTCAAATCGAACTCTCTTCAAGTCCAAGAACTATGAGTTCATGTGGAGCCCTCACCTGG
GCTACATCCTCACACGCCCTTCCAACCTGGGCACCGGACTGCGGGCAGGTGTGCACATCAAGCTGCCCCACCTGGGGAAG
CACGAGAAGTTCTCGGAGGTGCTCAATCGGCTGCGGCTTCAAGAAGCGAGGCACAGGTGGCGTGGACTCCGCTGCTGTCT
GTGGCGTGTGTTGATGTCTCAATGCTGACCGCTGAGCTTCTCGGAGGTGGAGCTGGTGCAGATGGTGGTGGACGGAGTG
AAACTGCTCATTGAGATGGAGCAGCGGCTCGAGCAGGGTCAGGCAATCGACGACCTCATGCCGGCCAGAAGTGAAGCT
GGTCTCGCCACCATCAGACTGTGCTTCTAACTTATTACCCGGGCAGTGCCCGCCATGCACCTTGATGTTTGCCGCT
GGGACTGAGCCCTTAGCCTCGTTGTAGAGACTTCTGTGCCCCTGGGTAGAGTTTAATTTTTTGTAGGCTAAGCTGTTGCT
GACACTGAAATAAACCTGCCCTAAAAAAGACTTGTGCTTAAAGTCCAGTCTGAAAAGC
TAACTCGAGTGGCACACATCTCCAATCTCTGCACTCATGAGCCTGAAACAGGAGAACAGAAAGACTGCGTCAAAAAGAA
ACTTTGAGACTGTGACAAGACCCTGTTTCAAAAAGGAAGGATGCATCTGAGATTAATCCCTGTTGGTTTTCCAAAACCTT
CTATTTCTTGGAGACCAATGATTGCTGACTACTTTGAAAGTATCTCTACTGCTGACTGATTCTTAATCTTTGCATTCA
GAGGATAGGTAGCATGGCAAGGTCTGAAAGAAGAGTCTTCTTTGGAAGAAGTCATTAAGGCTTGATAAGTTGCGCTGG
AGAGATGGCTCAGTGGTTATGAACACTGACTGTCTCCAGAGGTCTGAGTTCAACTCCAAGCAACCACATGGTGGCTC
ACAACCATCTGTAATGGGATCTGAAGCCCTCTTCTGGTGTGCTGAGCACAGTGACAGTGTGCTGATACACATCAAATAA
ATAAATCCTTATAAAGTTATTTTTTAAAAAAGACTTGTAAAGTATAGATGCAATAAGTGTTTTTTACCAATCCTCATTCC
CCAAAAGGCACITTTGTATCAAAGATGGAGTAGTTGGTTAGAAGAGATTTCTAGGACACTATGGGTTTTAAAACAGAGAT
TTCTATTTAGACATCTGACCATAATCACCTGAAGTATCAACTAGACTAGGAGTCACATACACTGAGCAAATGAAAAT
TAGAAGACCAACATCCGCTTTAACCTTTTTTATAACTTCATAACCTTCAGCATCCGAAAAAATTTTTTAAAAAGGT
AAAGTTCAGATAAAAAGTACCAGATACTATTGTAAGAAGGAACCAAACTGAAGTCATTTTGAATAAAAACCTCCATTTAGA
ATAGGGAGTCAAACAAAGTTCCCAAGACCTCCCTGGATGAGTGACATCTTGGTTGGTAAGTTAGAAGTACTGCTGGGC
AAGCCACCTTCCACGACTGAGCAAAGTACTATTGAGAACAAAATACATGTACCACAAAGGAATGTTCCAGGGAGGA
CCCCTATCCCTGAACCATGGTTGCTGGAAAATGCACTTGGCATGGATGGTGTGCTGATGTTTATGCTTAAAAAGCTC
TATAGCATTCTGTCTCGGGCTGCAGTTCAGCTCCCAGTCTGTTCTGCATTCTGATCAATCAATCAGTCGTGGCTTGGT
TGCAATGAGCTTTTCTTTCTGCGCTGATTTGAGGTTTTGAGTTATGTTGGATCCAAGAGGACCCATAACACTATGCTAT
GAGAGGCTCACCTAAGGGTAGGATACAAAAGCTTAGTGGGCTCATAGTGTCTTGGTATGATTTACTAGTCTTGCTCTCA
GTTCAAGTGTCTGTCATCTCACCCTACTAGTGTGACATTAAGTGGCCGAATAATACTCTGTTCCAGTAGTATTTAGTA
TATAAGGGGTGTTCTCTGCTTCCCTCGGCGTCTTCAACAAACAACAGGAACAACAAAATGTCTTTCAGAAATTACAAA
TGCCCTGGAAAAAGGTGTGTGGGTGTGTGTATGTATGT
TCTTCATTTGTTTTATAATTTATGTTTATCTTCAAGGAAGCTGTTTCAAGAAATGAGGCAAGCAGAGAAACAACAA

ATTTAAGATAGAAATGCAGCTCGCCTATAGCTGTGCCTATACTGAACAGGCACAGGGCTCTTGTGTATTTCATTTACATT
GTATATGTAATTATGTATGCATTGTATGTAATCTAGGGATAATTTAAAGTACATGCAAATTATGACCTCACTTTATACTGG
GAACGTGAGTACCCAAGATTTTGGAAATTTGTTTCAGATTCTGAGGGGTGACTGTATTCAAGAAAACAACAGCAACAATAA
CAACAAAATAAGACACAAATAGGCAATGGGAGTAACTCAGTTACCCAGTGTCTGTGGGATGCCTGGCATGTTGTGCACTT
CGCTAATATTATTTTCATTAATGTCACACTTCACAGTGGTATCCGGACAGGCAGTATCATTGTATTAATTAATAGCTGAGCA
AGGCTCCCAGGCTCCTGAGGATGGAAGTGAAATCCTTTTTGTCTCTTTTGTCTGTGGCAGGTTCTCAGGGCACAGGATTCTT
AGAAGCAGCTATGCCTGCCCTTCTTTTGTCTGGGGCGCTGGAGGCATGGTCGGTTCGAGGCACAGTTGTTTTCTGCCCTT
TGTTATTTATTCCTGCACTTTGGGATTCTCTCTTCTACCCAGTGCCAACCTGGTTTCAGAAAGCCCTTTGTTGCTTTTATTTCA
AAAGTTTACAGATTAATTTCCAAGTTAAAACAATTTCTTCTCCTCGAGCATAATTTTAAATTTTCATATAAAATAAATGTA
TATGAAAAAGTGCATACCTTAGAGTTTCCACGGAGCTGTAGAAGCCATAGTGTGAATTTGTGCTGGCGCTGCTTTGGGT
CACAGGCCGCTGTCTAGATGGTGTGTTTAAAGATATTTCTTTGTTTTGATGCCCAAGCCAGTAAACAAGCAATAAATAGC
AACAAACAATGTTGAATCTTAGAGATAAAAGTATGCAAAATCATAACAGTAAATTATCATTTTTTAAAAAATGAAAATGT
TAATAAATGTTCTTGTTCAAAAGCAAGCAAGTAGCCGGGCGTGGTGGTGTATGCCTTAATCCTAACACTTGGGAGGCA
GAGGCAGGTGGATTCTGAGTTCGAGGCCAGCCTGATTTACAAAGTGAGTTCCAAGACAGCCGGCCTATACAGAGAAA
CCCTGTCTCGAAAAAACA AAAAGACAACAAAAACAACAAAAACAACAAAAAACCACCAACCAACCAAAAC
AAACAAAACAAGCAAAACAAGAAATTTCCGATGCTACTAAGGAGAGGGGAATATACGCTATATTGTCCCTTGATGGTTA
TGCACCCCTTCTGATCAAAAAAATCTGCTGAAATACATAGCTTTCTCAAGGATATATGCTGTCTAACAAAGACCCGTTTAT
CTTTACTACACAATGATAGATGTTAGTAAAGGTTTAAATGACATGGATATTTTTCTTGCTATTTTTTTAATAATGTGGGA
AATCTTAGAAACACTTGTTTAAAAATAGATGACTGGTTATCTATGAAACACCCGTAATGGAATATTATGAAATCGTTTTA
AAAAGGAAACTCGGCTAAAGAACAGTCTCTAATGTGCTTAGCTTATGGAAAAGTGGGAGGCATGGTGTATCCCTTTT
GTAGACAGGATGTGCACGTGCACAAAATTCACCAAAATGTGTAAGGGCTTTTACTTTTCACTGTATGCTCTCAGCCTTGAA
CCATTTCTGTAGGGAGAAAATTAAGAAAAGAAAAGAAACCAGCAACTACACTTGACTTTCTGTGTCTGCTTGTGATCG
CTCTGATTCTGTAGGAGCCCTCTGCCAAGGACTTCAGCCTTTTGTCTTGTTTTGAATTAATGCTTTTTTGGTTTTGGTGGTTG
TTGTATATTTGAATACCATACCCACATTTGACACATCTTCTAGGTGTGGGCCTTAAACAAGCTGCTGAGCTAGTTAATCT
TTAGTCTCCTGCCTGTCAAATGTGGCTGACAGTGAGTGCATATGTGGTTGTGAGGTTGAATGGGATAATTTATATTAAGT
GCTTAGAATTTTGTCTAGTAAGAACTTAGTAATTACTATTATTAGTCATTTTATTATTACCATTTTGTGGTTAAGAAAACA
GAGGAGAAATTACTTATTTAAAAATTAATAACTATATAATGATATTCTTAGGACTAGAATTCAGGAAGTTAATGTGTCC
TGTGTCTGTCTTCCCTCCCTGATATGTTCACTGGCCTTGGTAGAGGATCCCAGGCTACGAACCTAAAGGGCTGGCCTGA
ACAAGCTGTGCCAAGGAGAAGAGCAGCCTCCATTGAGTGGCTGTTCCCGTGGGAAGCTAAACTGGGGGAAAAA
TGGTGCAAAAAAAGAAGACTGAGGGAAAAGTCGGGCTCAGGGAGAAAGCATGAGCAAAGGGTTAATGGAAGACAGGA
AATGGCTCCGAGACCAGTTATGGTGACATCAGAGAGGAAAAGATTGCCTGAGCACTAGAATCCAGGGTGATTGCTTGT
TTAGTTTTGCTGTGATTTGGGTTTGT
TCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTGTAGATAAGGCTCTCTACATAGCCCTTGTGTCTGGA
GACTGTGTAGACCAGGGTGGCCATGAACCTCACAGAGATCTGTCTGCGTCTGCCTCCTGAGTTCTGGGATTAAGAGCTTGT
GCCACCTTGTGAGATTTGTTTTGTTTTGCTTTTTAACCTGTGTGGAGACTGGAGATGGGAGAATACTTAAAGTGTGGGGT
TCATCTTTCATAATGAAAAGACATTGGAACCTGGAATGAGTTTGGAGCAAATGGAGAGAGGGAAACAAGTGGTGTGATT
TGCTCGCGGGGACTTAAGCAGTTAGACGGAGATGCCTGAGGAGATAGAACAAGCCAGTGCCAAGCCCAAGAAAGG
CTTGGTGATGGCGGACATTGAGAGTCTCAGAATCTGGTAGTCAAATTTCTCCTGTTCTGTGAGTTCTCAGGGAACAGTA
GATTGAGGAGTCCAGGATGGAACCTGGAATACTCAGCGGGGCAAGGATGAGGAAGAACAGTCTAGAATGAACAGGA
AAGACTGGCTGGAGAGTTGGAGTAAACCAGGACAAAAGTGTATCCTAGAAACCAAGTGAAGAAAACAAGGACGTGTT
CATGGAGGGACAAAGCATACTGACAAAACCTCTGCATTGAGATATATGCCATGATAAATAACGGGAAAGATGATTA
TGATTGTGCTAAGGGCCCTTCTCCACCTCTCACATCATTATCTCAGAATAGGACCATATTTAGAGACAGGACTTTTTACA
AAGATAAGATAAATATGGGATCACTAGAGGGTGTCTTAATCTAAGCTTGTAAATGAGATGAGGAAATTTGGGTGGAGAA
ACATTTGTAGAGGAAGAAGAAAAACAATATTTATGTGGTAAGGAAAAGCGGTTGGGAGCAGAGTCTCCCTGACAGTTC
TCTAAAGGTGCCAACACAGTTGATAACCTTACTCTGGTACATTTGGCTTCTAGAAAAGAAAAGGAAAAAATTA
AACACCTGTATGTTTTCTTCAATTTGGTGTCTGGTCTCGTTCACAGCCCTGGTCAGCAAATGCCTGTGAGAGTGGCG
AGTGAGAGAAACCGAGCAAGAACATCTGAGAGACTCGAGAGAAACTGAGAAGAGATGAGGTATCTAAGAGAACAAAA
ATGTTTACAAAGGGAGAAGGTAGTCACGGTGTCCAATTTCCAGAAAGGTGTGATGGCCAAAATATCCGGAGACTCTC
GGTGGCCTTTTTGACACTCTCAGGTGAACAGAGGAACTGGCCTCAGAACGCCAAGAACGGGGAGGCAGCCAGAGGGA
TGGACGCCTTCTTAAGAAAAGTTTGTATGCAAAAAATAACACCTGACACCTCCATCAACTCCCTTCTGCTTTTTAAAAATGACAC
AGAGTTGGGAGCTGGAGAGATGGCTCAGCAGTTAAGAGCACAGACTTGCAGATGACCTTTCCAGACCCATGCCAGGCAG
CTTCAAACATCTGTAACCTCAGCTCCCGAGGGATCTAATAGTCTGGTCTCTGAGTGTCTCAGGCACGCATAGCCACACAC

AAATAAAGATGATCTAACATAAATCTTCATGGAAATGACAATAAGTCGTCAGCTGGACCCGGAAGGGCCCTCTCCCCAC
ATTTACCAGCTAAGCAAAGAGAGAAGTCGATATTTCTTTTCAACCAAACTTGTTTGAAGGATTTTCAGAAACAAAACA
AACAAACATTGTGAAGCTACCATTTACATGGTGGATTTGTACCAACATAGAGTCCAATTTGCATTGTGGAGTTTAGAG
AAACTTGCTTATCCAAGATTTCTTGAAGAAGGATTTGGATGGGTCAAAACATAACTAGAATCGTAGGGAGCATTCTTT
TATATCAATAAGCAGACAAAAAACCATAGTATAACTCAGTAGAAATGGAAAAACAGAAATATATGTGTTG
CTTGAAAAATTTTGAATCCAGAAGATCCACAATCAGGTATAATAATAGCCTAGGCATTTTGGTTTTTCAGATAGGGTTT
CTCTGTATAGCCCTGGCTGCCTGGAACACTTTGTAGACAAGGATGGCCTCGGACTCAGAAATCTGCCTGCCTCTGCCT
CCCAAGTGTGGGATTAAGGCGTGCACCACCACCACCCGGCTAGCCTAGGCTTTTAACCCAGCACTTATAAGGCAGA
GGCAGGGGTATCTCTGAGTGACTGGACACTCAGCTGTACATTGGTGAGTTCTAGGCCAAGTAGAGCTACACAGAGAAAC
CATTTCAACTTAACCCAAAATATGGGATGGAGAGGCAACCAAGAGGTTAAAAGTCTAGATTCTGTTCCGTAGCAACTGAG
TTCGTTCCAGTCCCTACTACAGGGAGTGATAACTACCTGTAACTCCAGCTCCAGAGAATGTAACACCCTTTTCTAGACT
CCTTAAAAGTGTGGCACACACCTGGTGACAGACAGATACTCAAACATATAAAATAAAATAAAATAAAATCTTTTAAAAG
GGAAGAGTCTGCACTATATTATTAGATTCAAAGCTACCAGATTTAATGAGAGAAGAGATCTAATAAGAAATAAAATGA
CTCAACATTTAGTTTATCTGAGCTAGTTAGTAAACGACAGCTTGAAATGGTAAAATTGGGGAAAGCTAAAACACTTAAC
CAACCAGAAAGTAAACCTAGTTTGGCACCCTATCTTATAGTGATTTTAAACCACTAAACAAGTATTCATGGAGAATTT
GAGACTGTGAGAAATTTGAAAGCACCAGAAGGAATACAGACGAAATGGATGTTGTGCTATTTTATACTGTGGTTTGAATA
GAAACGATGCTCATAAAATAGTCAAGGAAACCAATGTGGTCAATTACTCAGTAGGCAATCTCTCTCTCTCTCTCTCTC
CGTGTGGTATGT
GATGTGTGTTTTTATGT
TGTTGTGTGTGTGGTGTGTATGTGTGTGTATGT
GTATGT
CCAGGCCTGACCCACAATGCCTCTCTCTACTGTGCCTCGATCATTTTAAAAAGTAAATACAAATAAAAAAGTTTCATCTCC
CAGATATTAATGACAGCAATCAAACATTATGAACACATTTTCGTTTGTAGACAGAACGAAAAACAAATAATCCAAC
GAGAAACAGGCAAAACATGTAACAGGAGATTTCTCAAAAAAAGAGTATAAATGATAAATTACCACATTAAGGGTGATC
AGCATCATAAATATTGTTGAGATCAAAGTGAACAATTACCATATCCCTGAAGAGTATTTAAAAATTAATAATGTTCCCA
CCAGTGCTGGTAGGCTGCAGAGAAACAAGATCATTCTTTTGGGAAGTGTGGAAATGGTACAGACCCTCTGGAATAAT
CTTTTGTGGTTTCTTACAAAGATAATCATATTCTTATCATGTAAGTGTATGATTCCAATAGTTACCATTTATCTCAGAGAA
ATAACCATGTTTACATGAAACTAGTACATAAATATTCATACCTGCTTTATTTATAATAGTCAAGTTCCAGAAAAAGAGA
AATGACTTTTATGTGTAGTAGTAAAAAAGCTCTGGCACACCATGGAGTACTGCTCAACAATAGAGAGAGATGACCTAT
CTGTTACACAAAAAACCAGTGAATTGCTAAGGAATTACCCTACCTGAAATGCCAGCCCCAAAAGTTACAAGTTGCTT
CTCCACTTACCTGCTATTGTAACAGAGACAGGGACCAGACTGGTGGTTGCCATGGGTATGATGAGGTAGAAGGTAGAA
GTGAGGGACTCCTGGAACAGTTATCAAAAATCAGCACAGGGTACCTCTGGAATACCATCAGTCTATAGTGTGTGTGT
GT
GATCGCCTGAGAGTTACGGGCAGTTATAAGCCTCTGACATTACCGCTGAGAACCTAACTCAGATCCCCTGAAGAACGAT
CCCACCTTAAACCACTGCTTCTCTCAGTCCATGCTCTGCATAATGGCAATGGCACATATCACATGGGCCTACAGAGG
TGATAGAATTTGTAGAGCGTCACACAGAGAAAGGTGAGAGCATGAAACACTGGTGAATTTGGATTGAGTTTGGCGAT
TGTTCAATGCTGAGTTCTGGCTTTGGCATTCTAAAACAGTTATGCAAGACACTACCATTGGAGGAAACTGGTAGAAGAG
TGTTCAAGGTCCCTGTATATTTTTTCTAGCTTCTTTGAATCTACAATTATTGAAAGTTTAAAAATGGGTTCTAAAA
AAATAATTTTAAAAACTGAAAATGCTCATCTTCACTAAGTATTGAACACATGACAATCCAGCCCCTTCCAAGTAATTC
CATTATTGAATTATCAATTTGTGGAGTTTGAAGAGTCTGAAAGCAAATGAGCACACATTAGCAGTCTCTCTGTGCCT
CTGGTTGTGAAACTCTAAATGATTATCTTCTCATGGACAGGAGACATGTGTCAACATGTATTCAAGTTCTCCAGTGCT
CAGTCAACACAGAGGGTATCTGTCTGGTCACTGCCTGCTTCTTGTTCATAATAGCTTTAAAAAAATTCATTAAGCCTGT
AGTAGTTTGAATAAGAATGGTCTCATAACCTTATATAATTCAAATCCTTTGTCACAAGGGAATGGAAGTGTGAAAGGA
TTAGAAAACTTAGAAGATGTAGCTAGTGTGCTACTGAGGGTGGGATTAGAGGTTCCAGAAGCCCATGCCTGGCCAGCTC
CTCTCACTCCACTGCAGATCAGGATATAGTTCTTAGCTACTGTTCCAGCACTACATCTGCCTGCCACCATGCTCCCTGCC
ATGATGCTAGTCCACTAAACCTCTGATACTGTAAGCCAGCCCCAATTAAGTCTTTCTTTTATAAGAGTTGCTTTGATCAT
GGTGTCTCTGCACAGTAATAGAACAGTGGCTAAGACACAGACCTATAATTCCAGGCACTTTGGTCCACATTGAAGACATT
AAAGATGAGCAAATATGTTTCTTTCTTCAAAAACTCATTGGTAGTAAATAGATCAAACCACTGAGGAGGCCAGGAGAT
ACTGGTCTCTAGAAGAGCAGCAAAAGTTTTTAACAATGGATCCATTTCCCGCACTGAGCTTTATCATTTCTGATGAGT
TCCAGGAAATGGAATCTTACCTAGAATATAAGACAGGTGACCTCCTAATTATAGCCACGAGGGCAAGCCAAATGCAGAT
GAAGATGCTGAGCAAAACCAAAAGCCACCTAATTTTATGTAAAGGTAGAATGCCTAAAAACTGCTATAAAATCC
TGCTCTGGGATTTGGTAGCCCTGTAAGTAGCTTCAAGAACTGCTCGTAAAAATCTGCTCTTAAACCTTTTGGACCATAGATA

TTTACATGCACTTCTAAGTTTCTTTGAACCTAAGGCTTGGTGCATGCTGAGTAATCAATCACTCTGCTGCCAGGCTAACAT
GAGATAAGATCCTGCTAAGTTGCCAGGCCTCAAACCTACAAGTAATCCAGACAAGTATCTGATATTACACCTGCAGGAA
CTGTGCTCAGCTCTCTATTCAAGGCTGTGATGACTTTTTTTTTTTCTTATTCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCT
TCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCTTTCC
TCTCTCTCTCTCCCTCCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCTTTCTGTTCTTTCTTTCTTTTTTGCATTAGTTTC
TACGAATGACTAATGACTAAATTCACAGTCGACTTTAATTCTAAAAGATCCATGAATGACCATTTTATTACTATAGAAA
TGCTTATATATCTTGCTATAATCTTCTTACCTCCGTTGGGGGCACAGATTTTTGCACAGAAACGAATATCACATCATTATTT
AACATAATGAAAACCTAAGAGTCAGCCTAAATGGTTAAAGGTGTTAATAGTCAATGGATGGGTCAGTGAACCTAATCATG
AAATGAAAAGTAAACATTTAATAACAGAATGTGACACAAGACCATGTGATTTTAAAGAAAACAGTACACAGCCAGAAGC
AGCAAGCATGGCTCCCTCTAGATTGTACGGTTAGGAAAAACAGGTTCTTTGGTAGCAATTGCCAAATCTACAGCAAATTT
ACGTCATCCTGCAAACCTCAGTGAATGAAGTATAAAGCAGTCTTGTGGTTAGACCAGAGAGTTGGCTCATCAATTAAGAG
CACCACGACTTCTCTCCACAGTACTTGGATTGATTTCTAGCGCCCAAGGGTGGCTCCCAACCACATAGAAGTGCAGCT
CTAAAAGATTAGATACCCTTTCTGACCTCCTCAGTCACTAGGCACACATGGTACACAGACATCCATGTGAGCAAAACAC
CCATACATATAAAGTAAAGTAAAATTTAAGTGTGAAGTACTCTTGTGGTGAAGTTGAGCTTCTAAACAGGACTGGCTGT
CAGAGATTCTAAGATGCTGGAAGTGCATGGTTTGTAGTGTATGGTTTCTGTCTAGCCTATGGGGTACAAATGGTGAAAAC
AATGGTTCCCTGCCAGTCATTAGTCTCCACACTGTTGTTCTGCGTGTAAAGGACAAAGCAGTATAAACTGGTCTTGCATGAC
AAAGAGCCAGAAAAGTAAAATTTGTAAACATTTGATGAAATGCCCTGGTTTGTGTAATGGTTCAGGGTCTGGAAGGTCTT
GGTTTGGCCACTGTTCTACCAGTTTACCTTGACCTCTTGACCTCTGTTAGGGCAACATGGACTCACAGGAGATTGAGGCA
AATGTTAGTAGAAAAGTTTGAAGATACTACAGTGGAGGCAGGATGTGGTGAGCCAGAGGCAGCAAGGGGGAGGCTG
GGACTATGTTTTATTAATTTACCCAGTGATGTTGGAGAGGTGAAGATGGATCAGATAGGGATCCTGTGTAGACGCTACTG
CCACTATAGGGAGGGCAAATCACCAGAGCAGACATCTTACTCTCTGTTAAGACAATCTACCTATATGTCTACTTAGAA
GTGTGTGTATACAAGTGTGCATGTATGTCTGTGTGTATGTGCATATAAGTCTTGGCTTGTGTGTGTGTGTTGGGGAGGG
GTACTTTTAGCAGCACAAAAGACCGTGGTTCTGTGTAGAGATTTGAACCCAGGGCTCAGGAAATGGCTTAATGGGTA AAC
TTCTATTGTGTAAGCACGAGGACCTTCACTTGATCTCCAATGGCCTTGTAAAGCCACGTGGTACATGCCGAAATCCTG
GAGCTGGGAAGCCAAGGACAGGTAGATCTTAGGGGTTCTGTGGCCATCAGTCTAGCAGAATCTGTGACTTCCAGGGTCA
GTAAGAGACGCTGTCTCAAAAATGTCTGTGGAACAACATGGAGGAAGACGCCAAAGATTGACCTCTGGTTCCTCATGTGC
ACTCTCATAACGTCGCACAAGCACAAGTGTCTACGTACTCACATACTCACACCACAGAGACAATGGTGCAAAACATG
CCCTGGTGACCAAGCAATAAAGGCAGGAGCTGAGAGGGAGCCTTGAATAAGAACAAAAGTACAGAGGAAGTAGGGAAA
TTAAAGGTTGTAAACTAAAAGTGGTCCCCCAGTCATTGAAATAGCAGAGTAAAGCTAACTAACTAACTAAGTAATAAAA
ACAAAAGCTTCATCAAGATTAATTGCTTACATATACATACATATACACATACACACATACATACACACATACACACAC
ATACATACATACATACATACATATATATACCTATAGGTATATATGCATATACATATATATACATATATACATGTATA
TGCGTATACATATATATACCTATAGGTATATATACATACATCCAGAGAATCTGCATAAAACCAGGTCTGTTTTCCCTCTGA
AGAATTACAGTGCTATTAGCAGGAGGCCACATTCCCCATGGAAAATTCAGCTAGTCAACAGAGGCTGCCACCTTCAAT
GGAAGCCTGGCTCCTCCTCCTTTTGGCTGCCTTCACTTGAGAATATGACCTTGCTCAGGCTTTTCAGACCTGAGTCTAAG
AACCTCACGTTGAGAGCAGGAATGACCACTTACCAGGGCAAAGAAGGCAGGAAGCCTGTACAGAGACAGCCCTGTGAA
ATGCAAGTGAGGATCCTGTGAGCCACCTCCTCAGGGAAGCCAGGTCCTTCTCATCTGAGATCTCTGCCCTAGAAGGAGG
GAAGGGGGGAAGAAAGCGTCTCTCAGGAAGAAGGGAAGTACTGATTGAGAAATCAATGAATGGAGATTTAGAAAAGCAGA
GATCAGAGAAGTGAGCTTGCTCATCCACTGGCTGATCACTGCTTCTGTTTCCAGGATTTCTCTGCCCTCAACGGTCATGACT
GTCAGGGAAAAGAAAAGTCAAGAAAAGGAGGAGTGGGGTGGGGTGGCCAAACTCAGACTCTTAAATGCTTACACATGTAT
TTGTACATGAGCTCATACCATGGTCCCTTTATTTATTTGGCTATTTTGGAGGTCTTATTAAGTTCTAGGGGGCCTCAGGA
AAGATATTTCTCAGATTAAGGAACTTTGCATAGGTCGTTAATATCACAGAGCTCTAGCTTCTTTGTCTGTTAGAAAAGTT
GAATGGAGCCGGGCGTGGTGGCGCACGCCTTAAATCCAGCACTCGGGAGGCAGAGGCAGGCGGATTTCTGAGTTGAG
GCCAGCCTGGTCTACAGAGTGAGTTCCAGGACAGCCAGGGCTACACAGAGAAAACCCTGTCTCAAAAAAAAAACAAAAA
ACAAAAACAAAAACAAAAAAGAAAGAAAGTTGAATGGTTCCAGACTTTGTGAGGATAAGGAGTAAGAGGAAGAAG
ATCAAAGTGGAGTGGAGTGGGATGGAGCATGGAGTTTCTGTGATGGGCAGGGTCCATGCTGAGAATTTCTATAGCTGTC
ATCCAATCCTGACAGGGGCCAAATGGGTTAGAGCTTTTCCAACAATGGAAAAGAATGAGAAAAGTGGTTACGCCGCTAG
CTCAAGGTCGCACAGATAGTAACCAGAATAGAAAGATAGAATCACTTGAGAAGTGCCAAGTCATACAGCATTACAGGAAA
TTAATATTAATAATAATAATAATAATAAATGGCATGGTGCATCCATCTGTCTCTGACAACAGTCATAAAAATAGAATAG
ATTCAATTTCTATACCTACTGAAGGGTACACAGGCTGTGTATCCTTGGAACTCAGTTTCTCATATGTCAAACATTTTAC
ATACATTGTAAAGATTAATGAAGGACTGAAGGCATACAATAACAGCAAGGAGCCTACTTCAATTTGTTGGCAGATCCTG
ACTTAGTAGATACTGACCCACAGGCTGGACCTACAACACTAGGTATCAAGTAGAATGAATGCCAAGGGGAGAGAAATAT
GGCCCTACCCTAAGGTGTAAATAATTGTTATTTACCTGATATAATTATCATCTCAAGGCTTACTGCCTCAGTCGGCTAAG

CTAGGCCTAGTCTGGAAGCTTCTAGCCTCTGTATAATCTTATCTATAATCTTATCTATGTTTTACGCCTCTAAGACTTACT
GATGAATAAACTACCCATTCTAGTCTTTCCCTCTCCGGCTAAATGATTCCGGCTCAGTCTTCTGGCTCAAACCTCTCT
CCAAGCTGACTGATGCAATCTGGCTTCTCTCAATTTCTGACTGAATTGCTCTGCTTAGCCTCATACTAACTTTGGCAATCT
GTTCTAATCTTCTGGCTCTTCTCATTCTCTGGTACGTTCTATCTTTACCTGTGTCTAGCTTGTCTCTCTGCAACAAAATG
TCCCATTAAGTTGCCTCTTTTGTCTGTGTGCTCTCTCATAAGTAGCTTCCCTTTTCTGTCTTCTCTCATGAGAGCTGG
GCATATCATATTTTGTCAAATCCTTCTCTGATTCACTACTTTGTCTACCCTCAATTAGACATCACTTCTAAACATGGGTGC
TTCTTCCTTCAAACCTAACTTTACCTTATTGTTTGGGATCAAAGGTGTGTGCTAAGGGTGTGTCTGTATTCCAGCCAGAGG
AAAGAAAGGTGTGTGTTAAAGTTGAGCCACGCCACAACCTAGAAACAGATTTTTTCAGTAAACAATACAGTATCAGGGTT
CAAGGGGCAGTGTGATCAAATATCCTGCAACCTAAGGCTCTCAAGCCAAGAAAATTGAACACAATGAGAAGCCATTGT
GGGGATGAATAAACTGTTTTCTGTTTGTGAGGAAGACACAGGCATCCTGAAAAGAGTATTTTGGCCATGTAGAGATT
TGTCATTGTGAAGGCAAGGGAAGGAGCCCCAGGCACAGGAACAGCTTATGTGGTATTCATGGAAGCAAAAAGCTTCA
GAGAGCTGGAGGTCAGAAAAGAGTAGCTGTGGCTATAACTAGCAGGTAATTTGTATAGAAGAGTGATAAAAATCGAA
AAGTAAACTGGATTTAGATTGTGAACAGCATTGCTCAGAAGTGTGACCTAGCTTTTTAAAAGAAAGGGTCTTTTAAAGTAA
GGAAGTTTCATAGCCAAGAGACGGAGATGTCATAGTCCACACCAGGTGAGACAAGAAGTCCAAAACCTGGCCACTAATGA
ACCAGAAGTGGTTGATGAGTAAAGAAAGGCAAGGGAAGTGACATAAACCAAGCTCACACAGGAGTCACTGCATGAAA
ATGACCCGCACACGTCTGCCTGACCACCGCCATCCAGGGGGCCAAAAACAAGAGGACACTTCTTTTTAAAAA
TAACCTCTTTTGTATTGTATGTGCAAAATAGGCCAGACACAGTGAAGCCACTTAGAAGCAGTATTTATCTCCAGGACA
AGACACACAAAGGTCACGGTTGGTTTTAGAAATGTCTTCAAATCTCAGCTTTTCCATTACAAGAGCACCACCGGTGT
AAGGCTTGTCTGATTGTTTTCAGTCTAAAGAGAGCTTAAAGGGAAGCCCTTTCAGAAGTGAAGGCTCAGGATGAGTGA
CTGTGGATTCATCAAGATCTCTCTAAGTAGCATATCCAATGGAATCTTCTAAGAAGATAGAAGAGTGTGAAGGGAGT
AGAAAGGAGCTGCAAAAGTTTTTCATGAATTAATACTAACTAACTAACTAACTAACTAACTAACTAACTAACTAACTAACT
GGTCTGCACCACTAACTTGAAGTAAATCCAGGTGTGTGAATGCACATACAAAGGGTTCACCAATGTCCCGCTCATTG
CTTCTGGCTTAAAGATGTATGCAGAAGTGAAGCTTTAGGATCTTCAGAGGTCCTTCTCCACCCCTGTGGTGAAATAGA
AGCTTAAAAAATAGCTTAAAAAATTTAGTCATTTATATAGTCTGTGTTCTATGTGCCCCGACCTATTTTATTTTACTTTA
CCATTCACATCTTATTTAGACCCCTGCCAGATATTTTTGCATAAGGTAATTTCAAATACTGGCTTCTCAAATTTGAA
ATATACTGTATTTCAAATAATGTGTTACTTTTTGTATGCATGTTCTGCCCTCTCTGTAAAGAAAAACATGGACCGATG
TCTTCCAGCAACTTTGACATTTAGAATATTACCTCATTCTGCGTTTTCTAAAAGAGGGTCTGAGGGAAATGGCAATTTCTC
AGAATGGATAAGCCAAGAGGGCACTCGGTATGCAGAGCCTGAGTTTTCTTAGTCCCAGGCATGTTCAATCACCTGGT
CAGACACCTGACCTTGTGGATGGGGACAGGTTTCTGCTTCAGCTCCAGGTCCCAAGAGGGCAGGGACTATTCTTCTCC
AGCTCTCTTGGGCCAAAGCCAGATATCTCAAATGGTGAATGACATCTTTGATGTGATGATTGTTGGAAAGACAGAAA
ACATTTAGGAATACAAAGGAATAAAGAGAAATCAGGCCTGTGTGTCCTCTGTGTGCTCTAGAGTCTGCAGTTAAACC
AAGGCTCTGAGTAGCTCCTTCCACGACATGTCTGGATGCCAGTAAGGCAGGCAAGATAGGAAAAGTCCCTTGAATGTCT
TCTTAGAATACCTGGTTGGTCTCCAGTGTCCCTGGGGTACTGGTGTATCTCCCATTACTCCCACATGGTCTTCTCAA
CCTTATCCTTGCTTCCCTGACCTATGGTCTGTCTTGTTCCTATGAACCAGTGGGGTCTTACACACGCTTCCAGGAGCC
CCCATTCTATTCTGCTGTGCTTCCACAGGCTGCAATCTCCCTCCCTCAGACCCTGGATGTTGGGATCTCAGGCCTCATCT
GCTGCAGCTATAGTCACTAGCCGAGGTCCACCAGGCCAACCTTCTCATATTCTCTGCTGCCTATAGCATTAAATGTAACCT
ACATCTCTGCAGACGCTCCAGCTCAGCCGACCCTGCCTGGAGTATACACACCCCCACAGCAATTTTATCTACTCAACC
ATGAGCTCCAGTTTTAATAAGTCCCTCAGTAAAGTGAACGATGTCTTCAAGTACCTAATTGTAGGCTGCTGTAAA
GTTTATAGGTTTTGAAGCTATCTGTGTGGGAAGAAAACAGAGTCTTTGCACTCAATTGAAAACCTCCCTGCAAAATACC
TAGGTGGCTTGCTTTTCTGATTTCTCCCTTGAGAATCCAGGTGAAGTATGTCCCTGGGTCTGGGTGGTAGGTATTAGG
TTCAGAACTGTTAGAATGCATCTGACAGACAATAGACATTGGTTTCTAGACCGAATGATTAATGAGTGTAAATTTGCA
TCACAAGAAAGTGAATAAAGGACAGCTAAGGAAACAGAGAAGCCAGCATGGGGCTAGTGGGGCAGATCGGGAGGTGGT
GGGGTGGGGAGTGAGAAAATCTGTTTGGAGCTTATGAAAAAGAGGGTCCCTTCTATGTGCTGACTTACTTGTACAACA
AAAATAAAGGCTGAAAAAATACCGGAAAGAAAAACGGAAACCTCAAATGCTTTTAACTATATAAGATGTGCTCATG
GGATAGACAAAGAAAGCATCTCTCTCAAAGAGAAATCTACCACATTTCTAATAGTGTACTCTAGAGAGAGAAAAGAAA
GAGAGAGAGAGATGGAGAGGGAGAGGGGAGGGAGAAAGAGAGGGAGGGGGCAGGGAGAGAGCGAGGGAGAGGGAGA
AAGATAGATACTTGAACCTTTACTTTTCTTAAATGTATCTGACCCACAGAAAATGGTGGGTTTTTTTTTCTTCACTTAC
TTAAGGAATTGACATAGGTTTATGGTCTGCACCAGAAAATGCAATAAATTATCGAGAGCAGCTATAAATAACAACATTGG
AGATTTTTCTCAGAGAGGCTGTATGCATGGCATTTTGATGCCCTGAGTGGACCATGGGAAAGTGAGCCTTCCAATGCTAA
TTCACTTTCCACCACTGAGGAGCTAAAATGTACATTATTGATTTAGTCGCTTTGCCAGGAATCAGTATGTGTGGTTAG
TGTGTGTGTCTTTAAATTAATAGCTTTTATTTTAAACAGTTTATGATTTCTTTTTTCTTAAATGAGCAGATAGTACA
GAGAATCCCACCTCGCTGTATCTACCAAGCACCAGCTTCTCTACTATTACCATCTTCAAGTGGGTAGTATAGTTGTTAG

GACCAATCAACAGGTGTTAAGACATTAGTATTGACCAAGCTCATGATTTAGAAGACTAAGTTCTTTCTTATGCGTTACAT
GGGTTTATCAAATGTGTACTGCCATGACCGCCATTACCTATCATAACATGATGGTATGCACCATCTGTTTATCCCCACC
TTTGATCTTACGGTCTCCATGTGTTTTCTTTTCATGATATCATGCTATTGGAAGTGTATAGTATGTAGGCTGTTAGATT
GGCTTCTACTCAAGTTGCAAACATTTAAGTTTTCTCCATGATTTTCATATCCTGGTGGCTTCTTTCCTTTTATCATTAAATC
ATTACATCATTGCATGGATGTATAAGTTGTCCGTGCACTTATTGAAGAGTATCTTTTTTTTTCCATGTTGACAACCTGAAT
GTCTTCTTTGAAGAAGTCTACTTAAGCATTTTTTTTAAATTTAAGACTTATTTTTATTTTTAATTATATGCATGTAACCTGT
GTGTGCACTCATGTACATGTGAGTGCAGACACCAACAGAGGACAGAGTCTCCTGAAGCTGGAGCTATGGACAGTTGTGA
ACTGCCTGACACCAGTGTGAAATCAGACTTGGGTGCTTTTGTGCCAGCTTTAAGCAATTATAAACAATTTGGCATT
ACTATTTGTGAGTAGGTGTTTGTGTGGGTGTTTTCTCCACTGAATCAATGCTTTCTGAAGTGTGGTTGCCATTACATC
ATTGGAAATATTGCGGTTTTAAGAAGTTGTAATGGTCTCCCTGGCATTCTATCATTGTTTTCCAAAGTAAATGAG
TGGATGCTGCTGTTTCCATATGGTATCAGCATTGATAGTCTCTGGTATTAATCTTGCATCATTGACTGGCAGCTC
TGTGGTGGCATGGCACTGGTCTTCTTGCACAAATATTTGTTCCCTGTACCCTTCTTCAGCCAGGTACATAATCAGATCT
TTTGCCAGTTTACCCTGGGATATTTGTTTCTTGTGCTATTATTTTTAAAATATTTTAAATTTTATTTCATGTGCATAAG
TGCTCTATTAGCATGTATGCCTGCACAACACATCCCAGATGGTGTGAGCCACCAGATGGGAATCGAACTCAAGACCTCT
GGAAGAGCAAACAGTGTCTTAACCACTGCACCATCTCTCAACCCATTGTCATTGTATCTTAAGCATTCTTTGCATATTT
TAGATCAGAGCCTTTCATCATATTAGGTCTTTTGCAACTATTTCTCCAGTCTGTGGTTTATATTTTTCCCTTTAGTA
GCGTGTGTGTATGCCTTAAGGAGGAAGGCTTCTGCATGTACAGTTTACAGTAAACAATAAAAAGGAAAATTCAGTGTGAAT
GTTTTGTGTGTTGCCAGAGTATAGGAGGGAAGTGTGGACTCATCAGAGGTTCAATAAAGGGCCGAGTTATGTCTTAG
GGATGGTGACAGCTATCCTGACTTATTAGAATCGTGTGTCAGAGTTGAGAGCTAGAAAGATGCTCACCTCTAGACTGCA
CTAATCTTAATTAGGAGAAATGGCTGCTCCTCCAGAGGACCAAGATTGATGATTTCCAGCACCTTAGTGGCTCACAAAC
CATCTTTTAAAACTCCAGTCCCAGGGGATTCTACACTGTCTTCTGGCTTCTGCAGGCACCTGAACACATGGTTCTCAGATAC
ACATTCATGGAAAACACTCAACATACATAGAAAAATAAATAAATAATTCATTTTTAAAAAAGAACAGTTACAGGAATCT
GTTCAAAAACACATTTTCATTGACCTTGCATGGGTGAATGTGTCTAAACTCTGTTTAGGAACATATACGTACACATGAAAC
CTTACTTCCCTTATGCAGTGTGTGAGTGTGCGTATGTGTGTATGTGGGGTAGGTTTGTGAGTGTGTGTGCAGGGGTGT
AAGGGTGTACTGGGGTACTGGGATTGAACCAATGTTTTGCAGATTCTGGGCAAATATTCATCAGCACGCTACACTCT
CAACTTTATTTTCACTTTTTGCTTTGAGATGGTCTCAATGTGTACCCATGATGGTCTCGAACTCCTTCTGTAGTCCAGGCA
GGCCTTGAACCTGCTATCTTCTGCCTCAAAGTATAGGAAGCCAGTTCCTATGTTTCTTTAACTCAGTGAATCCTACT
ACTGAAACCAGCATTCTGCCCTGTCTTAGTTAGGGTTTTACTGCTGTGAACAGGCACCATGACCAAGGCAACTTTACAAA
GACAACATTTAATTGGGGCTAACTTAAAGGTTACAGATTACAGTCCATTATCATCAAGTCAGGAGCATGGTAGCATCCAG
GCAGGCATAGTGCAGGAGGAGTTGAGAGTTTACATTTTTGTTCTGAAGGCAAACAGGAGAAGACTGACTTCCAGGCAGG
TAGGACAAGGGTATCCAAGCCAGATCCATAGCGACACACCTATTCCAACAAAGCTGTACCTTTAATAGTGCCACTCCC
TGGGCTAAGGATATATAGACCATCACATGCCCTGGGGCAGCAGATTCCATTCTGCTGGTATACAAGAGATTCTTCCC
ATGCTTCAAGATCCAAGAGGTTTATCTGGTGTCTGATAAAAGATCTTGCATTTGTGCTGGTGTATGGGGATAAGAGAA
CCTGCGCTACTTCAGGAATATCTGTTGAGACTGCAATCTGAGCTGAAGCTAGTGCCTCTTAGGTGTGAGTCATCCAGCC
CTTAGGAAATCACTACCATGGGAACATGAAGGGAAGGGTGTGGGTGTCCAAGTCCCTTCAACCCACACGTCTCCTTT
GTCTTCTTTCTTCTTGCAGTTCAAAGGGAAGAAATATTCTAGGGTTGCAGGGCACCTACAAGGATCACCTATACCACG
GGTATTCAATTTCTATGTCCCCTTGCCCGAGCACACATCTCTGTATCAAGAATACTCAGAATGCAAAACACAAACAC
CACAAAAATAATGCCATTATAAATATTTCTGGGAACCTCTTGTCTGTATTGAAACCATTCTACATCATCAAGAATCC
TTTTAGACTATCTCCGACACAGGCGACAGAGGGCCACTTAGCAAACAAGTGGCTATAGTTGAAAAATGGAGCTAGACA
CCTGTTTGGGTGTTCTAAATGTCTTTGGGTTTCTGGTCTGTCACTCAGGATATAAGTCTCAAGTAGTACTCCCAGCGGC
CATCTCTTGGGCAATGATTGGGTGTGGCTCAGGAAGGCACACTCCTTGCAGTGGCCAAATGCCATCTCTGCTTCTCTCC
CTCCCTGTTTTTATTGTAGCTTTGGGCTGAGCTGAGAACATCTGGGAGTGAAGTGGGCAGAGAGCAGCTTCCCAGGTTG
CAGAAACTTCTTCTCGACAAGCACAAGGAACCTATCATTCCACTCTGCCAGCACCATCTCTCTGGCACCTGTTTCCCCT
TCACCTCTGATGGCACGGATGAGAGTCAGAGAGGACTTTAATTGACTGAGAGCTAGCCCTAAAACACTGACACAGAGAC
AAGAGTTGGGGGTGGGGAGGTAGAGACTTAACCAATGTGTTAAAAGGAAATCACATTAAGCCAGCCTCCACCTCTTT
TTAAGACAACATGAGCGTTGACGCATCAGAGATGATGCTGATTCTATGTTTCTGAAATGGCCCTGCTGAAATGTATGTT
GCTCACTGTGGGAGAGGGTGTGGTTCGAAAGAGGCTGTGATTAGGGTCTTAAAGACCATAACTAGTGGGGAGTGATT
GGGTCAAATTTCTGGTAACTGGCTGAGAGGCAGATCTACGGAGGGATTTTGTATCTGCTTTCAGCAATCTAAAATAGTGC
AGGGATATATTTCTGGTATTCTAGGAAGCAGGACAAGGATGAGTATCTAAATGGCACTTATGGGTCCATCCAGAGCCGA
GGAGTGGTGGACTTAGGAGTGTCTCAAAAATGTCTTTTCATCTAGTTCTTTAACAGGTGTGTATTTTCTAGTATGACA
AGTGTAGTATGGCAAGGCCCTGGGTTCAATCCCAGGGTGGGGTGGGGTGGGGAAGGAACTCGATAGCAGCATATT
AAATGTAACCTACCTTGTATTTAATATCCATATTTAAAGATTTATTCATGTGTGTATGTGTGTATGTGTGTGCATCTGTG

AAAAGGGAGTGAAAACACTCCTTTGCTATTTGTGAATCCGCTAATATTCTCATGTGTGGGCATACTCTGTTCCCGAACG
AGTGCAGAAAACAACAGCTAAAGAACAGAAAACAAAACGCAGGCAAGAAAAGAGCCAAAGGGGATTTGCTCCAAGGG
GATATGAGAGTCTCAGAGATGACTAGGGTATGGTAGGAGACACGGCTGGGGGTGGGGCGGGGCGAGAGGAAGCAGAGC
TCAGACTGAGTGACGATTGGCCATAGCCAATGGACTCCATCTCCAGTGCCCGCCAGAAAACCAGGAAGCATTGAGTCTCA
GTGAGCATCCTGTGACTCGGCTCCTTCCAAACGCCCCACAGTTCCTCCTCTGGTTTCCTTCCCTCCTCTTTCTGGTCCCTG
AGCCTTTGACTATTAGCCTCATGGGTCTCCAGTCATCCTGATAGTGTACTCACTCTTGCCTGGCCACGGATGGGCTATTA
TCTTAAGCTTTCTGCATTGGTTTTTTTTTTGGTGTGTTTGTCTTTCCCTTTCCGAGACATTAATTCCAAACTTCCAATTT
ATTGAACCAGATGCAAATTTCTTATCTGACTTTCCAGCCTTGATAAGCTCTCTTGCACTATTTACAGAAATGAATTTCCCA
TTACTTGTCTAGTCTAGACTTTTCCAAAGTTCACTGAGATAAAACAAACAAACAAACAAACAAATAAAAACTTGCTA
TGAAGGATTTGGTTATCCCTTCAATTTCCAAAGTCTCCTTAAAGGCTATTCTGTGGGCTGAAAGGATTAATTTGGGGCTAAG
GGAATAGGAGCACTGTCTGCTTCTAGAAGACCTTAGTCTGTCCCAGCACCAACTGTAGCTAAACACTGCCTGTGA
ACTACAGTTTTGGGGAATCTGACACCCTTCTGGCTTTGAGAGTACTGCATACATGTGTTGCACAGACTTACATGCAGG
TAAAGCACCCAAATAGAAAACAATAAATATTTCAAATGTATTCTAAAGTGATTCTATTTGTTGTATCTCAGAACTATGA
AAGTCATAGAACATTAAGCATAAATGTTCTAAGATGAAGAAATGACGAAGATTTGAAGTGATAGTTGTAAGACTTCTC
AGGATCTGATCATCACTTCTGTATAAGTGTTTTACAGTACTACATTGTATTTATAATGTACATATTATAAAACATATGCA
ACCATTATATATCAATTAACAACAAGAGATTGGGCTGGAGGTGTTGTTCAATGTTAGCTTGTGTACAAGCCCTAGGCTC
CATTCCTGGCACTGCAGAACGAACAATTTGAGTAAAAAAAAAAAAATTTCTCAAAGAATATTATAACCAAAAAAAAAAAAACT
TTGATCATTGAACTCAGGATTACGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTATGAAGACTGTAATTTGAACATTTAG
TCGTGTGAAGTCATCGGCATTTAAAAGTGACTTGCTGACGGAGCCTTTTGATTTATGTTAGGCAGATGTGTAGGGTGTG
ATAGAGTGAGGACCAGTCATAGACTGTCTTGGAGGAAAGAGTTACTGGAAGCTTGAAAAGCCTTTCACAGTCAAAGCA
GGTGCCAGCCATATCAAGTTGAAAATTAACGGTTGTTGATGGTAAAGGAAGAGATCGACTCTCAGAGGAGAATTTCTGA
ACAGTGCAGGTGGCTCAGCCTAAAACCTCATGGGCAAAAGTCTCAGAATGAGTGGCCAGAGCCAACACTACGTAGGGAG
GGTTTCATCTGCCAGACAGAACTGTCTCCAGCAGCCACTCAGTTGTCTGGCTCTGAAAACCAGCCACTGTCTGGCCCA
GTTCTAAAACCTGCCATTTGCTTTATTGGGGAGCGGGGTAGGATGACTGTAGGTAGGAGTGCTTGCTTGGCCCTTGACTC
GTGGAAGATCACTGGTAGTCAGCTCATGGTCTCTGTAGTTGGGAACATCCTCAGAAGACAAGAAGACACCATACTGCC
AGTTGTGTTAAACTAAAAAAAAAAAAACAAAAACAAAAACAAAAACAAAAAGAGGGCTCGGGTGGGACAGAGGGGAGA
CGGGATGCCAGGGACCATCTTTACCTTTGCCTTTTCCAGGACTGTGATGAGACGCTTGGTTGTGGGATTTAAAGTTAT
AGCGCTCAACCACACAGCAATTAAGAATCTCCTCCTTAAAAGGTCTATTCCATATCATCAGCCTAGGTTTTACTTGAGCT
GTTCACTGGTGGGTGCATATAGGTCAGAAGTCCAGACTCTGGTTGTGGCTGTTACAAGTTCTTTCCCTGGAGCTGAAA
TCTGGCTCCCTGTGACTTCTAGCGGAGCTGTGTGCTTACAGCAGCAGCGTCCCCCTCTCTTCTGGGGGAGCTCTCACT
CTCTGCCCTTGGCTCTCAGATCTGCAGCCCTCTCTCTTTCAGGTTTGTTTACCTGGGTCTTTTCAGTGTTCCTCATTT
ATTTCCCATCATCTCTAGTGAACCGTCTGCCTTTCACCTTGATAAGTCCACTTCTGTCACTGTCACTCAAGTCCAACCC
TCACCTTGCTGTACAAGAGGTCACAGTGATGGTCTGATCATCACAGATGACGGCGGGACAGATGCTAGTTAAGACAG
AATTAATGTGGCTTGGGGTGTGGCTCAGTGGTGGGATACTTGACTAGTGTGCCTCAGGCCCTGAGTGTATCTCCATCGTC
CTCTGCCTCAAAGAGAAGGACCAATTAATGTTGATGGCTATTATGTCACACTAATACGGCATAGTTTGTATGCATAA
GGTATTTCTCTAGTTCTGTACTCCACTTACACAGTCTTATCTTAAAACCCAAGCTAACCCCTTACAGGGCTGGTCTGATT
CCTATCTCTCCTTAGGTTTCAATGAATATTTGCTTGACTAGCTTTAGGTTAATTATTAAGTCAATTTGCATATTTGAAATGAAT
GGTGTTTTCTATTGCTTTCATTTACAGTTTTAATAATGTGTGAAAATAAAACAACAACAATAAAAAAATGGAGAG
TCCCATAGTACCCAGAGCTCTTGTAGGTTTTGGTCAACTTGACACGAACCTGGGTCATCTGAGTGAGAACTGGGTCCCTT
AAATTGGCCTGTATGCAAGTGTGTGGGAGCACTTCTAGACTAGTATTGATGTGGGAGGGTCCATCCAATTTGGGGAGG
TGGTGTGGGGAGTAAGAAATGAGAGCCTGAGGAGTAAGCCATGAAGCAGTGTCTCCCATGCCCTGCCTCAGTGTTC
CTTGCTCGGGTTCCTGTTTGTCTTACTTCCCTCTATGACAGCCTGTGATTGTGACATGTAAACCAACGAACCCTTCCC
TCCCTACATTTGCTTTTCTGTGCCTTTTATCACAGCAGTAAAAGACAAACTAGGACACCCAGACAGATATGCTAAGAAT
GATTCAACTGTCAATGAATGAATGAATAAATGAATGAATGAACTAACCCCTGGTCATGATTAATCCATCAGCATAGC
CCATTGGTTGTAGTCTTATCTTGTATTAATCCACTTCTACTTTTTTTTTTTTAAACCACCACAGATCAACTAGCCATCAC
TTTCACTCAAACACTCACTGTGAGACAGGCTTCTCGAATCTTCTGGCTTCTCTGATACTCAAATGTTATAACAAAAACAA
ATCTTTTTGATGTAGAATTTGATTATGCACTCTGCTATTATTACTTTAGTCATAATAAAGAACAAAATCTTTAACTAAC
CCACAAGGCAAGTGTGTTCTGGCCATGCTGAGCTTCTTGCCTTGTCTCTCACTCACCTGCATGTCAACCACAGATACTC
TCAAATCTTCCCCCTGCCAGTGCCTTTGATGTGATAATTACTTTGGCTCAGAACCTTTCTACCTTGTACCCCTCCCAGC
CCTTCGCCTGGTTAGTGCCTCTGGCTCTGTTTCTTTAGATGTACATTACAAACGTTCTCAGAGGCAAGGCTGGACCATT
CACTCATACAGTTCTGGGTTTCAAGATTTGGCCTCAGGGGATTCTCCATTTCTGTGGTAAACAAGGGCCTGATTTGACT
GCCATGAGTGGATGGCATTGTCTGGTAGCTTAGCAGATGCTGGTAGCTTAGCAGGCTACGCTGAGCTAGGACTTTTGC

CTAAACTTACACATGGGAGCTCTGGCACTGTGATGGCAGGACAGAGGAATATCTTACACGGTGGGCTCAATCCTTAGAA
AAATACATTTTTAGAAGGTCATGTAGGGTGGGAAGGCTTTTTGTGTCTCAGAAGTTTCAGAACATTTTTAATGCTTCATCC
TAAGTTAGTTAAGGGCAACCTTGGAGTCAGGAGAAGTGATTAGACTCCACCTCTTTGTGGGAGGGTATCAGGACACAG
GTGGCAATACTGAAGCTGCCACTTTATCCTTCAAATAGCACTTTAGACGAGTCACATGAAAACTTTCTTCAGCACCACGC
AGACCTCTTGGTAGCACTCTTCATTGTAATAATTTATATTTGTTTTATGTTAATTGACAGTTATTTGCTCCTTGGCCAAA
CTAAGCAGCTGTACTAAGCAAAGCCATCTCTGACTTTGCTCATCTCTGTCCCCAGCACTGAGCAGAGTGTCTGGCTCAA
TGAATGTCTGTTGAAGCGTGAATGAACACAGCACCACCCGAACCTTGACGGCAGTGATTGCGCACTGTTCTCAAGCGCGT
CATTGTGCCGAGCCTTGTAAACAGTCGAAAGCACAGGATCCCAAGCGATGCCTATCCTTCACAGTTCAGAACTTCAGA
TGAAAGGAAACAGCCCCACCCTTTCTCTCAGCGTCTCAACGATAAACTAGCTGCTGTTAGCATGCGCCTTTAGCTTTT
GGGACTCTGTGAAGAACCCAGTACTTTATGGCGCAGTAGAGGGCAACAGAGGCTCCAGCAAGGAGTGTCTTGGGATC
TATGTCCCTCTGCCAGCAGATGGATCCACCACAGTAGGCTTGTGAGCCGTAAGTATGTACAGACATAGAGGAGCGACC
AGGCCCTAGTGCCTTGCAGCACCATTGGGCTCTCCTCTAGTGCCATGCCATCTGCTGATTGCTCCTAGCAAGAAC
ACCGTACACCTCGGGAGGAGCTAAGTGTGCGGCTCTCCACGGTGTTCACAGCTTGACTTATCCTGGACACCCTGCCTT
TCTTTTTAGTGCTATTTGAAGGATCCAGGCTATGTATCTTTACATCTCCCTAGACCTTAGAAGAAGTTAATGCTGAAA
ATACTCAGTAAATATTTGCTTTAAGACAGTGAATGAGCAACCTAGCTGAGACAATGCTCCTCTTAGTAGCATTTCCTAC
TACCTGGTTACCGTAAGTTCAGGGCAAAGTCTTTCCATTGATGGCCTCTGATTGCTCCAGGGAACCATTCCTCCACT
TTCTCTTCAGAACAGCGTGGTCTTTGTGCCACCTCATCTCCCCTCTTCTGCTCAGCTAGATCCAGTGCTACGTAAA
GCCTGTTGCTGTGAGGTGTGGAACAGGGTAGTGTCTACCTGGCACATAGTAGGTGCTCAAGCAGCATCTGTGGAATGA
TTTGCTACTAGAACAAAACCTCCCATGATGCAAATGGAGGCTTTGACCCCATCTACCCACCTCAGGGTCTCCCAAGG
GTCTGTAAATGATTTTTAGGGTATGTTCTGGTAGTGCCTGTCTCCTTATCCTGCCAGTGGGAGATTGGAATCTCTTTG
CTTGCTGCCATGCACTACTGAATCTGGTTGGCATTGTGTTAAAGAAAAATCAGTAAAGTTGGATCAGTTTGAATCTCAG
TTCTGCTATTACAGTTTCATGGCCTGAAACATATCTTACCCTTTGAAACTGGTCTTCATCTGTATTATGGGGTTAAAC
ATCTCACCCAGACATCAGAAACCAGGGTGTGGTCAATCCACCACCACTCTTACTTGTGTAAGAGTGTATATAAAGTC
AGCGAAGATGGTATTACCGGCACCTTGTCTTAGACTGTAACCTCTCCCCCATCCCCCTCCCCCTCCTCCTCCTCTTC
GTTTTGGATGCTGAAGACAAACATCTTTATTAAGATACTACCAAAATTTGGCAAACAACCTCTTCTGTGTGAACAGTC
TTCCTTTTTAGGCTTTTCGCTAGCTCACCCACCCTCAGACCCGATTCTGCTTCTAGTGACAGAAAATCTGTCAGAGAATCC
CCCCATAAATCTTAGGTTCTTCTCCTCCTCCATTGCGTCTGCTGAACACCCGCTCTGATAGTAAGAATTTCCATTTCTGGG
CCATCTGGTAAAAGCCTTGTGGTGTGGAGTTGGGGGACGGTTCATTCTGGGGAAGTGACAGCTCTGTTCTGAGCC
AACAAGAGTGGAGAAGCTAGCTTCTCACACACACACACACACACACACACACACACACACACAATTTCTAAA
GGAAGGTTGTGTCCTGTTTTAGGAACGGGCAATGGAGTGTCTGCCAGGCTGGTATGCAGTCTCCTGTGAGCATTCGTG
ATGCTCCTCTAGGGAACCTGGACTGTCTGGCAAGGCCAAAGTGTGAGGTGTAGAACTTTGCCATCCTCAAGCTCTAAAT
GGCTTTTGTGAAGCCTGGCTTACTGTGGGTAGTTTCAGGGATCATGCATTTGAGACAAAACCTGAGCTATAGAGCAAGAC
CCTCTCTCAAATCCTTACCCTGCAAACAA
ACAAAAACAAAACAAAACAAAAGCAAATACTCACAAAGCTGGTATCAGTCAACTCAGAAAGTAGTGAAGGAGGCT
GATGTTTCTAATCAGGAAAAGACAAGTTTCCAAAAGAGAAAGTTGCAACAGTATGGACTTCTGGGCAGGGCCAGAGT
TTGCCCCACCCAGTGAGTTTCAGGGACTATTTGTTGAGATTTTGAAGGCTATTATGCAGGGGCTCTCAACCTTCCTAAT
GCTGAGACCCCTAATACAAGCTGTGGTGACCCCAACCATAAATGTTTTATTGCTGTTTCATAACTGTAATGTTGGC
ACTGCAATGAATCGTAAGTAAACATCTGATATTTCTGATGCTCTCAGCAGCCCTGTGAAAGGGTATTAGTCCACAAA
GGGGTCAACCCACAGATTGAGAAGCTGCCGTAATGGTTCCATGTGATTACCTGAGTTAAACTAATCAATTAAGTTTA
TAGCATAGGGTCAATTTGATTGGAGACCTCGTGTGTTGACATGTCAGGTGGGAAAAGTTCTCTGATTAGATCCAGTGT
GTTGACTTTTCAGGTATTATACAGACTCCTATATTTAGGGAGGAATTCAGACCTAACAAGGCCCCAGCCTCAGATCCAT
GATAAATAGGATACTGTGAGTGACTTACTGTGACAAAATAGGCAAGGGTCCCAGGCTCTGCCACGTGCCATGTCTGCT
ATAGCTCAACTGACAATGCTAAACCCTAACATCCATTACAGTACTGGGAGAGAGGGAGAAAGCTACTGGGAGCTAGAC
ATTTGGTTCTCACACAAAACATCTAATATTTGGCAGCTGAACCTTACTTGTAAACATTATCACAAAAGCTAAATTTCTATA
TGGGAAAAAAAAAAGAGCTTCTACAGTTTAAACAAGAGAAAGTCAGACTCAAGACAGGATGCGGGGAGGTGGGGCGGA
GAGGGCTGTGTGACGAATACGTGGCGTAAAGAATACAAACGTATTAATCATGTGGCAGGATACTCAGATTATAAGAGAA
ATTTGTTTTGAAATAACAGTGGAAACCACCTACCAGATGTGGCTTAGACTTTGAAAAGCAAATCAGAAAAAAAAAAAAAT
GTCGCCCAGGATATGGAGAAATCCGTTATTGGTTGCCTTTGATGGGAATGTGAAGTTCTGGTGGACAGTGGTTCCCTCAGA
GGGTTTAAATAGAACTCCATATGACCTACTTCCACTTCTGGTTGTATCTAAAAGAAGTGAAGCAGAAAACCTGG
GGAGAAATTCGTACACCTCATGTTACAGCAGCAGTCTTACGGCACTAAAAGATGTACATAAATCAAGCAGCCCTCTG
CAGATGGGCACAGACGCTGAACCCGGTGTGAGCATCTCAGAAGAGCAGGGATCCCAGCAGGCTCACAATGAGGATGG
CCCCCTAAGGCAGCGCTAAGTGAAGCAAACCCACCACAGAAAGCTAAATACTGTAAGATTCCACTTCCATCTAAAGAAC

TCAGGTCCATGGAGACAGAAGGTGGTTTCTGAGACCGGGTGGGGAGTGGGGGGCAGGAAGGAAAAATGAGGAACGAT
CGCTGTTGACTGAGTCCAGATTTCCATCTTGCAATGTGAGAAGACTTGGGGATACTGTGATGTTGATGGTTGCACAATG
CAAATCTTTCATGTGCTGCTGCATGTTGGAAATGATCAGTCTAGTAAACATTGTATGATTTTACCATATTTAAAAAAC
TACGATGAGAGGGTTGAGGAATTCAGTCAGTGGGGCACTTGCTGGCTAGCGCAAGGCCCTGGGCTCAATTTCAAGCAC
TGTCAAAAATGTATAATGAAGCGTCATTTTAAATCTTTAAATGGTACAGATCAAAAATTCACAAATTTGAAAACATTCCCC
CCCCAAAACATGTGAAAGTAAGTAGTCTCCTGTCGGTGGAAAGTTTTAACGTATAATTGTGGAGGAAAATCTTCTGTATC
TGTGAAAACATAAATCCATTACTCGTCAGCTCTTGGTCAAGAGATTCTCCTTCTGAGAAGTGGCCAGCTCCTGCAGGTAT
GAGGCAGAATATAATTTGGGTTTTCTTTACAACAGAAAATTAGGAGCAACTAATCAGGCTATTTGCATCAAGTAGATTA
CAGCAGAATAGTATGCAACTGCTAATATGATAGTGTAAATATTATGGATATAAAAATAATCCCTAAGCTGGTAGCATCTA
TGTAAGATGATGATTGAATGCTTCTATTTGTGTTTTAAATCAAACGCTAATACATGTGGATCTGAGTTATTACTTTGTT
GTATTTGTCTAAAATAAGTGAAGGCAAGAACTGAAAATAGGTAAGTGGTCAATCCAGGCACACTTTGGAAAGAAAGTTA
GATGGCCAGGGACCAGAGTCCATAGGGATCCTGGCTTTCAACTATTTGTCACTCTGATAGCTAATAATGGCTGCCAACTT
GAATCACAATCTAGAATCTGGGATGTTGTAAGTACTGGGTTATTTCAAGCCATCTTCAATGCAGCCTGCATCATTGCG
TGGGTTGGGGTCTCAGGCTGAATAAAAATGGGAAGGCAAGATGAGTACCAGCATCTTCTCTGCTTTCTGAACTGAGGGT
ACAATGAGGCTGGGTGCCTCCACCCCTGCCCCACCCCATGATGTCCCTGAAATTATGGGCTGCACCCAACTGTAAAG
CCAAAACAAGCCTTCCCTCCCTTCTTATGTTGTTTTATCAGATATTTGTTGCAACAACAGAAGAATTAAGTATACCTC
ACCATTACTTTAAACAATCAAACAATCAAACAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAAC
AAAGCTCACTAGCCTGGCCTAGGATTCAGTATAGATGAACATTTACTCTGCCTCCCAAGTGTGGGATTAATAATGC
ATCTGCTACCATGTCCAAGACTCAGCTTTACTTTAGCATTTTCATGTTATGTTTCAAGATATAATCTCTAAAAATTTCTTAATTA
AAAAAATTACCGTCTCGAAGGATTAAGCACACACACAAAATACACACACACACACACACACACACACACACACACACACA
CTGTTTTAGCCACTGCCCTGTGCCAAGCACTATAAGAAAAGAAGGAAGTATACAGACACGACCTGAAGGATGGAGAAT
GGCTGTAGACAGTCCACCCTCAAGGGAGAAATTTCTGCTATTGAATGAATAATACTTGTGTGCTTCCCAAAGCACCAC
TTTCTTTTATATACAAAGCTGAGTAGTAATCCACCTGCTAGGTTTCCCTTTTATATTAGCCATTAACCGCTGCAAGCC
AAATTTGAGTGCACCTAATACTAGGTGGTTCATTCTAGGGTAAGCAGTTAGCGTGGCCTTGTATTGGGATCTGTCCA
AACTTTGGTAAATCGATTTGTTTCCCCACCAGTCTAATGTTGGTCTTTATCCTGTGCTTCTAGTAAGCTCTAACATCTTTTG
GTCTATATCGAGCGGTTGAGTCGAGAAGCAGAGAGAAGCGAGAGGAAGAAGAACTAGACATTATAAAGTCTTGCCTG
ACGTTTTTTCTTTAGCATGCCTTACAGATGAAGTGAATGATGTGAGGATGATGACATAGGCTTCAATTTCACTTATGCCA
GATGCTCTGTGCACGAGGCCAGGAAAGTGTGGCAGCCTCTCCCGTGACTTTCCATGCACGCGAACTTTGAAAACC
ACGGGAAAATCAAAGGAAGTTCGATTTACTCAAGGGTCTCGGTATTCTCTCATATTTCCCTGCATTGGTTGAGACAAAAG
TAATGCCTTGTCTACCATAGAATGTCCCACAGCTTTGTCTAATCAAGTACTTCTGGCTAATGTCACAGTCTCGAT
CAGCATGGGAAGGGTGTGGAGGGGTGGAGAACGCTGTTTTATACTACTTCACTGCTGGAACTTAAAGTCTCTGCCTTTATG
AGACGTGGGCATCGTATTAGCCCTGCACTTTTCTGAGATTTCTGAGTCTGGGAAGGAAAAGGAGAGAGGAGTGGGG
AGGGAGAAGAGGGAAGGAGGAGGAAGGAGGTAGGGGAGAGAGGAAGGAAGAGGGAGGAGGAAGGAGACCCTGT
TACCATGTTTGAAGCAGCAGACATATTTCTGCCCCAGTATCATGGCCTGCCTCACTGCAAAGGAGGCTGGGAAATAT
GGCCTGTGTATGGAGCTAGGTGGGGAGAAATGACTTCAGTGAATGTGGGAACCTACACGAATTTTAAACTCTTTCTAG
TTCATGTTTCAGTGAACAATGTTTTAGTCTCACTTTCTAACTAAGTTTTATCTTGTCTTTTTAAACTCCAGCACCATGGG
CTTGGCAATCCTTATCTTTGTGACAGTCTTGTGATCTCAGGTAAGAACCCTTTTCTGTGTAAGTCTGGAGTCCCTTCTGC
TGTCAATCAGTGAGTCAGAGCACTGAAAGCCAGGCCTGAGAGTGTGGTATGGTTGCTCACGTTGACTTGAGTTGC
CGAAGACTCCATAGCAAATAGCTTTCTAGAGAGTACGGAAGGATCAGGACCATGGCCAGCTGTCTGGGCATCTTCTCC
TCTACAACCAACCCCCAGGACCTCAACACACAGCACAAGGTGGAGTGTCTGTCCAGGACTTTAGAGGGGTAAGAG
AGCCATGACAGTAAAGCCTTAACTTGACTCCA
CACATCTGGTCTTTTCACTCCCAATTTTCACTTCTCAAGCCCTTAGAAAATTGTGACAGCTTTCAAAGGCTTCTTCTTG
TAATACTGGCTCACCACCACATCTTCTTCTTACCTGTGCCCTAAGTCTAATGCTTCAAGGCTCCCCCTCACACAGGCTCCCC
AGTTAATCATGCCAGCCACTGTACCAAGCTAAAGTAACTAAGCTAATGCTTCAAGGCTCCCCCTCACACAGGCTCCCC
TTTCTAACCCCTAAGGACCCAGGAGGACCTCAGCACTATATCACATATCTTACAACCTGGTAAGATTTGGATAAGATAG
CCACAATTAATTACGATTGCCTCCCCCACCCTGACATCACTGTCTCTGCTGGGTGACATCTTGCAATTTGAATTATGT
GTTATTTTTCTAAAAAGCTCACTAAAGTTTGAAGTGTGAGGCCTCCCTGAATTCAGCCCTTCTGGCTCTCTGCTCTCTG
GGATGCACCCATAAACAGCTGGCTGGAGGCCTTGGCATGCATCCTGCAACTGAATGCCATTTTGTCTGCTGGCCACTC
TTTCTGTACTCACTTTCTTACCTCAGTGTGACAGAGAAGCCATCTCAGTCTTGGTATCAGCAGACAGGATAGGTGA
GCTTCCGGTGTGCTGACGAGCTGCAGGCCACCCCTGACCACCTGGCCTCTGACTAACCAGCTCAGCCACAAAATCACC
TCCTCTATAATTGTACACAACAGTCCCTTGGCCACTGCCCTTAGCCCTGGCAGGGTAAAAGAGGAGGAGTTGAGTATTAT
GAAGAGATATCCCTTTAGACCTCAGCAGATACAGTCTTTTGTGATTTGTGCTTTCTGCTTAGCACTCAAGGCTTGCAGAG

TGATATTCTGGTGAGGTCATAGACTCACAAAGTGGGACTCCAGGGTTTCTGTCTGCAGAGGTCCTTCAGTATTCTTG
ATCACTGGTTCCTGAGTGGGAGATATGTGGCTGAATTCCTGTGTCCTGGCTCCTGGCTGCATATAACAATCAGTCATA
GCTAAGTCTAAAGCATTCTTTAAACCCACATGTTAGAAGAGGGAGGATTTCTCAGTGTCTTCCACCAATGGAATTCTAGG
GAGTCACTTGTCTTGGAGCCCAAGTTCTGGGGACCATAACAGTGGAGGCCTGAAGGCACTGGGAAAAGAACAGACCTT
GAGTCAAATCTTCCCGATATGGTCACAGCTAAGATATGTCTGCTTGGTTCAGAGTACAATCAAGACAATCAGGGTCTGAT
GACAAACCAAGCATGTGGAATGTGAAATACTTTCAGTTCATTGCAATGGCTACAGAGTAGTTTCTCGCCCCGTGGGGA
GGAGAAGGGGACTGGAGAGGTAGAAGTGTATGTGGCTGGTTATCAGCTCTGATCCCCTCAGCTTCCCAAATAGAAGTTC
ATGGTAAAATGCAGGTTCTGATTCAGATCTTGTGTGGAACCAGAGAGTCTGTGTTTCTGACCAGCCCTCAGGTGAGGCCA
AAGGCTTTGGTCTACTTTTTATTGGTAGGTAAAGAGGGAACTGAGGGAAAGATGAAGTCCCTGTACTTTGTGGGAGAGGG
GGACTGGGTGACAGAAAGTTGGAGAGGGAGTGAATGGAAAGGAGATTGGGTACTCTGGGTCTCCACAGAAGAAAAAGAG
TCTGTGTGTGAGCGGATGTAAGAATCTCAGAGTGAATTCATTCTAGACCCAGGAAGTGAACATAAACTGGGCAATA
TAAGAACACACCAACCAATAGCTGGCCAGTGCTTGGCTCAGCTGCCTGCTTGGTTTCTCCATCAGAAATCATTGCCCCAG
AATCACAATAAGTTAGAGCCAAACCAGAATATGTCTGCCCTCCGCACAGTCCACCAGTCCACCAAACCTCGAACATT
TACAGTAGGTGGCACTCTTCCCTCCTCACTTAAGAGATTAGCAGAGGTGGAACAAAAAGCCAAATACAATAAATTTTTCTT
AGGTCAATTTTTGGTATTGTGGAACTCAGTGATCTCCCTCTCCCTCTGATGCAGACATGCATGTGTCCTTACGGATG
TCTGGAGTATCCTCTGAGACCCCTTGATTGTAGGTTCTCATGGGGTGTCTGCTTTGCCAAGTCCATGCCATCGTACCTGC
CTATACTATTTCTGTTTAAAGGGAGGCTAATTGGTCAGGTCAGTTAACTTCTGACTCACCACCCTGTGAGTGGGACTC
CTCATCTCCCTCACCATCACTGGCCCTCCCTTCCCTCCCTTCTGAAAGTCCCGAAGGACGAGCTGTTTTATGAAGACTC
TCCTCCATTCTTCTCCCCATTGCAGCCTCCAGCTTCATATGAGCCTTAAAAAGGCACACCCACCTCACCTTTCACCTTTCAC
CTTTCACCTCTCGCTCTCATCTCCCTCTATTTATTTCTTGGTCTGAGTCTCCAGCAATTCGTGGCTAGAAAAAGTCCCA
TAAGCTGGCTTATGCCAGTGGCTCTCTCTGAACCTTTCCATCATTGCTCCCTTTGGGTTCTAAAAGTTCCAGGGCACT
GCAGCCAGGAGTAGCCATTGGTTTCTCAGGGTTCTGCAGTATGACAAGGCTCATCCTCACCTTCCACATACAGTTCT
CTCCAGCAGCTTGTCTCATCTTCTTAAATATCCTGACCTTATCATCTCCCAAGAGCCATTACATTTGCCAGCTTCTTTT
CTGGTCCCTGAAAAGATTCTAGAGAGGTCAGTGAATAGAGACATTGCTTGCAGCTTGCAGTCACTTCAAACCCCTTTTT
CTCTGGCTCTGGGAGTGGAGGCTGTGGGGCAGGAACTAGTTGAATGTCAAAGAAGTGAAGTCACTAGAGGGTCCCAAATA
ATGGAGACTAATAAAAGGTGGTAGCAAGTGAAGAACATCCATCATCAACAATCTTTAAAAAAACAAAAACAAAAA
CAAAAAACCCAAAAAACCAAAACATAGCAGACCAAAGTATAAAGGGATTGCATGGGGCAGGCAGGGTTTAGGCAG
ATGGCATAAGCAGTTGTGGAGGCTGTAGCAATTATGATGATGGTAGTCAATGCTCTGGTTTTGAAATTCGAGAAAGACA
GAGAGAATCTAGAACATTACTACAGACCCTTCTTAATCTGGTGAGAAAACAGATTACAAAAGTTTGCAGCCTGCACA
TGTGAACCAAGTGGAGCAAAACGAAAGCCTGAGCTTCAGACGTCAGCATGGATGCCTGGTTCCAGATCTAGACCCA
CCTCTCCAGTACTATCACTGCCTGACAAGCTGGAAGCTGGGTGCTGTTTCAGAGCAAGGGATCTTCTCTTGTCTCCT
CTTCTCAATTTCTCAGTTTTTCTATTTTAGATGCTGTTTCCGTGGAGACGCAAGCTTATTTCAATGGGACTGCATATCTGCC
GTGCCCATTTACAAAGGCTCAAAACATAAGCCTGAGTGAGCTGGTAGTATTTTGGCAGGACCAGCAAAAGTTGGTTCTGT
ACGAGCACTATTTGGGCACAGAGAACTTGATAGTGTGAATGCCAAGTACCTGGGCCGACGAGCTTTGACAGGAACAA
CTGGACTCTACGACTTCACAATGTTTCAAGTCAAGGACATGGGCTCGTATGATTGTTTTATACAAAAAAGCCACCCACAG
GATCAATTATCCTCCAACAGACATTAACAGAACTGTCAGTGCATCGGTATGTGGTCAAGTGTGTTTGTAGATTGTGGCTG
CTCAGATGAGACCATGACTGAGCAAAAGAAACATTGAGGGTGGATATTTGAACAGACTGGAAATGAAGGCAGAAAGAGAG
TCATTCTAGAAAGTCCATTTGGAGGGAATGTGGGGTCTGAGAGTGGGGAGCTGAAAGCCCTTGTACTTTGACAGCTTG
TTTCTTGGAGATCAGTGAGAATTTTTGAGATAAGATAGGGCTAGGTGAACAAAGCAACACAGACAGATTATAACAATG
GACAAATGTAGCCACTCCTTCTATTTTCTCTTTTAGTCTAAGATTTTTTCCACCCGTAGTAATCTGGGTCTCTTGGTTTATC
TCTTAGGGTCTGTCATTCTGAGAATAGCGTATAAATGGAGCTGAACTTTAATCTTAAAGATGAACCTTTTTTATTTCAGCA
AAATGCCTTTTGTGTTTCATATAAGTTGAGTGTATCAAAAATTTGGAAGTTTTATTTTTTTAATTGATGAATTCATTATA
CTGTCAATCACTGAAAGATACTGGGTTGTTCCAGTTTGAAGCTGTGACAAACTGAGCTGCTATGCAAGTGCAGCCTCT
GTGTGGATGTATTTGTATTTCTTAGTGTAGATTCATTCTGAGGCATAATGTTGCTGGACTCGAATGAATTCTTACGAAC
TTGGAAAAGGCAGACTGACACCTTTTGGAAAATAATCCTCTAGAATGAACCATTCTAAATCCACAGGATAAACCACAG
GATAAAACAGGCAAAACCCAGACACAGCATGGAGGGTGTCTCTCTTGGAGCTGACTTGATTGAGTGTGGCTACAGGGC
TTCCATTTAAACAGGTGCTAAGTTTGGGTTCTCAGGGTGTGGCAGGCCCTTTGGAGAAAACAGTGTGTTTTAGGAGGGGG
CACAGACCAGCCTTTAAACAGGTTGTCTATTCTAATAATGTGTATCAGTACTACAACCTTAACTCATGACTGCAAAAGA
GATTGTTGATGAAGCTGAATGGACTCTAGCAATTCCTACCAACATCAGCAGAATGTTGAGGGAGCACAATGAGATTGCA
AAAACCTAAAAGAGGATGGCATGCAAAATGACTTCCATTGTTACATTGTTACATTGTTACATTGTTACATTGTTACATTGTT
TGCTTATGAGTTCCGCTTTAGTGGCTGAGCCATCTCCTCAGTTTCTGACTCAATTATCAACTAATATGTAGAATCCACAC
GTGTCAGGTCCAGGATCTTTGTGCCAGTGTACTTCAGCCCTAAAAACACACAGTGGTAAACAAAGAGGAGAGAGTTTTG

AATTTGCCATATGAATCATTTTTTTTCAGCAGAGTGGTCTGCAACCTTCCTAATGCTGTGACCCTTTAATATACTTCCTT
ATGTTGGTGGTACCCCAACCATAAATTATTTAGTTTCTACTTCATAATGGTAATTTTGTACTGTTATGAATCATAATGT
AAACATCTGATATGCAGAATATCTAATACATGAACACCCCCACCCCGCAAAGGGGTCACAACCCATGGGTTGAGAAT
TACCACTGTTACAGCACATAAAGTTAGACTATGATAGTCATGTCAAAAAACCAACAATCTAAGTTTGTAAAGCAGAAAAGACC
TCCCTTATTACTCTTACTTGTAGGTTCTTAAAGATGAGACCCAGAGCATGCAAGGACCATAAACCTGTGAGTTCCTGATG
GAAATTTACCTCATCCCTGAGTGGGAAGGTGAGATGTTTCCCTGTGGGAATGGAGGCCAGATAGTTAGAGTTGAGACCCC
AGTTCTTAGAGTAGTGGCTTCACTATAGACCTTGGTAAGATAATTTTAGGTAGCCTATGTCTCAGAGAGCATTCTCTAGAG
GAACAAGTAGATGTCTTGAAGATAAAGTACGTTTATTATGCAGCCCTCACTATGGGCTGAGGCCACATGGAATATAC
CTTGAGATGGTCAGGCTATTCTGATCAGAAAAGTGGCTGTGAGTCACTTGTCTTCTTTGTATCGACATCTACATTTAG
GTTGACTGATTCCATCTTATTCTGCTTCCAGCCAACCTCAGTGAACCTGAAATAAAAAGTGGCTCAGAATGTAACAGGAA
ATTCTGGCATAAATTTGACCTGCACGTCTAAGCAAGGTACCCGAAACCTAAGAAGATGATTTTTCTGATAACTAATTC
ACTAATGAGTATGGTGATAACATGCAGATATCAAGATAATGTCACAGAACTGTTCAAGTATCTCCAACAGCCTCTCTCT
TTCATTTCCGGATGGTGTGGGCATATGACCGTTGTGTGTCTTGGAAACGGAGTCAATGAAGATTTCCCTCAAACCTCT
CAATTTAGTAAGTCTGCTTCTAAGTATTTATTTACAAGGTGCTATAAGCAAATCTTTTATCCAAATTATCCAATGTTT
ACTGATTGCTGAAAAACCTTCTAGCAGACCACTAGGAAGGAGCCAAATAGAAGGCTATTTTTACATTTTCTGACTCAAG
ATCCAAGCTATACTTGAAGAAACATGGTCTTAGCCCTGAAAAGTACCCAGTCTTTGGAATTATCTTGGATGGAGGACAA
TGAGATGCTGTGGATACAAAATAGAGGATATTTCTAGCAAGAAGCTTTCAACTGACTAAAAACACACACACACATAC
ACACAAATATATATATATGACAATCATATATACCTGCCTCTCAATGGTACTTATTATGCATATAGACTCATTGTAGTCATT
GTTGGCTGTAAAGCTGAAAAGTCTAGAAATATCTTCTAGTCTTGTGAGACTCTCCAGGAAAAAAGAAATCCACGATGTA
CATATATGACAACCAAGTTTTTTTTAAAAGATGAAATTCAGTCTAAATTATAGCTCATGGAACAACCTGCCTAAATTTA
AAACAAGCTGATCATCAGTTCTATGAGCATTAGAGGCAGGCAAGATCTTTGAAAGTCATGTAAGTCTTCTAAAGGCAC
TGGGGCCTTATCTACTGTAAAACAGTTACTGATACTGATAACAGACTATTGGACTTAGTAAACATGACAAAAATAGAAG
GGAGGGCGATATAGAGTTCTCTATGAAAAGACCTCACATTTGCAGTGAATTTCTGCATGCTCAGCCAGTGAGAGAACCC
AGCAAATTAGCTGTACCCAAAAGGAGCAGGAAATATGTTCAAGAAAAAGACTGAGTGAAGGCATGCTTGCAGCATCTTCT
TGATGTGCTTCCACAGTGATGAAAGAAGAGGTTGAAACTCAGTGTGAGCTTTGCCCATAGAGAGCTAGCCTAACCTGTA
CCCCACTTGTGACAAGCCACCATTCTTCTAGAAATGAAGGCACTCGGTTCCCACTTGTATGCTCATCATTCTGTTGTTA
TTCTAAGGTTTATCCCTTCCACACCCCAACCCAAACCCACAGCCACCTGCCTTCTGCTTCTACGGTCCCTTTTCCAGCCC
TCTAACTATATTTGCTCCTTCTGATGGCACCCATCCATCTTTTCTTCTCCCTGGCTTTGCTCGCTTAATCTGGTG
GCTCCCTCAGGAACCTGGCTATGGGCATACTCTGAGAAACATCCCATGGCTAGCACCTACACCCTACAAGTACGCTA
CCCCCTCTCCAGTACTGATTTCTTTTGTGATGATATCGCAGCCACTCAGAATCTAGTAAAAGATGTGGTCAATTCAGCTG
TCTGTTGCTCCCACTGAAACATTTTCTAGAAATATAGAAGATACTCTAAGCCATACCTGAAGCTTATCGCCTTACAGTA
ACCACCAGCATCAGGCTTCCCAACCTTGTCTACAAGTGAGCAGGCACTGGTAAGCTCATCGTGAAGTCACTCTACTAGT
TAATATCTTAGAACTTGCCAGGTAATACCATCCGAAATGCTTACGCCCTGGTACCTCATCCAAGAAGTTCATATCT
GTGTCCTAAATCCTTGCCCTGACCAGAGATAGGTTAGCTATTATCTTAGTTATGGTTTTATTGTTGTGAAGAAACACCAT
GACTACAGCAATCTTATAAAGGGAAACATTTAATTTGGGTTGGTTTATAGTTTACAGAGTTTATGTCATTATCATCATGG
CAAGAAATACAGTGGTATGCAGGCAGACATGGTGCTAAAAAAGGAGCTGAGAGTTTACGCTTGTATCCACAGGCATCA
AAGATCATAGCTTACAGCATAGGAGCCTTCAAAGTCTGCCTCCCACTGACATACTTTCTTCAACAAGGTGACACTTACTTC
AACAAGGCTACTCTTTTCTAATAGTGCCACTCTTTATGGCCAAGCATTCAAACACATAAATCTATGGTGACCATTACTATT
CAAACCACCGCAGTACTGAATCTTTTTGTGTATCAAAGGCAGAAAGTCTCCATATAAGGCCATAACCTCCTTTATTGG
AAATCCCAAATAGATTCAAGTGAGACAAAAGGGACACACTCAAAGGTATTAATATGGTCCACAATGCCAATAATTA
TTTTCTTACTATTCTAGGAAGAGACATGCCTAAAAATGTATCTAAACTATGGTATATTTTGTATCTAATTTTCTAT
AATTTAGGATTAACAGAAAGGTTGTTCTTTAAATGTCTATTAAGTGAAGTACTTACTTTTCCATTAATTTCCACTACTGC
AGTTTAGGCTTTCTATTCTAGGAAGTAGTTGCTGGCCTTACAGGATCTGATTCTCTAGGGAATGAAGAAATAGCAAAGG
TTTCTAACAGAGAAAGCATACTGAAAGTCAAGGATGAGGAAGCCTGGGGTTAGCTCAGTAAAATTAATAATCAAATACT
TTGAAGTATTTGTTCTGTTTCTCAAATGAGAGGTGATCTAGAGAGTAACTCAAGATGATGGTGGATGGAGGAACCATT
ACAAAAGCTCCTTAAGTTCTTGTGATTTCAGTTTCTATGGCTCTAGGACCCAGGGGGAGATCTCACACACACACA
CACACACACACACACACACACACACACAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGACAGAGACAGAGACAGAGAC
AGAGACAGAGACAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAACAGACAGACAAGAGAGACACAGAGAGAGAG
AAGGAGGAAGGAAGGAAGAAGAATAGAAGAGGGGAGGGATGATGAAGGCAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAGGGA
GGGAAGGATGAAAGAGGAAGGAAGGAAGGAAGGCAAGTTGTAATTTGAACCTTTCATAAGTGAGTTTCTTACTAATGGAA
AACTTGTGGTCATTTCTAGCTCAAGAGTTCCATCTCTCAAACGATTTGGAAGGAGATTACAGCTTCAAGTACTGTGGCC
CTCTCCTTGTGATGCTCATCTTGTATGTCACAAGAAGCCGAATCAGCCTAGCAGGTGATGAGTGTCTTTGTTCTGT

CATTAATGACTGGTAAACTGCATGTGTTACCTCATGCCTCTCTATTTCCATAAGGATACCACTATATGAGGGTGGTTT
TATGTCCAACATTAGAAGTTAAGATACAGTCATCAAAGGATACTTTTATCCTGGGGATGCAGAAAACTTCCCAGCCCA
CACTTGTAATTTCTCTCTGAGACCCAAGAGTCTAATGCCTCATCCTGTCCCCTCTTCTCTGTCCGAGGGCTTTCCTGGCTT
CTGAAGTTGTTTTCGATCTCTTTCAGAAACCAAATGCAGAGTGAAGGCAGTGAGAGCCTGAGGAAAAGGTGAGTTGTGACT
GCATCTCTGTTGAAACAGGTTTGATCTCCCCAGTGCCTGTAACCTGCGCAGGCTTTAACTCCTGAGACACAGCAGGGACT
TATGATAAAGCTAGCCGGGATGGGGGAGAAAAGCAAGGGAAAAGCAGGGAGGAAAAGTAGCCATAAACAGGTGGCAGTGTC
CGCTGCACAGTGCCCAAGGGCATGCCGAGTCAGTCAAGGTCAAGGAATAAACAGTATATAGGGTTGAGATTTGGCAAGC
ATAGCCCAGAGTCTCACTACCATGGCAACTAAAAGTGAAC TAGAACATTCTGGTATACATAGAATGAATAAAACGAG
GAAGCAGAGAGTGAGAACATGTTCCCTTTAACCCAGTGCCTTTGCACCTGTTGTGCCAGCAGCTTGAAAGTATCTTCTA
CCATCTCTCCCCCTCGTTCCTCAGCTCTTGCCCTTCTTAAACAATTAACACTTTCTTAAAAAGCCTAAACTTACTCATGACCAC
CTGTATATATTCTGTGAATCCTTGCTTACTTACTGGAAACCATCTTAGGAACCACTGTTACTCACTGCACTCTGTAGAT
GGCAGGAACCTCAGCAGCTGAAAACAGTGCTGTGCTCTGACCCAGAAGCTATTACAATGCTGGGCATATTTAAAGGTTT
CTGGTGACCAGGCTTCTGACAGCATGACACAATTGGGTTGTCTGTCCCTCCATCCACTGAGGAGCTGGGAGCTTGGGA
ACACCAAGACATTGACTGTCTGGTTATGGGGATGAGCCTGGTTGAAGAGACAGGTTATAAATCCAGGATGCAGGGGCCA
TAAAGAGCTCTGCACTTAGCAGGTGCTAGCAAGAAATTTACCCCTGGAGTTTTGCATAAAAAAGCCACTGTTGAGGTGC
TACTAACTGTAAAGACTGGGTTTCAGAAATGATCGGGAAAGGCCAGCAGAGGGAAGAAATAGAGGAGTTGGCACAATGGC
AGAGCAAGGACCAGAAAAGCATCAGGCCAAAGCAAAGGGTGGTTGTTGCTGGAAGCTTGGGTAAACAGTGTAGCCTGGATG
GCTTTCCTCGGGCTTCTCTCTCTGTCTTACAATACTTTGTTTCTATTTATCAACATTATGTGGTCTCTACTTGTATCTTAT
CTTGAAATCTCACCCAACCTTTCTTCTTGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTTTTTCAGAGTTAAAAATTGCTTTGCCTGA
AATAAGAAGTGCAGAGTTTCTCAGAATTCAAAAATGTTCTCAGCTGATTGGAATTCTACAGTTGAATAATTAAGAACAA
AATACACAACAGTGTCCATATTTATCCTGTTTCCCTTTCCAAGTTTTTGGGCAATGTCAATTGTGTCCCCTATGCCAGGAG
CAGACATCTATTTGTCTTGTCTTGTAACTCAGTGCACACTCATAGGCCAAGAGCACTGAAATGGCTTCTTTCCAGGA
ATAACATTTGGATCAATCTCTCCTACTTGAGATCAGATTCTTCTTAATTTGCATAGTGTGTTTTATATGGAACCTCT
TGTTGTAGGAATACTGGCTTTTATCTGTCTTGACACTTGACATACTTATATACTTATACCTGGACAGCTACCTCTTCAGTCA
GGATGGGAGTGGTATATTTGGTGATGTTATTTGATGTGTTCTGTTGCTATCTTAAACAGCAAAGAGCATATACTATAGT
AGCTCAACTACAATGATCTAGAGAAAGACCCAGCACTTATAAGAAACACTGTCCCTCCATCAGGGTCAATAATGAATAC
AATGACCTAAGTAATATACAGGTGACAGCAACAGCACAGAGTTCTCAGTGTGGCAAATCAAGAAAACAAAATATGGAA
CCATCTCTAGATCCAAGAGCCACTCTACCTGGGCTGCCACAGATACTGGAAGAATCCACCTGCCTGGCCAGCAAGTCAC
AACTTAGCAGGCAGCACTGAAGAAAGCAAGATGACTGTATGCCCTTTTAAAGAAAATGCCTGGAAAAGGTCTGGAGAATG
CTGTGCAAGGATAAGACAGCCAAGCACTCAAAACCAGGAGACATCACTAGAATCCAACCAACAAAATGTTTATGGAAGGA
CTGATCTGCCAGTCCATTGAAAAGTCAAGAGGTGAGAGATAGACCAGTGTGTCTCAATGGATGTAGATATCAGCCAC
CTCGGTGCTCAACAGGTATTTATGATCTCCTTGTTCAAATTCATCTAGATGTAGAACTAGGGAGAGAGCAGTCACATTG
ATGAAAAGCTAGGACTCTTTCAGCTCATGGCTGTGTGGAAGGAGGGAAAAGCAGAAATCACAACACTCTGAGACTACTG
TAGTCTGCAGATACCTGAGTGGGTGGCTTGGCCTTTCAAAGGACAAAGAGCAACTAATGCTGAAAGCACATAGTGTAT
CTATACGGCATGGAATAGTCATCACCCAGACTTAAAGAGAACTTTGGCAGGTCTGAGCAGCAAAAATATTGTTGTTCCAT
TTTACATAAAGGGCCCTGGAGGGCTATAGACTATTCCGCTGGCAGGGCTCATGCTTGAATGTGTCCATCTTGATTACCC
TGTGCAGACTCTTAAGATCTGGCCAGTTACCAACATGTTCTGTACAGAGTGGATTTCAATAAAGTTTTCTTGAATTTTTTC
AAGTATACTTTTTTTTTGTTCCATGTCAGTAGTAATATATGAAATAATGTTCTTACCTCTCACATCTCTGTGGCTAA
AAGTCTCTGACTCCTCCCAATCCTCCTTCTTCTTCTTCTTGTACTGTATAAGAAATGAGGTTTGTGTTGCTAAAT
ATATATCTCAATAATGAGACTTCTTAAAAATTGAGTAATATTTATTTTCTGAGTGTAGTAGGAACCTCAGAATAAGG
AAACAAGGCTTTTTCAGCTTGTATTTTTCAAGCTGAGCAACTTAAAAATTATGTGCATATATATGAGAAAAAAAGCTT
AATGTAATAATGATTGCCTGAAAACACACCCTTGATAAGTTAATAATTAATAATATATGTCACACACACAAAAA
CACAAGAAGAGCCAATTATCTGCAACAGAGAGCTGTCTGAACTATGGGGGCAGAACTATGTCTAAGTCTTCACTAG
AGAAACCCAGGTAAGTGAAGACAGTGCCTCAAAATACATTTTTTGAAGACTAGATGAAACATTAATACACCTTTAGTGAA
AACATCTCTCCGTTGCTTATTACATTTCTAGACTTCTGTGCTCCAAGTGTGAGGGCTAAGAAAAGCAAAGAGAGCTG
CAGCCGGTCTAGAGGAGCACACCAGCAAACACTGCCTGTTGGTCTGTTGGCTCGGCTCTTTGATATTACTGTTCCACCCA
GTCCTCCAATGACTCTTGAGTTGTAGCTCATGAAGCACTGTGCCACTTTGCTCATGAATAAATCTAAGCAGAGGGATG
TCAGAGGAATTTGGTGTCTCCTGTGAACCTCTTGTTTAGCCCCCCCCACCCATTACAGACACCCCACTTTCTATTCTCT
CCAGACATAGAAGAAACAGCATTGTTGGCCAGGTTGATTACATGAGTCCACATCCTGTGCTACCCACTCCAAGTTC
CAGAGGAGGTAACCATGAAGTCAGAGGCTGTGGCTAAGGAGGCACGTGAGGAGATAAGTATTAGGAGATTCTGTCCATAG
GGAAAGTGAAACGTAGAGGAGTCTGCACATCATATTACTGATCTGAAAGCCTCCACGGCTTCTCTGCCTGCCA
TTTGTGCTCCTCCAGTTGACATCTTCCCACCCCTGCCTTTGAGACAGCTTACCTATGCCCTGTCTCACATTTTC

3. LentiCRISPRv2 Plazmit Sekansı (14873)

TGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGAC
GTCAATGGGAGTTTGTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAAT
GGGCGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGCGCGTTTTGCCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATC
TGAGCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGT
GTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGAAAAATCTCTAGCAGTGG
CGCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAAACAGAGGAGCTCTCTCAGCGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGC
ACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGG
TGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGAAAAGAAA
AAATATAAATTAACATATAGTATGGGCAAGCAGGAGCTAGAACGATTCGAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACAT
CAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAA
TACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAA
GAGCAAAAACAAAGTAAAGACCACCGCACAGCAAGCGGCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAA
TTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGA
GTGTGTCAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGG
GCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAG
GGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCTGGCTGTG
GAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTGGGGTTGCTCTGAAAACTATTTGCACCACTGCTGTGCCTTG
GAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAAC
AATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGAAAACAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAAT
TAGATAAATGGGCAAGTTTTGTGGAATTGGTTAACATACAAATTTGGCTGTGGTATATAAATTTTCATAATGATAGTA
GGAGGCTTGGTAGGTTTTAAGAATAGTTTTTGTCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCG
TTTCAGACCCACCTCCCAACCCGAGGGGACCCGACAGGCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGA
GACAGATCCATTGATAGTGAACGGATCGGCACTGCGTGCGCCAATTCTGCAGACAAATGGCAGTATTCATCCACAATT
TTAAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTA
AGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGTTAATT
AAGGTACCGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATT
AATTTGACTGTAAACACAAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAAATTTCTTGGGTAGTTGACGTTTT
AAAATTATGTTTTAAATGGACTATCATATGCTTACCCTAAGTAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGG
AAAGGACGAAACACCGGAGACGGTTGAAATGAGCACACAAAATACACATGCTAAAATATTATATTCTATGACCTTTAT
AAAATCAACAAAATCTTCTTTTAATAACTTTAGTATCAATAATTAGAATTTTTATGTTCTTTTTGCAAACTTTTAATAA
AAATGAGCAAAATAAAAAACGCTAGTTTTAGTAACTCGCGTTGTTTTCTTACCTTTAATAATAGTACTCCACCCTTG
TTCTAAGCGGTCAGCTCCTGCTCAATCATTTTTTGGAGCATCTTCAAATGTTCTAACTCCACCAGCTGCTTAACTAAAG
CATTGCTTTAACAACCTGACTTCATTAGTTAACATCTTCAAATGTTGCACCTGATTTTGAATACTCTGTTGATGTTTAAAC
AAATTTCAATCCAGCTTCAACAGCTATTTCAACAGCTTTCATGATTTCTTCTTTGTTAATAAACAAATTTCCATAATACAT
TTAACAAATGTGATCCAGCTGCTTTTTTACAGCTTTCATGTCTTCTAAAACCTAATTCATAAATTTTGTCTTTAATGCAC
CAATATTTAATACCATATCAATTTCTGTTGCACCATCTTAATTGCTTCAGAAACTTCGAATGCTTTTGTAGCTGTTGTGCA
TGCACCTAGAGGAAAACCTACAACATTTGTTATTCCTACATTTGTGCCTTTAATAATTTTACAATAGCTTGTTCATAT
GAATTAACACAAACTGTTGCAAAATCAAATTCATGCTTCATACATAATGTTTAAATTTACGCTTTTCGTAGCATCTTGT
TTAATAATGTGTGATCTATATATTTGTTTAGTTTCATTTTTTCTCCTATATATTCATTTTTAATTTTAAATTTCTTAAATAATTT
CGTCTACTTTAACTTTAGCGTTTTGAACAGATTACCAACACCTATAAAAATAAATTTTTAGTTTAGGTTAGTTCCACTTG
GGCAACAGCAAATCATGACTTATCTTCTAAATAAAATTTTAGTAAGTCTTGTCTGCGCATATTATACATTCCATCGATGT
AGTCTTCAACATTAACAACCTTTAAGTCCAGCAATTTGAGTTAAGGGTGTGCTCTCAATGATTTTCAATATGGTTCAATTT
TTAATTTCTTTTCTCTGGTTAAAAATCAAGTTTAAAGTGAAAGTGAATATGCACCCATTTCTTTAAATAAATCTTCTAA
ATAGTCTACTAATGTTTTATTTGTTTTTATAAAAATCAAGCAGCCTCTGCTATTAATATAGAAGCTTGTATTCCATCTTTA
TCTCTAGCTGAGTCATCAATTACATATCCATAACTTTCTCATAAGCAAAAAACAAATTTAATCCGTTATCTTCTTCTTAG
CAATTTCTCTACCCATTCATTTAAATCCAGTTAAAGTTTTTACAATATTAACCTCATATTTTTCATGAGCGATTCTATCACC
CAAATCACTTGTACAAAACCTGAATATAGAGCCGATTTTTTGAAGTCTATTTAAGCGTTTTAGATTTGATAATTTTCA
ATCAATTAATAATGTTCTCTGTTGATTTCCATCTAATCTTACAAAATGACCATCATGTTTTATTGCCATTCCAAATCTGTCA
GCATCTGGGTCATTCATAATAATAATATCTGCATCATGTTAATACCATATTCAAGCGGTATTTTTCATGCAGGATCAAAAT

TCTGGATTTGGATTTACAACATTTTTAAATGTTTCATCTTCAAATGCATGCTCTTCAACCTCAATAACGTTATATCCTGATT
CACGTAATATTTTTGGGGTAAATTTAGTTCCTGTTCATTAAGTGCCTAAAAATAATTTTTAAATCTTTTTAGCTTCTTG
CTTTTTTTGTACGCTCTGTTTTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTGAAAAAGTGG
CACCGAGTCGGTGCTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCACTGAGGCA
GAGCGCACATCGCCACAGTCCCGGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCG
GGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTA
GTCGCCGTGAACGTTCTTTTTGCAACGGGTTTCCCGCCAGAACACAGGACCGGTTCTAGAGCGCTGCCACCATGGACAA
GAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCAGC
AAGAAATCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCG
GCGAAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCAGCAAGATAACACCAGACGGAAGAACCAGGATCTGCTATC
TGCAAGAGATCTTACGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTCCACAGACTGGAAGAGTCTTCCCTGGTGGGA
AGAGGATAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCCTACCACGAGAAGTACCCACC
ATCTACCACCTGAGAAAGAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTATCTGGCCCTGGCCACA
TGATCAAGTCCGGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCA
GCTGGTGCAGACTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAAACCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCTGTCT
GCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCGCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGTGGCTGTTTCGGA
AACCTGATTGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGATGCCAAACTGCAGCT
GAGCAAGGACACTACGACGACGACTGGACAACCTGCTGGCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACTGTTTCTGGCC
GCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCTGCTGAGCGACATCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCG
CCTCTATGATCAAGAGATACGACGAGCACACCAGGACCTGACCTGTGAAAGCTCTCGTGGCGCAGCAGCTGCCTGA
GAAGTACAAAGAGATTTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGTACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAG
TTCTACAAGTTCATCAAGCCATCTGGAAAAGATGGACGGCACCGAGGAACTGCTCGTGAAGTGAACAGAGAGGACC
TGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCG
GCGGACGGAAGATTTTTACCCATCTGAAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAGATCTGACCTTCCGCATCCCCTACT
ACGTGGGCCCTTGGCCAGGGGAAAACAGCAGATTGCGCTGGATGACCAGAAAAGAGCGAGGAAACCATACCCCTGGAA
CTTCGAGGAAGTGGTGGACAAAGGGCGCTTCCGCCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCC
AACGAGAAGGTGTGCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTACCCTGTATAACGAGCTGACCAAAGTGAATACG
TGACCGAGGGAATGAGAAAGCCCGCTTCTGAGCGCGAGCAGAAAAAGGCCATCGTGGACTGCTGTTCAAGACCAA
CCGAAAAGTGACCGTGAAGCAGCTGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCCGGC
GTGGAAGATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATAACCAGATCTGCTGAAAAATTAAGGACAAGGACTTCTGGACA
ATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATATCGTGTGACCCTGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACG
GCTGAAAACCTATGCCACCTGTTTCGACGACAAAAGTATGAAAGCAGCTGAAGCGCGGAGATACACCAGGCTGGGGCAGG
CTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACAATCCTGGATTTCTGAAGTCCGACGGCT
TCGCCAACAGAACTTTCATGACGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCAGAAAGCCAGGTGTC
CGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGCGAGCCCGCCATTAAGAAGGGCATCTGACAGACA
GTGAAGGTGGTGGACGAGCTCGTGAAGTATGATGGGCCGGCACAAGCCGAGAACATCGTATCGAAATGGCCAGAGAG
AACCAGACCACCCAGAAAGGACAGAAAGAACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGGGCATCAAAGAGCTGGG
CAGCCAGATCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAAT
GGGCGGATATGTACGTGGACCAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCGTGCCTCAGA
GCTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACCAGGGCAAGAGCGACAACGTGC
CCTCCGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGACGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTT
CGACAATCTGACCAAGGCCGAGAGAGGGCGCTGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGGA
AACCAGGACATCACAAGCACGTTGGCACAGATCTGGACTCCCGGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTG
ATCCGGGAAGTGAAGTATGATCACCTGAAAGTCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTACAAAGTGCG
CGAGATCAACAACCTACCACACGCCACGACGCCTACTGAAACCGCTCGTGGGAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCT
AAGCTGGAAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGCTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAA
ATCGGCAAGGCTACCGCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGACCGAGATTACCCTGGCCAACGG
CGAGATCCGGAAGCGGCTCTGATCGAGACAAACGGCAAAACCGGGGAGATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGGC
ACCGTGCAGAAAGTGTGATGACCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGGCTTACGAAA
GAGTCTATCTGCCAAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAAAAGAGGACTGGGACCCCTAAGAAGTACGGCGGCT
TCGACAGCCCCACCGTGGCTATTCTGTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAAAAGTGAAGAGTGT
GAAAGAGCTGCTGGGATCACCATCATGGAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCATCGACTTCTGGAAGCCAAGGGC

TACAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCTAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAAAAACGGCCGGAAGAGAA
TGCTGGCCTCTGCCGGCAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAAATATGTGAACCTCTGTACCTGGCC
AGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGTCCCCGAGGATAATGAGCAGAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAGCACTACC
TGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTGGACAAAAGTGCTGTC
CGCTACAACAAGCACCCGGATAAGCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATCATCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTG
GGAGCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGACACCACCATCGACCCGAAGAGGTACACCAGCACAAAGAGGTGCTGGACG
CCACCTGATCCACCAGAGCATCACCGCCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCTGGGAGGCGACAAGCGACC
TGCCGCCACAAAGAAGGCTGGACAGGCTAAGAAGAAGAAAGATTACAAAGACGATGACGATAAGGGATCCGGCGCAAC
AAACTTCTCTGTGTAACAAGCCGGAGATGTCGAAGAGAATCCTGGACCGACCGAGTACAAGCCACGGTGCGCCTC
GCCACCCGCGACGACGTCCCAGGGCCGTACGCACCCTCGCCGCGCGTTTCGCGGACTACCCCGCCACGCGCCACACCGT
CGATCCGGACCGCCACATCGAGCGGGTACCAGAGCTGCAAGAACTTCTCTCACGCGCTCGGGCTCGACATCGGCAAG
GTGTGGGTGCGGACGACGGCGCCGCGGTGGCGGTCTGGACCACGCCGGAGCGCTCGAAGCGGGGGCGGTGTTCCGG
AGATCGGCCCGCGCATGGCCGAGTTGAGCGGTTCCCGGCTGCCGCGCAGCAACAGATGGAAGGCTCCTGGCGCCGCA
CCGGCCAAGGAGCCCGGTGTTCTGGCCACCGTTCGGAGTCTCGCCCGACCACCAGGGCAAGGGTCTGGGACGCGCC
GTCGTGCTCCCGGAGTGGAGGCGCCGAGCGCGCCGGGTGCCGCCTTCTGGAGACCTCCGCGCCCGCAACCTCCC
CTTCTACGAGCGGCTCGGCTTACCCTCACCGCCGACGTGAGGTGCCGAAGGACCGCGCACCTGGTGCATGACCCGCA
AGCCCGGTGCCTGAACGCGTTAAGTCGACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAAC
TATGTTGCTCCTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTAAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTT
CTCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCAC
TGTGTTGCTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTACGCTCCTTTCGGGACTTTCGCTTCCCCCT
CCCTATTGCCACGGCGAACTCATCGCCGCTGCCTTCCCCGCTGTGGACAGGGGCTCGGCTGTGGGCACTGACAATT
CCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCTTCTTGGGTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCT
TCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGACCTTCTTCCCGCGGCTGTGCCGGCTCTGCGGCTCTTCCGCGTC
TTCGCTTCCGCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCGGCTCCCCGCGTGCCTTAAAGACCAATGACTTACAAGGC
AGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGACTGGAAGGGTAATTACTCCCAACGAAGACAAGATCTG
CTTTTTGCTGTACTGGGTCTCTCTGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGTAACCTAGGGAACCCACTGCTT
AAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGTAGTGCTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACCTAGAGATCCCTC
AGACCTTTTAGTCAGTGTGAAAATCTCTAGCAGGGCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTG
CCAGCCATCTGTTGTTTCCCTCCCCGTCCTTCTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTCTAATAAAAAT
GAGGAAATGTCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGCTATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGG
ATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAAGAACAGCTGGGGCTC
TAGGGGTATCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCCGTACA
CTTGCCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGCGGCTTCCCCGTCAGGCTC
TAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAATTGATTAGGGTGATGGT
TCACGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTGTACGTTGGAGTCCACGTTCTTAAATAGTGGACTCTTG
TTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTATAAAGGGATTTTCCGATTTCCGGCTATTGG
TTAAAAATGAGCTGATTTAACAATAAATTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGAAAAGTCC
CCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCC
CCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCC
CCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCATTTCTCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGACAGGGCCGAGGCCGCC
TCTGCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGAGCTTG
TATATCCATTTTCGGATCTGATCAGCACGTGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACAA
GGTGAGGAACTAAACCATGGCCAAGTTGACCAGTGCCTTCCGGTGTCAACGCGCGGACGTCGCCGGAGCGGTGAG
TTCTGGACCGACCGGCTCGGTTCTCCCGGACTTCTGTGAGGACGACTTCGCGGTTGTTGCGGGACGACGTGACCCT
GTTATCAGCGCGTCCAGGACCAGGTGGTGCCGACAACACCTGGCTGGGTGTTGGGTGCGCGGCTGGACGAGCTG
TACCCGAGTGGTTCGAGGTCGTGTCCACGAACCTCCGGGACGCTCCGGGCCGCCATGACCGAGATCGGCGAGCAGC
CGTGGGGCGGGAGTTCGCCCTGCGGACCCGGCCGCAACTGCGTGCACTTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACACGT
GCTACGAGATTTGATTCACCCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACCGCGGCTGGATGA
TCCTCCAGCGGGGATCTATGCTGGAGTTCTTCCGCCACCCAACTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAAATAA
GCAATAGCATCACAATTTACAAAATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTAT
CTTATCATGTCTGTATAACCGTCGACCTTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTATAGCTGTTCTGTGTGAAATGTT
ATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACT

CACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAAC
GCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGC
GGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTG
AGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGAC
GAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTG
GAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACTGTCCGCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGG
CGTTTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCC
CCGTTCCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTG
GCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACT
ACGGTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCT
TGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGAT
CTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTACGTTAAGGGATTTTGGTCATG
AGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAAGTAAAGTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTA
AACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCATCTGTCTATTTTCGTTACCCATAGTTGC
CTGACTCCCGCTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACC
CACGCTCACCGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTT
ATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTGCGGGGAAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCAACGTTGT
TGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGCTGTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCG
AGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGTTAGCTCCTCGGTCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCG
CAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTG
GTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAAT
ACCGCGCCACATAGCAGAACCTTTAAAAGTGTCTCATATTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACC
GCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAAGTATCTCAGCATCTTTACTTTACCAGCGTTTCTGG
GTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTT
CCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAA
ACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTGACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATG
GTGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGA
GTAGTGCAGCAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGG
CGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATT
ACGGGGTCAATTAGTTCATAGCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCC
CAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAAT
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, kararlarım 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.

