

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

KEMOTERAPİ AJANI DOKSORUBİSİN'İN
ESCHERICHIA COLI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ VE
DİRENÇLE İLGİLİ GENLERİN GENOM BOYU
KÜTÜPHANE ZENGİNLEŞTİRME VE TARAMA
ÇALIŞMALARI İLE ARAŞTIRILMASI

ANI ALTUĞ CURNA
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-18024 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2020

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kemoterapi ve Kemoterapik ajanlar.....	3
2.2. Sitotoksik Kemoterapotik ajanlar	4
2.3. Sitotoksik Kemoterapotik ajanlardan; Antrasiklinler	5
2.4. Doksorubisin.....	7
2.5. Kemoterapotik ajanların geliştirilmesi ile kanser	8
2.6. Doksorubisin ile Tedavilere Yaklaşım	9
2.7. Doksorubisin Direnci ile İlişki Mekanizmalar	10
2.8. Kanser Etki Mekanizmalarının Belirlenmesinde Moleküler Tekniklerin Kullanılması....	11
2.9. ASKA (A Complete Set of <i>E. coli</i> K-12 ORF Archive)	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	14
3.1. GEREÇLER	14
3.1.1. ASKA Klon Seti	14
3.1.2. Kullanılan Plazmid	15
3.1.3. Kullanılan İlaç	15
3.2. YÖNTEM.....	16
3.2.1. Çalışmada Kullanılması Planlanan Doksorubisin Konstrasyonunun Belirlenmesi.....	16
3.2.1.1. MIC Yöntemi.....	16
3.2.1.2. Büyüme Eğrisi	17
3.2.1.3. Disk Difüzyon Yöntemi İle Doksorubisin Direnç Seviyelerinin Belirlenmesi	17
3.2.1.4. Spot Testi ile Doksorubisin Direnç Seviyelerinin Belirlenmesi.....	18
3.2.2. DH10b(pCA24N) suşunun eldesi.....	18
3.2.2.1. Kompetant DH10b Suşlarının Eldesi	19

3.2.2.2. Isı Şoku (Heat Shock) İle Transformasyon	19
3.2.2.3. Stok Alınması	20
3.2.3 Doksorubisin Seleksiyonu İçin Kullanılan Teknikler	20
3.2.3.1. Gradient Yöntemi	20
3.2.3.2. Direkt Ekim Yöntemi	21
3.2.3.3. Zenginleştirme Yöntemi	21
3.2.3.4. Çizgi Ekim Yöntemi	23
3.2.3.5. Tek Koloni Ekim Yöntemi	24
3.2.4.Tolerant Kolonilerin Plazmidlerindeki Gen Bilgilerinin Tespit Edilmesi	25
3.2.4.1. Plazmid İzolasyonu	25
3.2.4.2. İzolasyon Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi	26
3.2.4.3. Sekansa Gönderilmesi	26
3.2.5. Sekans Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Blast.....	26
4. BULGULAR	28
4.1. Optimizasyon Çalışmaları: Doksorubisin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi İçin Yapılan Çalışma Sonuçları.....	28
4.1.1. MIC Yöntemi Sonuçları	28
4.1.2. Büyüme Eğrisi İle Yapılan Çalışma Sonuçları.....	30
4.1.3. Spot Test İle Doksorubisin Direnç Seviyelerinin ve Uygun Suşun Belirlenmesi	34
4.1.4. Disk Difüzyon Yöntemi İle Konsantrasyon Belirlemesi	35
4.1.5. Kullanılacak Suş ve Doksorubisin Konsantrasyonunun Belirlenmesi	38
4.2. DH10b- ASKA Havuzunun Elde Edilmesi (DH10b-ASKA Pooled)	38
4.3. Doksorubisin ile Seleksiyon Çalışmaları.....	40
4.3.1. Gradient Yöntemi ile Tespit Edilen Tolerant Koloniler.....	40
4.3.2. Direkt Ekim Yöntemi ile Tespit Edilen Tolerant.....	44
4.3.3. Zenginleştirme (Enrichment) Yöntemi ile Seleksiyon	48
4.3.4. Çizgi Ekim Yöntemi ile Hipertolerantların Seçilmesi.....	54
4.3.5.Seçilen Hipertolerant Kolonilerin Tek Koloni Yöntemi ile Çoğaltılması ve Saflaştırılması	57
4.4. Hipertolerant Klonların İçerdiği Rekombinant Plazmidlerin Eldesi	58
4.5. Rekombinant Plazmidlerdeki Insert Sekanslarının Belirlenmesi ve Bazı Biyoinformatik Analizler	59
5. TARTIŞMA.....	60
5.1. <i>recA</i> , DNA rekombinasyon ve tamir mekanizması	61

5.2. <i>mdtK</i> , multidrug efflux pump MdtK	64
KAYNAKLAR.....	69
EKLER	85
ÖZGEÇMİŞ.....	92



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Amp	: Ampisilin
Cm	: Kloramfenikol
Dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotit trifosfat
DOX	: Doksorubisin
IPTG	: İzopropil beta-D-1 tiyogalaktopiranozid
LB	: Luria Bertani
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
M	: Molar
mA	: MiliAmper
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MgCl₂	: Magnezyum klorür
MIC	: Minimum Inhibitory Concentration
nm	: Nanometre
nt	: Nükleotid
OD	: Optik Densite
RNA	: Ribonükleik Asit
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
UV	: Ultraviyole
Δ	: Delesyon

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Daunorobisin ve Doksorubisinin moleküler yapıları	7
Şekil 2. pCA24N klonlama plazmidi ve klonlama bölgesinin gösterilmesi.	14
Şekil 3. pCA24N plazmid haritası.....	15
Şekil 4. Doksorubisin kemoterapotik ajanının moleküler yapısı.	16
Şekil 5. Direk ekim Yöntemi için kullanılan deney dizaynı.	21
Şekil 6. Zenginleştirme (Enrichment) ile seleksiyon yönteminin ilk aşamasının şematik gösterimi.....	22
Şekil 7. Zenginleştirme (Enrichment) ile seleksiyon yönteminin ikinci aşamasının şematik gösterimi.	23
Şekil 8. Çizgi Ekim Yöntemi için deney dizaynı.	24
Şekil 9. Tek koloni (Seyreltme ekim) tekniğinin gösterilmesi.....	24
Şekil 10. NCBI Blast veritabanı internet ekran görüntüsü.....	27
Şekil 11. ECOCYC veritabanı internet ekran görüntüsü	27
Şekil 12. ASKA klon seti havuzunun birinci büyüme eğrisi grafiği.....	31
Şekil 13. Kontrol olarak seçilen W3110 pCA24N örneğinin birinci büyüme eğrisi grafiği.	32
Şekil 14. ASKA klon seti havuzunun ikinci büyüme eğrisi grafiği	33
Şekil 15. Kontrol olarak seçilen W3110 pCA24N örneğinin ikinci büyüme eğrisi grafiği.	34
Şekil 16. <i>E. coli</i> W3110(pCA24N), <i>E. coli</i> P34G8 AG1 (pCA24N:aceK) ve <i>E. coli</i> DH10b(pCA24N) suşlarının farklı doksorubisin konsantrasyonu içeren besiyerlerinde spot testi sonuçları.	35
Şekil 17. IPTG içermeyen Katı Besi yerinde Aska Suşu Disk Difüzyonu.....	36
Şekil 18. 33 µM IPTG içeren Katı Besi yerinde Aska Suşu Disk Difüzyonu.....	36
Şekil 19. DH10b suşu ile yapılan Disk Difüzyonu	37
Şekil 20. ASKA Plazmid havuzunun ve herhangi bir gen içermeyen pCA24N plazmidinin DH10b suşu içerisine transformasyonu sonucu elde edilen koloniler.	39
Şekil 21. Gradient yöntemi ile seleksiyon da kolonilerin gradient besi yerinde üreme yoğunluklarını gösteren petri fotoğrafı.	40
Şekil 22. Gradient yönteminde inkübasyon sonucunda üreyen (DH10b-ASKA pooled) kolonileri.	41
Şekil 23. Gradient Yöntemi kullanılarak hazırlanan besi yeri üzerinde bölgesel konsantrasyonların gösterilmesi.....	42

Şekil 24. Gradient yöntemi ile seleksiyon sonucu seçilen tolerant kolonilerin gradient petrisinde isimlendirilmesi ve gösterilmesi.	43
Şekil 25. 0 µg/ml doksorubisin içeren katı besi yerine DH10b- ASKA pooled ve kontrol DH10b-pCA24N direkt ekimi.	44
Şekil 26. 60 µg/ml doksorubisin içeren katı besi yerine DH10b-ASKA pooled ve kontrol DH10b -pCA24N direkt ekimi.	45
Şekil 27. 90 µg/ml doksorubisin içeren katı besi yerine DH10b -ASKA pooled ve kontrol DH10b-pCA24N direkt ekimi.	45
Şekil 28. 125 µg/ml doksorubisin içeren katı besi yerine DH10b-ASKA pooled ve kontrol DH10b-pCA24N direkt ekimi.	46
Şekil 29. 175 µg/ml doksorubisin içeren katı besi yerine DH10b-ASKA pooled ve kontrol DH10b-pCA24N direkt ekimi.	46
Şekil 30. 250 µg/ml doksorubisin içeren katı besi yerine DH10b-ASKA pooled ve kontrol DH10b-pCA24N direkt ekimi.	47
Şekil 31. 500 µg/ml doksorubisin içeren katı besi yerine DH10b-ASKA pooled ve kontrol DH10b-pCA24N direkt ekimi.	47
Şekil 32. Direkt ekim ile seleksiyon yönteminde Doksorubisin konsantrasyonu ve koloni sayısı ilişkisinin grafik ile gösterilmesi.	48
Şekil 33. 1. Aşamadan gelen 0, 125, 250, 500 µg/ml µg/ml doksorubisin konsantrasyonlu sıvı besi yerindeki suşların, 0 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 350 µg/ml, 500 µg/ml doksorubisin konsantrasyonlu katı besi yerlerine ekimi.....	49
Şekil 34. DH10b-pCA24N ve DH10b-ASKA Pooled suşlarının zenginleştirme yöntemi ile seleksiyon'un birinci aşamasında doksorubisin içermeyen besiyerlerinde büyütülen örneklerin artan konsantrasyonlarda doksorubisin içeren katı besiyerlerine ekim sonuçları.	50
Şekil 35. DH10b-pCA24N ve DH10b-ASKA Pooled suşlarının zenginleştirme yöntemi ile seleksiyon'un birinci aşamasında 125 µg/ml doksorubisin içeren besiyerlerinde büyütülen örneklerin artan konsantrasyonlarda doksorubisin içeren katı besiyerlerine ekim sonuçları.	51
Şekil 36. DH10b-pCA24N ve DH10b-ASKA Pooled suşlarının zenginleştirme yöntemi ile seleksiyon'un birinci aşamasında 250 µg/ml doksorubisin içeren besiyerlerinde büyütülen örneklerin artan konsantrasyonlarda doksorubisin içeren katı besiyerlerine ekim sonuçları.	52

Şekil 37. DH10b-pCA24N ve DH10b-ASKA Pooled suşlarının zenginleştirme yöntemi ile seleksiyon'un birinci aşamasında 500 µg/ml doksorubisin içeren besiyerlerinde büyütülen örneklerin artan konsantrasyonlarda doksorubisin içeren katı besiyerlerine ekim sonuçları.	53
Şekil 38. Direkt Ekim yöntemi ile seleksiyon sonucu seçilen tolerant klonların çizgi ekim yöntemi ile seleksiyonu.....	54
Şekil 39. Gradient yöntemi ile seleksiyon sonucu seçilen tolerant klonların çizgi ekim yöntemi ile seleksiyonu.....	55
Şekil 40. Zenginleştirme (Enrichment), Direkt Ekim ve Gradient yöntemi ile seleksiyon sonucu seçilen tolerant klonların çizgi ekim yöntemi canlandırılması.	55
Şekil 41. Direkt ekim ile seleksiyon yöntemi sonucu seçilen hipertolerant klonların tek koloni ekim sonuçları.....	57
Şekil 42. Gradient ile seleksiyon yöntemi sonucu seçilen hipertolerant klonların tek koloni ekim sonuçları.....	57
Şekil 43. Zenginleştirme (Enrichment) ile seleksiyon yöntemi sonucu seçilen hipertolerant klonların tek koloni ekim sonuçları	58
Şekil 44. Hipertolerant kolonilerin rekombinant plazmidlerinin izolasyon jel (%0,8) görüntüsü.....	58
Şekil 45. Holliday birleşimi (Holliday Junction) yapısı.....	62

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Farklı klonlara ait MIC yöntemi sonucunda elde edilen OD ₆₀₀ değerleri.	29
Tablo 2. ASKA klon seti havuzunun birinci büyüme eğrisi değerleri.....	30
Tablo 3. Kontrol olarak seçilen W3110 pCA24N örneğinin büyüme eğrisi değerleri.	31
Tablo 4. ASKA klon seti havuzunun ikinci büyüme eğrisi değerleri.	32
Tablo 5. Kontrol W3110 pCA24N örneğinin ikinci büyüme eğrisi değerleri.	33
Tablo 6. Spot testi için kullanılan <i>E.coli</i> suşları	34
Tablo 7. Zon oluşumu değerlendirmesi.	38
Tablo 8. Gradient ile seleksiyon yöntemi sonucu tespit edilen tolerant koloniler.....	43
Tablo 9. Seleksiyon çalışmalarında seçilen örnek sayıları.	55
Tablo 10. Seleksiyon yöntemleri sonucu seçilen hipertolerant koloniler.	56
Tablo 11. Hipertolerant kolonilerin rekombinant plazmidlerinin taşıdıkları insertlerin, BlastX analizi sonucu elde edilen gen bilgileri.....	59

ÖZET

KEMOTERAPİ AJANI DOKSORUBİSİN'İN *Escherichia coli* ÜZERİNDEKİ ETKİSİ VE DİRENÇLE İLGİLİ GENLERİN GENOM BOYU KÜTÜPHANE VE TARAMA ÇALIŞMALARI İLE ARAŞTIRILMASI

CURNA A.A. 2020, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2020

Kanser hastalıklarının tedavisinde kullanılan kemoterapik ilaçlara karşı, kanser hücreleri zaman zaman direnç gösterebilmektedir. Kanser hücresi, bazı genlerin yapısını ve ifadesini değiştirerek ilaçtan kaçabilmekte ve kanserin nüksetmesi ile ölümcül sonuçlar görülebilmektedir. Direncin moleküler mekanizmasında görevli olabilecek genler ve proteinlerin tespiti, hem temel bilimler açısından, hem de tedavi açılımları sunması bakımından önemlidir.

Doksorubisin, kanser tedavisinde rutin olarak kullanılan, aynı zamanda da antibakteriyel etkiye sahip, yaygın bir kemoterapik ajandır. Bu ilaç bir hücreye verildiği zaman, DNA'ya hasar vermekte ve hücrenin ölümüne neden olmaktadır. Ancak, bu ilaca karşı da kanser hücresinin direnç geliştirebildiğine dair raporlar mevcuttur. İlacın hem moleküler hedeflerinin bulunması, hem de direnç gelişiminde doğrudan veya dolaylı olarak rolü olan genlerin tespit edilmesi farklı hücresel sistemlerde araştırılmalıdır.

Bu tez çalışmasının amacı, bakteri hücresini model olarak kullanarak, artan doksorubisin konsantrasyonlarında, 4123 genin taranarak, hücreye direnç kazandıran gen adaylarının araştırılmasıdır. Burada, *Escherichia coli* genlerinin bir ekspresyon plazmidine klonlanması ile elde edilen ASKA klon seti kullanılmıştır. 57 adet mikropalakadan oluşan bu set, 4123 adet gen ile ilaç ilişkisini farklı açıdan irdelememizi sağlayan eşsiz bir genomik kaynaktır. Her bir genin ifadesi IPTG ile indüklenebildiği için, genler taranabilmekte ve yabancı tipin öldüğü ilaç konsantrasyonunda yaşayan klonun içerdiği gen, direnç fenomeni ile doğrudan veya dolaylı olarak ilişkili olduğu yaklaşımı esas alınmaktadır.

Bu çalışmada, ilk olarak, birkaç farklı *E. coli* yabancı tip bakteri suşları ile yapılan ön deneylerde, doksorubisinin hangi *E. coli* suşunu, hangi konsantrasyonda öldürdüğü, minimum inhibe edici konsantrasyon (MIC) deneyleri, büyüme eğrisi deneyleri, spot testleri ve disk difüzyon yöntemleri ile belirlenmiştir. Daha sonra, 4123 adet klonun “genom boyu plazmid

kütüphanesi” stokları kullanılarak, ısı şoku yöntemi ile *E. coli* D10Hb suşuna transforme edilmiştir. Optimizasyon deneylerinden elde edilen konsantrasyon verileri kullanılarak, göreceli olarak yüksek doksorubisin içeren ortamlarda yaşayabilen klonların tespit edilmesi amacıyla, gradient ekim, direkt ekim ve zenginleştirme ile seleksiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Doksorubisin toleransına sahip, 129 adet koloni ile onaylama çalışmaları yapılmıştır. Daha sonra göreceli olarak en yüksek tolerans değerine sahip 34 koloni seçilmiştir. Seçilen rekombinant plazmidlerin içerdikleri gen dizileri, sanger sekanslama analizi ile belirlenmiştir. Elde edilen sekanslar kullanılarak, Blast analizleri ile gen bilgileri bulunmuştur. Çalışmalar sonucunda, göreceli olarak yüksek doksorubisin konsantrasyonlarında yaşayan *E. coli* klonlarının plazmidlerinde yer alan genlerin *recA* (n=23 klon) ve *mdtK* (n=11 klon) olduğu tespit edilmiştir. Bu genlerin DNA hasarı onarımında ve Na⁺ kanallarını kullanarak ilacı hücrenin dışına atabilmede görevli olabileceği tartışılmıştır. Ayrıca bu genlerin insan genomunda homologları araştırılmıştır.

Bu çalışma, binlerce genin (n=4123) bir ilaçla ilişkisini tarayan ve bakteriyel model hücre yaklaşımı ile kanser konusuna farklı bir açıdan yaklaşan, moleküler biyoloji, mikrobiyoloji ve genomik disiplinlerini kullanan, kapsamlı, orijinal ve yol gösterici sonuçlar veren bir tez çalışmasıdır.

Anahtar Kelimeler: Direnç, doksorubisin, *Escherichia coli*, gen, genomik, *mdtK*, *recA*

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF THE CHEMOTHERAPY AGENT DOXORUBICIN ON *ESCHERICHIA COLI* AND THE GENES RELATED TO RESISTANCE BY GENOME-WIDE LIBRARY AND SCREENING STUDIES

CURNA A.A. 2020, Aydın Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Medicine Faculty Clinical Biology Program Master Thesis, Aydın, 2020

Cancer cells may occasionally develop resistance against chemotherapeutic drugs used in the treatment of cancer diseases. The cancer cell can escape from the drug by changing the structure and expression of some genes, and with cancer recurrence, fatal results can be seen. The identification of the genes and proteins that may be involved in the molecular mechanisms of resistance is important both in terms of basic science and in terms of offering treatment options.

Doxorubicin is a common chemotherapeutic agent that is routinely used in the treatment of cancer, but also has an antibacterial effect. When this drug is given to a cell, it damages DNA and can cause the death of the cell. However, there are reports that the cancer cell can also develop resistance to this drug. The determination of the molecular targets of the drug and the identification of the genes that have a direct or indirect role in the development of resistance should be investigated in different cellular systems.

The aim of this thesis study is to find the gene candidates that provide resistance to the cell, and to achieve this, 4123 genes will be screened at increasing doxorubicin concentrations by using the bacterial cell as a model. Here, the ASKA clone set obtained by cloning the genes of *Escherichia coli* into an expression plasmid was used. This set, composed of 57 microplates, is a unique genomic source that allows to examine the relationship between the drug and 4123 genes in a different manner. Since the expression of each gene can be induced by IPTG, screening can be conducted at various expression levels. The approach is based on the following criteria. The clone that survives at the drug concentration in which the wild type dies is determined and the gene within the particular clone is considered to be related to resistance phenomena directly or indirectly.

In this study, first, the preliminary experiments with several different *E coli* wild-type bacterial strains were conducted and the concentrations that have bactericidal effect on the

strains were determined using minimum inhibitory concentration (MIC) experiments, growth curve experiments, spot tests and disc diffusion methods. Then, "genome-wide plasmid library" of 4123 clones was transformed into *E. coli* D10Hb strain by the heat shock method. Using concentration data obtained from optimization experiments, selection experiments were carried out with gradient cultivation, direct cultivation and enrichment in order to identify the clones that can live in environments with relatively high doxorubicin. Validation studies were carried out with 129 colonies that had doxorubicin tolerance. Then 34 colonies with the highest tolerance were selected. The gene sequences contained in the selected recombinant plasmids were determined by Sanger sequencing analysis. Using the sequences obtained, gene information was found by Blast analysis. As a result of the studies, it was determined that the genes in the plasmids of *E. coli* clones living at relatively high doxorubicin concentrations were *recA* (n = 23 clones) and *mdtK* (n = 11 clones). It has been discussed that these genes are involved in repairing DNA damage and expelling the drug out of the cell using Na⁺ channels. In addition, homologs of these genes in the human genome were searched.

This thesis study, approaching the topic of cancer from a different angle, where the bacterial cell is used as a model system has successfully analyzed the relationship between thousands of genes (n=4123) and a drug using molecular biology, microbiology and genomic disciplines and ended up in producing comprehensive, original and guiding results.

Key words: Doxorubicin, *Escherichia coli*, gene, genomics, *mdtK*, *recA*, resistance

1. GİRİŞ

Antrasiklin grubu ilaçlar, kanser tedavisinde kullanılan en önemli kemoterapik ajanlardan bir tanesi olarak bilinmektedir. Bunlar, DNA'ya interkalasyon yaparak, DNA heliks yapısını bozmaktadır. Bu şekilde, DNA replikasyonu ve transkripsiyonunu önlemektedir. Bunu DNA'nın guanin ve sitozin bazları arasına yerleşerek gerçekleştirmektedir (Rabbani ve ark, 2004).

Doksorubisin (Adriamycin^R), antrasiklin grubu, yani hem kemoterapik özelliğe, hem de antibiyotik özelliğe sahip olan, kanser tedavilerinde kullanılan, en etkili ilaçlardan bir tanesi olarak bilinmektedir. Birçok kanser türüyle mücadeledeki etkinliği nedeniyle, kemoterapide yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yüzden ve kırmızı renginden de dolayı “kırmızı kemo şeytan” olarak da adlandırılmıştır (Carvalho ve ark, 2009). Hücrelerin bu ilaca karşı nasıl bir cevap verdiği, hücrelerin direnç mekanizmalarının bilinmesi, sıklıkla tercih edilen bu ilacın daha etkin kullanılabilmesi için önem taşımaktadır.

Direnç mekanizmaları ile ilgili çalışmaları ökaryot hücreleri ile yapmak oldukça zor ve çok zaman almaktadır. Bu nedenle, araştırmalarda daha kolay ve hızlı bir yöntem planlamak önemlidir. Bazı çalışmalarda bakteriler veya diğer tek hücreli canlılar model organizma olarak kullanılmaktadır. Böylece spesifik anti-kanser veya anti-bakteriyel ajanlara karşı direnç mekanizmasında yer alan gen veya genleri daha kısa zamanda belirlemek mümkün olmaktadır.

İnsan hücreleri, bakterilerin oluşturduğu flora ile birlikte yer almaktadır. Bu flora, doğal direnç mekanizmalarından biridir. Bu nedenle flora, insanın fizyolojisi ve hastalığını büyük ölçüde etkilemektedir. Bununla birlikte, bakterilerin kemoterapötik ilaçlara verilen tepkiye katkısı ya da etkisi halen yeterince iyi anlaşılmamıştır. Örneğin, insan bağırsağında yaşayan bakteriler, çeşitli hastalıkların etiolojisinde rol oynamaktadır. Dahası, onlarca ilaç bağırsak mikrobiyomu unsurları tarafından metabolize edilmektedir ve insan sağlığı için başka etkileri de olabilmektedir. Bu nedenle, uygun model organizmalar kullanılarak, kemoterapik ilaçların, özellikle genler ve proteinlerle olan ilişkilerinin bulunması önemlidir.

Literatüre bakıldığında, geçmişte yapılan mikrobiyal genetik çalışmalarında, bir genin birçok fenotip için test edilmesi yaklaşımı esas alınmıştır. Ancak son yıllarda, genomik bilimlerin gelişmesiyle, bakteride bir fenotip için binlerce genin test edilmesi söz konusudur.

Bu tez çalışmasında, genomik yaklaşımla, binlerce *E. coli* geninin her birinin ayrı ayrı fazla ifadesinin (up-regülasyonunun), bir anti-kanser ajanı olduğu bilinen Doksorubisin toleransı üzerinde etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

Bu amaç doğrultusunda 4123 klonu içeren ASKA klon seti kullanılmıştır. Bu klon seti sayesinde her bir geni tek tek aşırı ifade eden klonlar, doksorubisin seleksiyonundan geçirilmiştir. *E. coli* bakterisinin doksorubisin ilacına karşı göstermiş olduğu tolerans seviyesi, seleksiyon kriteri olarak belirlenerek, bu toleransın üzerindeki konsantrasyonlarda üreme gösteren klonların seçilmesi ve bu klonlarda artmış toleransla ilişkili, olası genlerin belirlenmesi, çalışmanın temel prensibini oluşturmaktadır.

Öncelikle, çalışmalarda kullanılacak doksorubisin konsantrasyonları belirlenebilmesi için, *E. coli* bakterisinin doksorubisin ilacına karşı gösterdiği tolerans seviyesi, çeşitli optimizasyon çalışmaları ile tespit edilmiştir. Ardından, ASKA klon setinin içerdiği, genomdaki tüm genlerin ayrı ayrı plazmidlere klonlanarak oluşturulan plazmid gen havuzu *E. coli* DH10b suşuna transforme edilerek, DH10b ASKA gen havuzu elde edilmiştir. Bu klon kütüphanesi, Zenginleştirme (Enrichment), Direkt ekim, Gradient ekim gibi çeşitli seleksiyon yöntemlerinden geçirilerek, bir genin aşırı ifadesi ile ilişkili olarak tolerans seviyesi artan suşlar tespit edilmiştir. Yabani tip oranla daha yüksek toleransa sahip klonlardaki aşırı ifade edilen genlerinin tespit edilmesi için, rekombinant plazmidleri izole edilmiş, taşıdıkları insert genleri sekanslanmış ve gen dizilerine ulaşılmıştır. Gen dizileri, biyoinformatik teknikler kullanılarak değerlendirilmiş ve bu dizilerin aktivite bilgilerine ulaşılmıştır. Böylelikle *E. coli* bakterisinde doksorubisin direnç mekanizması ile ilişkili olduğu düşünülen genler belirlenmiştir.

ASKA setinin kullanılması ile bulunan genler üzerinden, biyoinformatik yaklaşımlar kullanılarak insanda doksorubisin direnci ile ilişkili olabilecek homolog genler yorumlanmıştır. Bu bilgi ışığında ilaçların daha etkin bir kemoterapi etkisi sağlaması açısından, bu direnci kırmaya yönelik türevlere çevrilebilmesi veya ek kombine ilaçların hedeflerinin belirlenmesinde faydalı olabilecek somut gen bilgileri literatüre kazandırılmıştır. İlerleyen bölümlerde bu tez çalışmasında başvuru strateji ve metodoloji, göreceli olarak daha detaylı bir şekilde ele alınarak sunulmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemoterapi ve Kemoterapik Ajanlar

Kemoterapi, ilk olarak 1900'lerde Alman doktor Paul Ehrlich tarafından kullanılmaya başlanmıştır. Kemoterapi terimi “sentetik olanlar başta olmak üzere, kimyasal maddeleri vücuttaki patojenik mikroorganizmaları imha etmek için kullanmaktır” şeklinde açıklanmıştır. Hayvanlar üzerinde bir dizi bileşik ile yapılan çalışmalar sonucunda, arsfenamin bileşiğinin kullanımıyla sifilis patojeninin tedavisinde başarılı olunmuştur (Ehrlich ve Hata, 1910; Ehrlich, 1911; Strebhardt ve Ullrich, 2008). Ancak bu yıllarda, gerek kimyasalların temini gerekse anlamlı etkiye sahip olanların tespit edilmesi ve bunlar ile klinik deneylerin gerçekleştirilmesi oldukça zor olmaktaydı. Zaman içerisinde ilaç olma olasılığı bulunan kimyasalların sayısının fazla oluşu ve her bir kimyasalın kanser hastaları üzerinde denenmesi mümkün olamayacağından, tümör modellerinin geliştirilmesine başlanmıştır. Bu modeller sayesinde, anlamlı antikanser ajanlar seçilebilmiş ve insanlar üzerinde kullanılmaya başlanmadan önce bu şekilde denenmişlerdir. Sarkoma 37 (S37), Sarkoma 180 (S180), Ehrlich Fare Karsinomu ve Ehrlich Assit Tümörü, bu yıllarda geliştirilmiş, nakledilebilir hayvan tümörü modellerine örnek olarak gösterilmiştir (Craigie, 1952; Worley ve Spater, 1952). Ancak, 1980'li yılların sonlarında daha pratik olan in vitro hücre hatları ile çalışılması tercih edilmeye başlanmıştır (Sausville, 2011).

Yirminci yüzyılın başlarında gerçekleşen birinci dünya savaşında, savaş sırasında kullanılan kimyasal silahların insanlar üzerindeki fizyolojik etkileri gözlemlendiğinde, ilgi çekici bilgiler elde edilmiştir. Savaş sırasında tesadüfi gözlemlerin kemoterapotik ajanlar hakkında bilgi edinilmesinde etkisi bilinmektedir. Bunlardan en belirgin örneklerden bir tanesi, ikinci Dünya savaşı sırasında İtalya'da gerçekleşen bir bombardımanda, denizcilerin hardal gazına (sülfür hardal) maruz kalması sonucunda, kemik iliklerinde ve lenf nodlarında atrofi gözlemlenmesidir (Gilman, 1946; Goodman ve Wintrobe, 1946). Bu gözlemlerin değerlendirilmesi ile hardal gazının dokularda hücre bölünmesini olumsuz etkilediği ve buna bağlı olarak bazı kanserlerin tedavisinde kullanılabileceği düşünülmüştür (Mattes, 1986). Bunun üzerine bilim adamları, Louis Goodman ve Alfred Gilman tarafından hardal bileşenleri üzerinde kemoterapotik etkilerin araştırılmasına başlanmıştır. Hardal bileşenlerinden biri olan mekloreタミン ile yapılan çalışmalarda, lenf tümörü üzerinde önemli ölçüde iyileşme gözlemlenirken, lenfoma hastalarında belirgin, ancak geçici bir etki gösterdiği kaydedilmiştir.

Yapılan bu çalışmalar ile mekloreタミン, antikanser etki sağladığı görülen ilk sitotoksik ajan olmuştur (DeVita, 2008; Galmarini, 2012; Morrison, 2010; Colvin, 2003; Gilman ve Philips, 1946; Goodman ve Wintrobe;1946).

Francis Crick ve James Watson'ın 1953'te DNA'nın çift sarmallı yapısını açıklaması ile (Watson ve Crick, 1953) kimyasalların etki mekanizmalarının anlaşılması için önemli bir adım atılmıştır. Kimyasalların DNA ile reaksiyona girmesi sonucunda hücrenin zarar gördüğü anlaşılmıştır. Bu bilgi yeni kemoterapotik ajanların geliştirilmesi için önemli bir bilgi olmuştur (Baguley, 2002).

Antineoplastik ajanlar olarak da adlandırılan kemoterapötik ajanlar, hızla büyüyen hücrelerin çoğalmasını doğrudan veya dolaylı olarak inhibe etmek için kullanılmaktadır. Kemoterapotik ajanlar, farklı özellik ve kriterlere göre çeşitli şekilde karakterize edilip sınıflandırılabilirler. Buna göre kemoterapik ajanlar kimyasal yapılarına, etki mekanizmalarına ya da elde edildikleri mikroorganizmalara göre sınıflandırılabilirler. Bu ajanlar içerisinde, sitotoksik kemoterapötikler, hücre döngüsünün herhangi bir evresinde, hücre fonksiyonların etkilenmesine neden olmaktadır. Hücre bölünmesinin inhibisyonu, apoptotik ya da nekrotik hücre ölümleri gibi mekanizmalar ile hücrelere zarar veren ajanlardır (Bezabeh ve ark, 2001; Ricci ve Zong, 2006).

Kemoterapotik ajanlar etki mekanizmalarına göre alkilleyici ajanlar, antimetabolitler, antimikrotübül ajanları ve sitotoksik kemoterapotikler olarak sınıflandırılmaktadırlar.

Bu tez çalışmasında kullanılan doksorubisin kemoterapotik ajanı, sitotoksik bir kemoterapoik ajan olup, topoizomera II inhibitörü olarak görev yapmaktadır. Ayrıca, etki mekanizması incelendiğinde antrasiklin grubuna dâhil olan bir kemoterapotik ajan olduğu görülmektedir (Weiss ve ark, 1992; Arcomone ve ark, 1969).

2.2. Sitotoksik Kemoterapotik Ajanlar

Sitotoksik antibiyotikler, çeşitli etki mekanizmalarına sahip ilaç gruplarıdır. Kemoterapi endikasyonlarında paylaştıkları ortak tema, hücre bölünmesini inhibe etmeleridir. En önemli alt grupları, antrasiklinler ve bleomisinlerdir (Stefan ve Rosenthal, 2008).

Antrasiklinler arasında doksorubisin ve daunorubisin kemoterapotik ajanları ilk bulunan ve *Streptomyces peucetii* bakterisinden elde edilen ajanlardır (Stefan ve Rosenthal, 2008b).

Bu bileşiklerin türevleri epirubisin ve idarubisindir. Antrasiklin grubunda klinik olarak kullanılan diğer ilaçlar pirarubisin, aklarubisin ve mitoksantrondur (Koeller, 1988).

Antrasiklinlerin etki mekanizmaları arasında DNA interkalasyonu ile (DNA'nın iki şeridi arasına yerleştirilen moleküller), hücreler arası moleküle bağlanarak, topoizomerez inhibisyonunu sağlayan yüksek oranda serbest radikallerin üretilmesi bulunmaktadır (Minotti, 2004).

Aktinomisin, DNA'yı birleştiren ve RNA sentezini önleyen karmaşık bir moleküldür (Sobell, 1985). *Streptomyces verticillus*'tan izole edilen bir glikopeptid olan bleomisin, aynı zamanda DNA'yı birleştirir, ancak DNA'ya zarar veren serbest radikaller üretir. Bu durum, bleomisin'in bir metal iyonuna bağlandığında, kimyasal olarak azaldığında ve oksijenle reaksiyona girdiğinde meydana gelir (Dorr, 1992; Airley, 2009). Mitomisin ise DNA alkilleme kabiliyetine sahip sitotoksik bir antibiyotiktir (Verweij, 1990).

2.3. Sitotoksik Kemoterapotik Ajanlar, Antrasiklinler

Antrasiklinler, *Streptomyces* bakterisinden elde edilen (Fujiwara, 1985) kanser kemoterapisinde kullanılan bir ilaç sınıfıdır (Trevor, 2010). Bu bileşikler, lösemi, lenfoma, meme, mide, uterin, yumurtalık, mesane kanseri ve akciğer kanseri gibi birçok kanseri tedavi etmek için kullanılmaktadır (Brunnberg ve ark, 2012).

İlk keşfedilen antrasiklin, bir aktinobakteri türü olan *Streptomyces peucetius* tarafından doğal olarak üretilen daunorubisin (ticari adı Daunomisin)'dir. Klinik olarak en önemli antrasiklinler doksorubisin, daunorubisin, epirubisin ve idarubisindir (Weiss ve ark, 1992).

Daunorubisin, 1960'ların başında keşfedilen kırmızı pigmentli bir ilaçtır. Di Marco ve arkadaşları tarafından *Streptomyces peucetius* suşundan izole edilmiştir. İtalya'daki Farmitalia Research Laboratories çalışanları bu ilaca daunomisin adını vermiştir (Dimarco ve ark, 1964). Aynı zamanda bu bileşik, Fransa'daki Dubost ve arkadaşları tarafından da keşfedilmiştir ve rubidomisin adı verilmiştir (Dubost ve ark, 1964). Farklı isimlendirmelerin yaratabileceği sorunların ortadan kaldırılması adına, Daunorubicin, bu kemoterapötik ajan için uluslararası isim olarak kabul edilmiştir (Weiss ve ark, 1992).

İlk antrasiklinlerin çok başarılı etkiler göstermesi ile birlikte, terapötik uygulamalarda kullanılmak üzere yeni analogların üretilmesi için zemin oluşturulmuştur. Öncelik olarak, dünya çapında kullanım için sadece epirubisin ve idarubisin kullanılmıştır. Epirubisin,

doksorubisine benzer bir aktiviteye sahiptir, ancak kardiyotoksik yan etkileri daha da azaltılmış bir ajandır (Arcamone ve ark, 1975). İdarubisin ise yağda çözünen bir daunorubisin çeşidi olup oral olarak biyoyararlı olduğu bildirilmiştir. Bu kemoterapötik ajanların başlangıçta, murin (faregillere ait tümörler) tümörlerine karşı aktiviteye sahip olduğu görülmüş ve daha sonra klinik çalışmalarda lösemi ve lenfomalara karşı aktif olduğu bulunmuştur (Weiss 1992; Arcamone ve ark, 1976).

Antrasiklinler şimdiye kadar geliştirilen en etkili antikanser tedaviler arasında yer almaktadır. Bu grupta yer alan ilaçların diğer herhangi bir kemoterapötik ajan sınıfından daha fazla kanser türüne karşı etkili olduğu bilinmektedir (Weiss ve ark, 1992; Minotti, 2004; Peng, 2005).

Antrasiklinler, en yaygın kullanılan kemoterapötik ajanların bazıları olmaya halen devam etmektedirler. Ancak potansiyelleri, doz sınırlayıcı toksisiteleri ile sınırlanmaktadır. Halen daha iyi anti-tümör etkinliği olan veya farklı nanoteknoloji tabanlı ilaç dağıtım sistemleri kullanılarak azaltılmış yan etkileri olan antrasiklinlerin araştırılması için birçok çalışma yürütülmeye devam etmektedir. Antrasiklin grubu ilaçlar, hücrede DNA metabolizması ve RNA üretimi ile etkileşim içerisindedirler. Sitotoksikite, temel olarak hücrede topoizomera II enzimlerinin inhibe edilmesinden kaynaklanmaktadır (Cagel ve ark, 2017; Poon ve Borys, 2009; Mukai ve ark, 2017; Nishiyama ve ark, 2016).

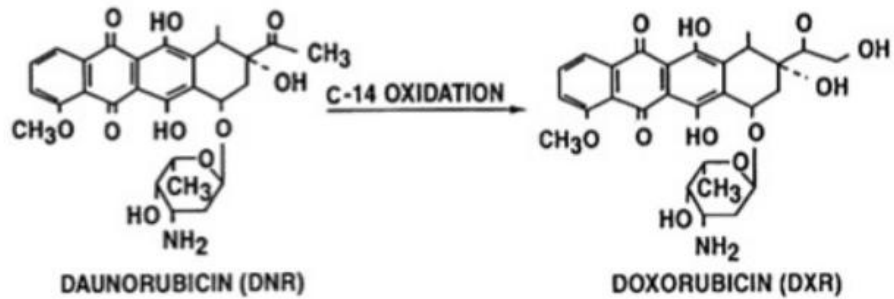
Antrasiklinlerin temel yapısı, bir glikosidik bağlantıyla bir şeker kısmına bağlanmış, antrakınon omurgasına sahip olan bir tetrasiklik moleküldür. Bir hücre tarafından alındığında, dört halka yapısı DNA baz çiftleri arasında birleşirken, şeker küçük oluk içine oturmakta ve bitişik baz çiftleri ile etkileşime girmektedir.

Mikro moleküller, kovalent veya DNA'nın baz çiftleri arasına aromatik grupların sokulmasıyla, kovalent olmayan etkileşimler sayesinde nükleik asitlerle etkileşime girebilmektedirler (Waring, 1981, Lerman, 1961). Bunun sonucunda lokal çözülme, uzama veya DNA'da bazı yapısal değişikliklere neden olabilmektedirler. Çoğunlukla DNA'nın genel yapısı korunurken, meydana gelen biyolojik fonksiyonlardaki değişiklikler interkalasyondan kaynaklanmaktadır (Lerman, 1961, Li ve Crothers, 1969, Waring, 1970). Bu birleşme sayesinde, terapötik uygulamalar geliştirilerek, kanser tedavisinde ayrıca çeşitli mikrobiyal enfeksiyonları tedavi etmede kullanılmıştır (Martínez ve Chacón-García, 2005). Örneğin; antrasiklin grubu Daunorubisin (doksorubisin öncüsü) interkalasyon sayesinde akut lösemide kullanılmıştır (Brunnberg, 2012).

İnterkalasyonun moleküler mekanizmasının araştırılması, 1960'lı yıllarda antrasiklin grubu ilaçlarında keşfedilmesiyle hız kazanmıştır. Fakat interkalasyonun DNA'nın doğal heliks yapısı ile mi yoksa ilaca bağlı boşluk oluşumuyla mı gerçekleştiği tam olarak anlaşılamamaktadır. Geçmişte yapılan çalışmalar, mekanizmanın DNA baz çiftlerinin birbirinden ayrılıp, boşluk vermeden gerçekleştiğini desteklese de tam olarak açıklanamamaktadır (Li ve Crothers, 1969). Literatüre bakıldığında, antrasiklin grubu ilaçların bağlanma bölgeleri tespit edilerek, yeni yaklaşımlar kazandırılmaya çalışılmıştır. Örneğin, Chaires JB ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Daunorubisin bağlanma bölgesinin, 5'ATGC ve 5'ATCG dizilerinin sonunda bulunduğu tespit edilmiştir (Chaires ve ark, 1990).

2.4. Doksorubisin

1960'lı yıllarda ilk bulunan antrasiklin grubu ilaçlardan olan Doksorubisin, mutasyona uğramış bir *S. peucetius* varyantından (var. *caesius*) izole edilmiştir. Daunorubisin'den sadece karbon 14 pozisyonunda bir hidroksil grubunun eklenmesiyle ayrıldığı görülmektedir (Şekil 1). Bu modifikasyon, ilacın aktivitesini, çok çeşitli katı tümörlere, lösemi ve lenfomalara karşı oldukça etkili kılan, büyük ölçüde değişikliğe sebep olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Arcamone ve ark, 1969; Blum ve Carter, 1974; Minev, 2011; Takemura ve Fujiwara, 2007).



Şekil 1. Daunorubisin ve Doksorubisinin moleküler yapıları

DNA replikasyonunda, helikaz enziminin açtığı DNA zincirinde katlanmalar meydana gelmektedir. Bu aşırı katlanmış DNA zincirinin açılması ve düz bir hale gelerek tekrar kapanmadan replikasyonun devam etmesi gerekmektedir. Karmaşık bir yapı halinde katlanmış DNA zincirini uygun noktalardan keserek, stresi ortadan kaldıran enzim grubu topoizomerazlardır. Tirozinler, topoizomerazların aktive edilmesinde görev almaktadır.

Doksorubisin, tirozinlere bağlanıp ara bir bileşik oluşturarak, topoizomerazların aktive edilmesini engellemektedir. Topoizomerazlar, görevini yerine getiremediği yani inhibe edildiği zaman, hücrede stres oluşturan bu karmaşık yapı çözölememektedir. Böylece replikasyon ve devamında transkripsiyon sürdürölememektedir. Ayrıca, karmaşık yapının çözölememesiyle birlikte DNA sarmalı koparak, DNA hasarı meydana gelmektedir. DNA hasarı meydana geldikten sonra p53 proteini translasyonu artmaktadır. Devreye giren p53, tamir edilemeyecek vaziyette olan hücreyi apoptoza götürebilmektedir (Woods ve Vousden, 2001). Yani doksorubisin kanserli hücreye hedeflendirildiği zaman apoptoza neden olmaktadır.

2.5. Kemoterapotik Ajanların Geliştirilmesi ile Kanser

Kanser günümüzde çok yaygın olarak görölen hastalıklar arasında yer almaya başlamıştır. Gelişmiş ölkelerde her üç kişiden birini etkilediği bilinmekte ve kardiyovasküler hastalıklar ile birlikte ölümlerin önde gelen iki nedeni olarak rapor edilmektedir.

Antrasiklinlerin kanser-malign neoplazmların kemoterapisinde kullanılması, kanser tıbbının en büyük başarılarından biri olmuştur. Örneğin; çocukluk çağı kanserinde, kanserin ilk 5 yılında sağ kalım oranları 1960'larda %30 civarındayken, antrasiklin grubu ilaçların kullanılmasıyla günümüzde bu oranın %70'lere çıktığı görölmektedir (Gatta ve ark, 2002; Jemal ve ark, 2006).

Kanser sonuçları, erken teşhis ve daha yeni hedeflenen tedaviler nedeniyle iyileşmeye devam etmekte olup, antrasiklin kemoterapisi, kanser tedavisinin modern çağında önemli bir rol oynamaktadır. Doksorubisinin öncüsü olan daunorubisin'den şans eseri keşfedilmesi, kanser tedavilerinde bir dönüm noktası olmuştur (Rimal ve ark, 2015). Antrasiklinler Dünya Sağlık Örgütü (WHO) temel ilaçların model listesinde yer almaktadır (WHO, 2015). Keşfedilmesinden elli yıl sonra, antrasiklin anti-tümör ve kardiyotoksik mekanizmalar, temel bilim ve klinik denemeler araştırmalarına büyük ilgi göstermeye devam etmektedir.

Yeni biyolojik ve küçük moleküllu tedaviler, son 15 yılda birçok kanser için tedavi görünümünü çarpıcı bir şekilde geliştirmiştir (Kantarjian ve ark, 2002; Richardson ve ark, 2005; Slamon ve ark, 2001). Bu yeni gelişmelerle birlikte, antrasiklin kemoterapi rejimlerinin halen birçok kanser tedavisinde önemli rol oynadığı görölmektedir. Örneğin, meme kanseri hastalarının %32'si (Giordano ve ark, 2012), yaşlı lenfoma hastalarının %57 ila %70'i (Nabhan ve ark, 2015; Chihara ve ark 2016) ve çocukların %50 ile %60'ının bir antrasiklin

rejimi ile tedavi edildikleri bildirilmiştir (Smith ve ark, 2010; Armstrong ve ark, 2016, Patnaik ve ark, 2011).

Kemoterapötik ajanların geliştirilmesi ile kanser hastalıklarından sağ kalımlarda oran %5; meme, lenfoma, melanom ve uterus kanserlerinde yaklaşık %80 ve daha yüksek oranlara yükselmiştir. Bu oranlar değerlendirildiğinde, gelişmiş ekonomilerde hayatta kalma oranlarında yüksek seviyede bir artış olduğu görülmektedir (Coleman ve ark, 2011). Birleşik Krallık'ta, hayatta kalma eğilimleri kemoterapi ile birlikte son 40 yılda yetişkinlerde ikiye katlanmış ve 1960'lardan bu yana çocuklarda ise üçe katlandığı rapor edilmiştir (CancerResearchUK, 2012).

2.6. Doksorubisin ile Tedavilere Yaklaşım

30 yılı aşkın süredir kullanılan doksorubisin, karsinomalar, sarkomlar ve hematolojik kanserler gibi birçok kanser türüyle mücadeledeki etkinliği nedeniyle, kemoterapide yaygın olarak kullanılmaktadır (Carvalho ve ark, 2009). Kitle tümörlerinin (özellikle meme kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri, yumurtalık kanseri vb) tedavisinde kullanılan en etkili ilaçlardan birisidir. Ayrıca idrar torbası, mide, karaciğer, tiroid, yumuşak doku sarkoması, nöroblastoma, myeloma, birçok çeşit lösemi, T-hücre lenfoma ve çeşitli kemik tümörlerine karşı da etkili bir aktiviteye sahiptir (Cortes-Funes ve ark, 2007). Doksorubisinin, DNA'ya interkalasyon yaparak, sitotoksik etkisini, çoklu moleküler hedefleri etkileyerek gerçekleştirmektedir (Tacar ve ark, 2013).

Pek çok ilaç gibi, doksorubisin de pasif difüzyon yoluyla hücrenin içine girerek, çoğunlukla karaciğerde birikime uğramakta ve orada metabolize edilmektedir. Ayrıca, doksorubisin'in kemik iliği ve beyaz kan hücrelerindeki konsantrasyonunun, plazmadan 200-500 kat daha fazla olduğu bilinmektedir. Dokulara oldukça etkili bir şekilde nüfuz etme kabiliyetine sahip olan doksorubisinin, terminal yarılanma ömrü 12-18 saat olarak bilinmektedir. Bu da ilacın alımına istinaden, dokudan uzaklaştırılmasının çok daha uzun sürdüğünü göstermektedir. Doksorubisin, dokulara hızla dağıtıldığından, bu dağıtım hızı, kandaki doksorubisin seviyelerinin hızlı düşmesi ile uyumaktadır. İlacın kararlı dağılımı toksisite riskini azaltmak için şarttır. Bu nedenle dozajlama çok büyük önem taşımaktadır (Tacar ve ark, 2013).

Tümörlerin ilaca direnç (MDR-multi drug resistance) kazanması, genellikle kanser tedavisinde başarısızlığa neden olabilmektedir. Bu yüzden tedavilerde mümkün olan en düşük

ilaç konsantrasyonu tercih edilmektedir. Yapılan bir çalışmada, 5 farklı doksorubisin türevi hazırlanarak, MCF-7/ADR hücresi (doksorubisine dirençli göğüs adenokarsinomu) üzerinde etkinliği incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, en umut verici doksorubisin türevi olan (DOX-N2H-Palm konjugat), doğal doksorubisine göre 4 ile 10 kat daha fazla etkili olduğu görülmüştür. Aynı zamanda IC50 değerini, 32.9 μ M'den 16.8 μ M'a düşürdüğü bulunmuştur. Bu doksorubisin türevi, belirtilen aktiviteyi palmitik asite bağlanarak gerçekleştirmektedir. Doksorubisin yapısına, palmitik asit konjugatı eklenince, hücre meydana getirilmiş bu yeni ilaç kompleksini kendindenmiş gibi görüp, ona direnç göstermemektedir (Akasov ve ark, 2017).

2.7. Doksorubisin Direnci ile İlişkili Mekanizmalar

Doksorubisin, farklı kanserlerin tedavisinde kullanılan en önemli kemoterapötik ajanlardan biri olarak kabul edilmektedir. Buna rağmen, doksorubisin ile gerçekleştirilen kemoterapide çeşitli mekanizmalar direnç gösterebilmektedir. Mekanizmalar tam olarak çözülebilmiş olmasa da, araştırmalar doksorubisin direncinin gelişiminin çeşitli faktörlere bağlı kaynaklanabileceğini göstermektedir. Kemoterapi başlangıcında bu direnç görülebildiği gibi, bazı tümörler tedaviye cevap vermesine karşılık, ilerleyen tedavi sürecinde direnç gösterebilmektedir.

Çeşitli kanser ilaçlarına ve doksorubisine karşı direnç, başta çoklu ilaç direnç proteinleri (Multi Drug Resistance-MDR) olmak üzere, p53 ekspresyonu, NF-kB ekspresyonu, FOXO3 ekspresyonu ve mikroRNA'lardaki MAP kinase ekspresyonu gibi diğer mekanizmalarla gerçekleşebilmektedir (Mansoori ve ark, 2017).

MDR, ABC taşıyıcı ailesinin belirli üyelerini kullanarak ilaçlara direnç sağlamaktadır (Borst ve ark, 2000). ATP'ye bağlı olarak taşıma işlemini gerçekleştiren MDR mekanizması, bu işlevini hücre içi çoklu ilaç taşıma proteinlerini (MRP1-MRP9) ve hücre dışı P-glikoproteinleri kullanarak gerçekleştirmektedir (Schinkel ve ark, 1993, Roy ve ark, 2015).

Bunlara ek olarak diğer mekanizmalara baktığımızda, önemli bir transkripsiyon faktörü ve hücre döngüsünün durdurulmasında görev yapan FOXO3'ün doksorubisin ile tedavi edilen meme kanseri, akciğer kanseri gibi kanserlerde biriktiği, böylece doksorubisin duyarlılığı ile ilişkilendirildiği görülmüştür. (Farhan ve ark, 2017) Bu nedenle, artan FOXO3 ekspresyonu doksorubisine karşı bir direnç olarak değerlendirilmektedir (Hui ve ark, 2008).

Tümör baskılayıcı bir gen olarak bilinen p53, DNA hasarını algılayıp, Bax ve Bak gibi çeşitli apoptoz faktörlerini uyararak, Bcl-2 gibi antiapoptotik faktörleri baskılamaktadır (Ryan ve ark, 2001). Amerika’da Uluslararası Kansere Enstitüsü’nde (National Cancer Institute) 60 hücre hattında, 100 kanser ilacı ile yapılan bir çalışmada sitotoksik ilaçlar ile p53 mutasyonu arasında bir ilişki olduğu tespit edilmiştir (Wang Z ve Sun Y, 2010). Yapılan çeşitli çalışmalarda mutasyona uğramış p53’ün aşırı ekspresyonu doksorubisin gibi sitotoksik ilaçlara karşı direnç gösterme eğiliminde olduğu bildirilmiştir (Hientz ve ark, 2017).

PI3K/Akt yolağı hücre ölümü ve apoptozisin baskılanması gibi durumlarda görevli olup, doksorubisine karşı dirençli olan kanserlerde bu yolağın aktivitesinin arttığı görülmektedir (Zhang ve ark, 2011). Kodlama yapmayan miRNA’ların bir kısmı doksorubisine duyarlılığıyla ilişkilendirilirken, bir kısmı direncin artışıyla ilişkilendirilmektedir (Tormo ve ark, 2015). MAP kinaz yolağının bir aktivatörü olan EGFR inhibisyonu, doksorubisine karşı artan hassasiyet ile ilişkilendirilmiştir (Manov ve ark, 2011).

2.8. Kansere Etki Mekanizmalarının Belirlenmesinde Moleküler Tekniklerin Kullanılması

Direnç mekanizmaları ile ilgili çalışmalar yapmak, ökaryotik hücrelerde ile çok zaman almaktadır. Bu nedenle araştırmalarda daha kolay ve hızlı bir yöntem planlamak önemlidir. Bazı çalışmalarda bakteriler veya diğer tek hücreli canlılar, model organizma olarak kullanılmaktadır. Örneğin; *Stenotrophomonas maltophilia*’da bulunan, ilaçlara karşı direnç gösterdiği düşünülen *smrA* geni, *E.coli* SM1411 suşuna transforme edilerek, gen ekspresyonu sonucu çeşitli ilaçlar ile ilişkisi çalışılmıştır (Al-Hamad ve ark, 2009). Böylece spesifik anti-kanser veya anti-bakteriyel ajanlara karşı direncin kazanılmasında veya oluşmasında rol oynayan gen veya genleri avlamak daha mümkün olmaktadır. Bu amaç için *E.coli* bakterisi en çok kullanılan bakterilerden biridir.

Escherichia coli K-12, moleküler biyolojide en iyi karakterize edilmiş organizmalardan biri olduğundan dolayı, mikrobiyolojik ve moleküler çalışmalarda model organizma olarak tercih edilmektedir. Bu bakteri, çubuk şeklinde, 0,1-0,5 µm çapında ve yaklaşık 1-2 µm uzunluğunda olan gram negatif bir bakteridir (Fux ve ark, 2005).

Organizmaların moleküler düzeyde araştırılması için birçok teknik geliştirilmiştir. Bu gelişmeler ile birlikte, genom dizilerinin kullanımı ön plana çıkmıştır. Böylelikle, kimyasallar

tıpta kullanılan ilaçlar ve birçok etken maddenin hücre ile etkileşimleri sadece fizyolojik düzeyde kalmayıp, gen-genom boyutunda araştırılabilir hale gelmiştir. *Escherichia coli* bakterisinin MG1655 (Blattner ve ark, 1997) ve W3110 (Hayashi ve ark, 2006) suşlarının tüm genom dizilerinin açığa kavuşturulması ile bu suşlar genom dizi çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır. *E.coli* K-12 MG1655 suşunun genomu 4,639,221 baz çifti uzunluğundadır. Bu genomda, protein kodlayan, 4288 genin bulunduğu rapor edilmiştir ve %62'sinin fonksiyonu bilinmekte iken %38'inin fonksiyonu henüz bilinmemektedir (Blattner ve ark, 1997). *E.coli* bakterisi, kapsamlı moleküler, genomik ve proteomik çalışmaları için ideal bir organizmadır.

Günümüzde kanser için doğal tedaviler adı altında da birtakım öneriler sunulmaktadır. Var olan bu önerileri bilimsel gerçeklerle desteklemek veya çürütmek hem canlılar hem de bilimin geleceği açısından büyük önem taşımaktadır. Örnek vermek gerekirse; Zerdaçal'ın kanser tedavisine katkı sağladığı düşünülmektedir. Literatüre bakıldığında Xanthorizol'in farmakolojik aktivitesinin olup, anti-kanser kullanımda uygun olduğuna yönelik çalışmalar bulunmaktadır (Oon ve ark, 2015). Xanthorizol, zerdaçalın rizomundan izole edilen güçlü bir antimikrobiyal bileşiktir. Ancak mekanizması henüz aydınlatılamamıştır. Muhtemel hedefleri taramak için ASKA seti plazmid kütüphanesi havuzu oluşturulmuş ve zenginleştirme (enrichment) ile artan Xanthorizol konsantrasyonlarında dirençli klonlar seçilmiştir. DNA sekans analizi ile dirençli klonların içerdiği genler belirlenmiş ve literatüre sunulmuştur (Yogiara, 2015). Bu kapsamda bu ilaç için hedef olan esansiyel bir gen, *tadA*, bilim dünyasına kazandırılmıştır.

2.9. ASKA (A Complete Set of *E. coli* K-12 ORF Archive)

E. coli K12 suşu'nun genom sekans datası temel alınarak, fonksiyonel genomik analizler için, bireysel genleri kodlayan klonların bir seti oluşturulmuştur (Kitagawa ve ark, 2005). Başlama ve sonlanma kodonları hariç tahmin edilen ORF'ların herbiri PCR ile çoğaltılıp, multicopy plazmid vektörünün (pCA24N) içine klonlanmıştır. Her ürün, N-terminal ucunda Histidin-tag içermektedir. Klonlanan genlerin ekspresyonu, IPTG tarafından aktive edilen, fakat normalde *cis* kısmında içerdiği LacI^q tarafından baskılanan, pT5-lac promotorü ile yönetilmektedir (Kitagawa ve ark, 2005). Bu şekilde, ASKA klon setinde, 4123 adet gen pCA24N vektörüne başarıyla klonlanmıştır. Hücrelerin büyütülmesi için, kloromfenikol içeren Luria-Bertani (LB) besi yeri kullanılmıştır. Klonlanan genlerin ekspresyonu için, 0,1 mM Isopropyl-b-D-thiogalactoside (IPTG) kullanılması önerilmiştir (Kitagawa ve ark, 2005).

E. coli ORF (open reading frame)'larının arşivinin toplu bir seti olarak oluşturulan bu klon setinin (ASKA (A Complete Set of *E. coli* K-12 ORF Archive)) direnç genlerinin araştırılmasında kullanıldığı görülmektedir.

Bu tez çalışması ile doksorubisin kemoterapotik ajanının hücrede etkisinin araştırılması ve bulunan yeni bilgi ve hipotezlerin literatüre kazandırılması amaçlanmıştır. Doksorubisin ilacının hücrede hangi genler ile etkileşim içerisinde olduğunun tespit edilmesi ileride düzenlenecek yeni ilaçların da yapılabilmesi için önemli bilgiler sunmaktadır. Bu amaç doğrultusunda, *E.coli* bakterisinin 4123 geninin doksorubisin içeren ortamlarda değerlendirilmesi ile hücreye tolerans kazandıran genlerin tespiti gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışması, binlerce genin doksorubisin ile muhtemel ilişkisini irdeleyen kapsamlı ve orjinal bir tez çalışmasıdır.

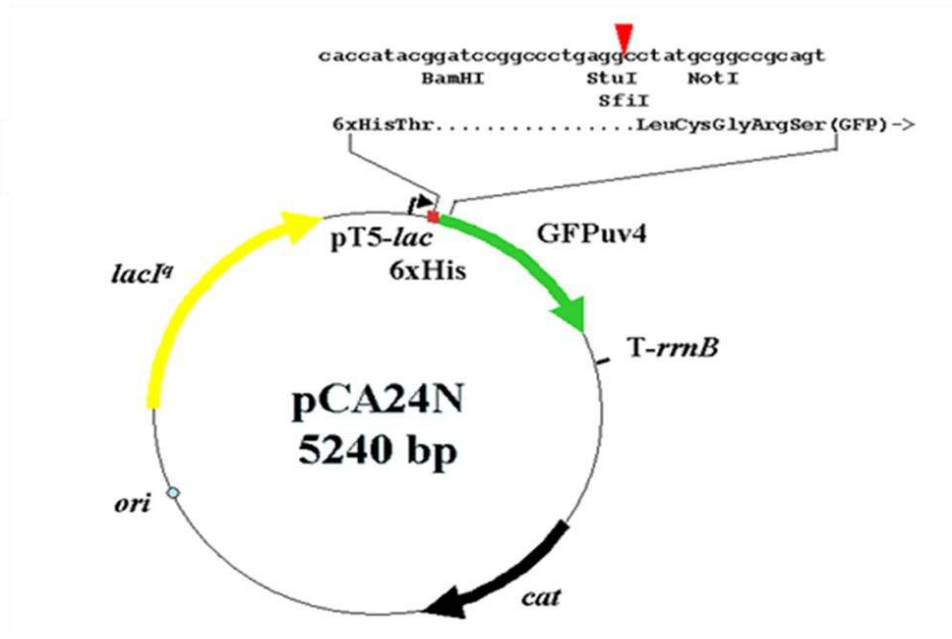
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

Bu tez çalışmasında kanser tedavisinde kullanılan ve önemli kemoterapik ajanlardan biri olan doksorubisin ilacı ve moleküler biyoloji çalışmalarında tercih edilen *E.coli* bakterisi temel gereçlerimizi oluşturmaktadır. Bunların yanı sıra laboratuvarımızın bünyesinde bulunan birçok cihaz ve kimyasal kullanılarak tez tamamlanmıştır. Detayları başlıklar halinde açıklanmıştır.

3.1.1. ASKA Klon Seti

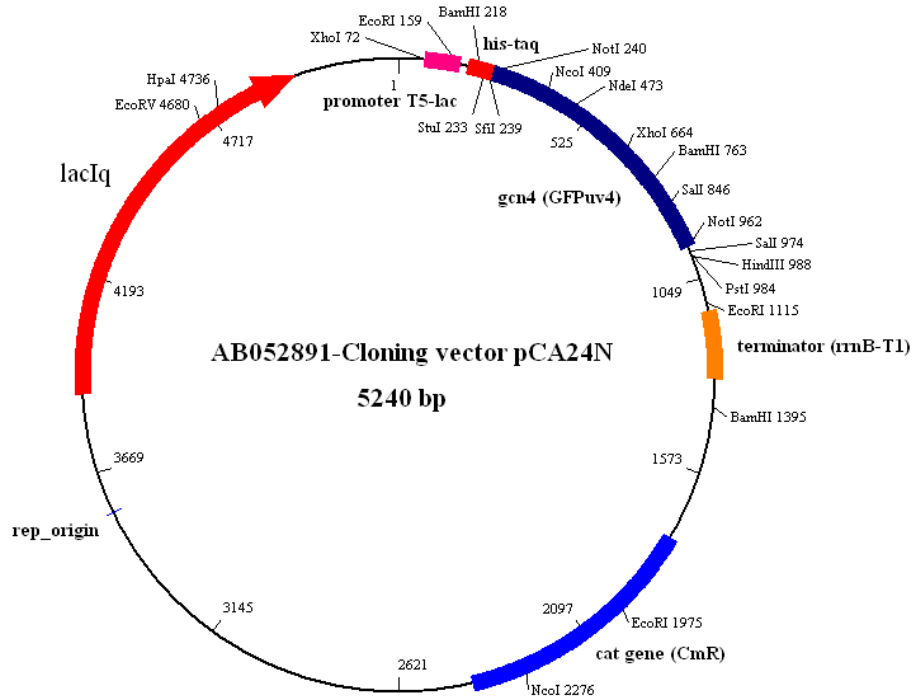
ASKA (A Complete Set of *E. coli* K-12 ORF Archive) *E. coli* suşuna ait ORF (open reading frame)'lerinin arşivinin toplu bir setidir. Bu set, *E.coli* bakterisine ait 4123 adet genin tek tek PCR ile çoğaltılarak vektörlere klonlanması ile oluşturulmuştur. Bunun için kullanılan vektör pCA24N plazmididir. Bu vektör de ORF (open reading frame)'ler *StuI* restriksiyon endonükleaz tanıma bölgelerine klonlanmıştır ve rekombinant pCA24N plazmidleri oluşturulmuştur (Şekil 2) (Kitagawa ve ark., 2005). Bu tez çalışmasında, 4123 genin her birinin aşırı ifade edilmesi ile bakterinin doksorubisin toleransında artış olup olmadığı taranmıştır ve bu set kullanılarak *E. coli* doksorubisin direnç genleri tespit edilmiştir.



Şekil 2. pCA24N klonlama plazmid ve klonlama bölgesinin gösterilmesi.

3.1.2. Kullanılan Plazmid

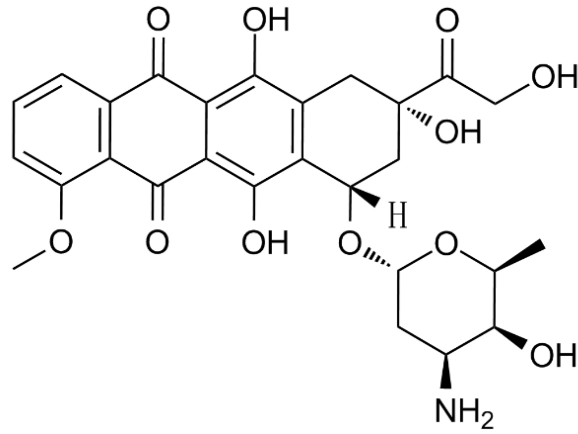
Deneylerde pCA24N plazmidi kullanılmıştır. Bu plazmid, pMB1 replikasyon orijinininden modifiye edilmiştir. Kloromfenikol direnç kasedi (Cm^R) taşımaktadır. Bu vektöre klonlaması gerçekleşen ORF (Open Reading Frame) bölgesi, IPTG tarafından indüklenen T5-*lac* promoter tarafından kontrol altındadır (Şekil 3). Ayrıca yüksek kopya sayısına sahip bir plazmidir (Kitagawa ve ark, 2005).



Şekil 3. pCA24N plazmid haritası.

3.1.3. Kullanılan İlaç

Bu tez çalışmasında, Doksorubisin (Goldbio #Cat No: D-490-1) ilacı kullanılmıştır. Hidroksidaunorubisin, adriamisin gibi farklı isimlerle de bilinen Doksorubisin, kanser kemoterapisinde sıklıkla kullanılan ilaçlardan biridir. Bu ilaç 543,52 g/mol molar kütleline sahip, yarılanma ömrü 12–18.5 saat olan bir kimyasaldır (Boucek ve ark 1987). Kimyasal formülü C₂₇H₂₉NO₁₁ olarak bilinmektedir (Şekil 4).



Şekil 4. Dokсорubisin kemoterapotik ajanının moleküler yapısı.

3.2. YÖNTEM

Tez çalışması boyunca birçok mikrobiyoloji ve moleküler biyoloji tabanlı tekniklerden yararlanılmıştır. Öncelikle kullanılacak olan dokсорubisin konsantrasyonunu belirlemek adına çeşitli optimizasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bunun için MIC (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) Yöntemi, Büyüme Eğrisi, Disk Difüzyon Yöntemi ve Spot testleri kullanılmıştır. Ardından toleranslı kolonilerin tespiti için de Zenginleştirme (Enrichment) ile seleksiyon yöntemi, Direkt Ekim ile Seleksiyon Yöntemi, Gradient ile Seleksiyon Yöntemi, Çizgi Ekim ile Seleksiyon Yöntemi gibi farklı tekniklerden yararlanılmıştır (Wilkinson ve ark, 2003; Zgoda ve ark, 2001; Zwietering ve ark., 1990). Her bir teknik için kendi içerisinde optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

3.2.1. Çalışmada Kullanılması Planlanan Dokсорubisin Konstrasyonunun Belirlenmesi

Çalışma için yapılan literatür taramaları sonucu dokсорubisin konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla optimizasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bunun için MIC yöntemi, büyüme eğrisi, disk difüzyon yöntemi ve spot testleri yapılmıştır.

3.2.1.1. MIC Yöntemi

Mikroorganizmaların ilaçlara karşı duyarlılığının belirlenmesinde kullanılan en önemli yöntemlerden birisi MIC (minimum inhiye edici konsatrasyon) olarak bilinmektedir. Bu tez çalışmasında, *E.coli*'deki dokсорubisin direnç genlerini bulmak amacıyla literatür ışığında

belirlenen 0, 2, 5, 10, 12, 15, 17, 20, 25, 30, 40, 50 µg/ml 12 farklı doksorubisin konsantrasyonları belirlenmiştir. Bunun için 96 well plakalara 200'er µl LB-cm besi yeri dağıtılmıştır. Ardından, her bir kuyucuğa belirtilen konsantrasyonlarda doksorubisin eklenmiştir. MIC için ASKA klon setinden rastgele seçilen *cobT*, *asr*, *cha*, *yieL* suşları kullanılmıştır. Her bir kuyucuğa OD₆₀₀ 0,5 olacak şekilde bakteri suşu eklenmiştir. 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Her gün OD₆₀₀ ölçümü yapılarak değerlendirilmiştir.

3.2.1.2. Büyüme Eğrisi

Büyüme eğrisi, sıvı besi yerinde bakterilerin üreme döngüsünü izlemek ve optimizasyon yapabilmek amacıyla çalışılan önemli yöntemlerden biridir. Bu tez çalışmasında, doksorubisin içeren ortamda inkübasyon devam ederken her saat, bakterilerin McFarland (McFarland, 1907) değerleri ölçülüp kaydedilerek, bakterilerin doksorubisinli ortamdaki büyüme dinamikleri gözlemlenmiştir. 50 mg/ml doksorubisin stok konsantrasyonundan 0; 16; 32; 48; 64; 96; 128; 256; 512 µg/ml olacak şekilde kullanılmıştır. 50 µg/ml konsantrasyonunda kloramfenikol içeren 5 ml LB sıvı besi yerine McFarland 0,5 olarak ayarlanmış suşlardan 1 ml eklenerek, 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde inkübsayona bırakılmıştır. Bu çalışmada, ASKA kütüphanesi (pooled library) ve negatif kontrol olarak *E.coli* W3110 suşları kullanılmıştır. Doksorubisin renkli bir ilaç olduğu için, kontrol olarak bakteri içermeyen tüplerde aynı konsantrasyonlarda doksorubisin için ölçüm yapılmıştır. Doksorubisin sıvı besi yerinde kalıntı bıraktığı için McFarland ölçümleri direkt ve vorteksenerek gerçekleştirilmiştir. Büyüme eğrisi ölçümleri 1'er saat aralıklarla yapılarak kaydedilmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.2.1.3. Disk Difüzyon Yöntemi İle Doksorubisin Direnç Seviyelerinin Belirlenmesi

Antimikrobiyal duyarlılık testleri arasında yer alan, Kirby-Bauer tarafından geliştirilen ve kendi isimleriyle de anılan “disk difüzyon testi” uygulaması basit ve ucuz bir yöntemdir (Brown ve Kothari, 1975). Kâğıt disklere emdirilen ilacın, duyarlılığı araştırılan organizmanın inoküle edildiği besi yerine difüze olmasıyla, duyarlılığın/eşik değerin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu tez çalışmasında, ASKA suşu ve kontrol olarak *E.coli* DH10b suşu kullanılmıştır. Deneyde kullanılacak olan tek koloni ekimi halinde bulunan ASKA suşu 50 µg/ml konsantrasyonunda kloramfenikol içeren 5 ml LB, DH10b suşu ise 5 ml LB sıvı besi yerinde gece boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Disk difüzyon yönteminde top agar

(%0,7) kullanılmıştır. Gece boyunca büyüyen örneklerin McFarland değeri 0,5 olarak ayarlanmıştır. Ardından örneklerden 150 µl alınarak 3 ml top agara eklenmiştir. Elde edilen karışım hafif vorteks yapıldıktan sonra IPTG'li (100 µm) ve IPTG'siz 50 µg/ml konsantrasyonunda kloramfenikol içeren LB ve LB katı besi yerlerine eklenmiştir. Top agarın homojen yayılması için petri sekiz çizir gibi hareket ettirilmiştir. 1 mg/ml konsantrasyonda DMSO ile çözülerek hazırlanan doksorubisin 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 16 µg/ml konsantrasyonlarda 20 µl olacak şekilde disklerle emdirilmiştir. Pozitif kontrol olarak 2 mg/ml Ampisilin, negatif kontrol olarak ise DMSO eklenmiştir. Emdirilen diskler yaklaşık 20 dk sonra agarın üzerine yerleştirilmiştir. 37°C'de gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.1.4. Spot Testi ile Doksorubisin Direnç Seviyelerinin Belirlenmesi

Bu test genellikle farklı ortamlardaki bakteri hücrelerinin büyüme hızını kontrol etmek veya mikroorganizmaların seri seyreltme testlerini yapmak için kullanılmaktadır (Thomas ve ark, 2015). Optimizasyon için kullandığımız bu yöntemde *E. coli* bakterisinin DH10b(pCA24N), W3110(pCA24N) ve P34G8 AG1(pCA24N::aceK) suşları kullanılmıştır. Gece boyu inkübasyon sonucu büyümüş suşlardan OD₆₀₀ 0,5 olacak şekilde, 200 µl alınarak 1/1 dilüsyonlu tüplere aktarılmıştır. 2 ml'lik ependorf tüplere 100'er µl 1X steril PBS eklenmiştir. Ekim yapılmadan önce seri dilüsyonlarla 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/16'lık bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Her bir ependorf tüpten, 5 farklı dilüsyondan (1/1, 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/16) 5'er µl alınmış ve petrilerdeki besi yerlerine noktalar şeklinde ekim yapılmıştır. Ekimler 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 µg/ml konsantrasyonlu doksorubisin ve 50 µg/ml konsantrasyonunda kloramfenikol içeren içeren LB katı besi yerine yapılmıştır. Gece boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Her gün örneklerin büyüme durumu gözlemlenmiştir. 5 gün inkübasyon sonucunda üreme olup olmadığına bakılarak bakterilerin doksorubisin toleransları değerlendirilmiştir. Son olarak, bakteri gelişimleri not edilmiş ve fotoğraf çekilmiştir.

3.2.2. DH10b(pCA24N) Suşunun Eldesi

Yapılan optimizasyon deneylerinden elde edilen sonuçlara bakarak, seleksiyon çalışmalarının DH10b suşunda gerçekleştirilmesi uygun görülmüştür. ASKA kütüphanesi suşları ve suşlara ait plazmid havuzu laboratuvarımızda stok halinde bulunmaktadır. Bunun için ASKA plazmid havuzunun DH10b suşuna transformasyonu yapılmış ve seleksiyon

alışmalarında bu havuzun kullanılmasına karar verilmiştir. Ayrıca kontrol olarak gerekli olan DH10b(pCA24N) suşu oluşturulmuştur. Bunun için öncelikle CaCl₂ yöntemi kullanılarak (Dagert ve Ehrlich, 1979). Kompetant *E.coli* DH10b suşları elde edilmiştir. Ardından pCA24N plazmidi, ısı şoku (Heat Shock) yöntemi ile DH10b suşu içerisine transforme edilmiştir.

3.2.2.1. Kompetant DH10b suşlarının eldesi

Hücreler, transformasyon için CaCl₂ kompetant yöntemi (Dagert ve Ehrlich, 1979) ile kompetant hale getirilirken, ilk olarak stoktan tek koloni ekimleri yapılmıştır. Ertesi gün tek düşen koloniden kürdan ile 5 ml LB sıvı besi yerine inokule edilmiştir. Gece boyunca 37°C’de inkübasyona bırakıldıktan sonra, 1 ml’si 50 ml LB besi yerine aktarılmıştır. OD₆₀₀ değeri 0,3-0,4 aralığına geldiğinde 50 ml steril falkon tüpe aktarılmıştır. Ardından 5000 rpm’de 5 dakika +4°C’de santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısımları atılmıştır. Buzun üzerinde pellete 12 ml 0,1 M MgCl₂ eklenerek çözölmüştür. Ardından 5000 rpm’de 5 dakika +4°C’de santrifüj yapılmıştır. Süpernatant kısımları atıldıktan sonra pellet, 12 ml 0,1 M CaCl₂ eklenerek çözölmüştür. Tekrar 5000 rpm’de 5 dakika +4°C’de santrifüj yapılmıştır. Süpernatant kısmı atıldıktan sonra pellet, 2,15 ml CaCl₂ ve 350 µl %100 gliserol eklenerek stok haline getirilmiştir. Stoklar 1,5 ml ependorf tüplere ayrılmış ve -20°C’de saklanmıştır.

3.2.2.2. Isı şoku (heat shock) ile transformasyon

Kompetant DH10b suşları elde edildikten sonra, bu hücrelere 1 µl plazmid eklenip, sırasıyla; 30 dakika buz üzerinde, 2 dakika 42°C’de, 2 dakika tekrar buz üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra, hücrelerin üzerine 1 ml LB besi yeri eklenerek, 37°C’de 2 saat çalkalamalı (150 rpm) olarak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, büyüyen hücreler 8000 rpm’de 3 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası süpernatantları dökölerek, pellet kısımları 100 µl LB besi yeri ile çözölmüştür ve kloromfenikol içeren LB besi yerine 70 µl olacak şekilde eklenerek, drigalski ile yayma ekim yapılmıştır. Gece boyu 37°C’de inkübasyon sonrasında sonuçlar değerlendirilmiş ve seleksiyon çalışmalarında kullanılmak üzere pCA24N plazmidini içeren DH10b suşu oluşturulmuştur.

3.2.2.3. Stok alınması

Transformasyon deneyinde katı besi yerinde tek koloni olarak büyüyen DH10b(pCA24N) suşuna kürdan ile dokunularak, 5 ml 50 µg/ml kloramfenikol içeren LB sıvı besi yerine bırakılmıştır. Gece boyunca 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu büyüyen hücreden 500 µl alınarak, 500 µl %30 gliserol ile çözülerek homojen hale getirilmiş ve -80 °C’de saklanmıştır.

3.2.3 Doksorubisin Seleksiyonu İçin Kullanılan Teknikler

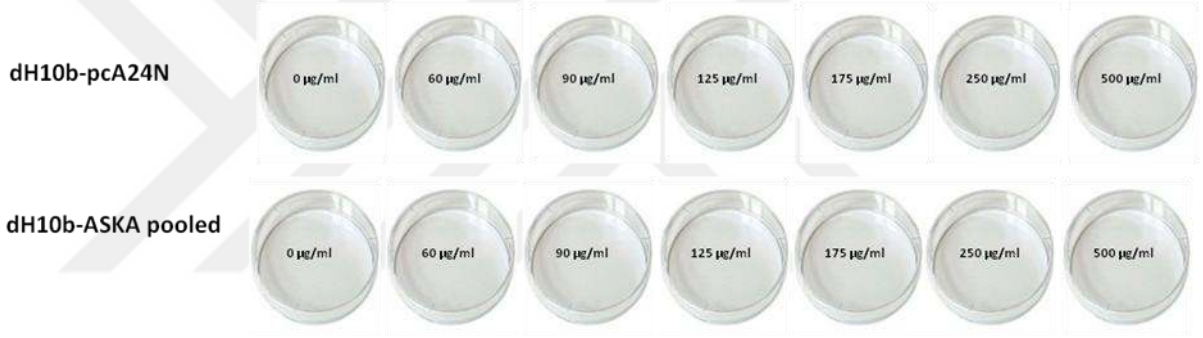
Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen bulgularla kullanılacak olan doksorubisin konsantrasyonlarına karar verilmiştir. Dirençli genlerin tespiti için gerçekleştirilecek olan seleksiyon çalışmalarında gradient yöntemi, direkt ekim yöntemi, zenginleştirme yöntemi ve çizgi ekim yöntemi kullanılmıştır.

3.2.3.1. Gradient yöntemi

Bu yöntem seleksiyon çalışmalarında kullanılan başarılı sonuçların elde edilebildiği önemli yöntemlerden bir tanesidir. Ayrıca elde edilen iyi görüntüler seleksiyon için önem taşımaktadır. Gradient besi yeri, Bacto Agar (BD-214010) ve LB Broth (L475) kullanılarak hazırlanmıştır. Gradient katı besi yerinin birinci katı için 35 ml besi yerine, 25 mg/ml kloramfenikol’den son konsantrasyon 30 µg/ml olacak şekilde 42 µl ve 100 mM IPTG’den son konsantrasyon 33 µM olacak şekilde 11 µl eklenmiştir. %3 eğim olacak şekilde kare petri ayarlanmış ve birinci kat besi yeri dökülmüştür. Doksorubisin (5mg/ml) DMSO ile çözülerek taze olarak hazırlanmış, son konsantrasyon 300 µg/ml olacak şekilde gradientin ikinci kat besi yerine eklenmiştir. Hazırlığı tamamlanmış olan ikinci kat besi yeri 45 dk sonra dökülerek donmaya bırakılmıştır. Çalışma gününden bir gün önce -80°C’de bulunan DH10b suşu içerisinde oluşturulan ASKA havuzu (pooled) ve 4°C’de bulunan kontrol olarak kullanılan DH10b(pCA24N) *E.coli* suşu, 30 µg/ml klormfenikol (cm) içeren 5 ml LB sıvı besi yerine aktarılmış, gece boyu inkübasyona bırakılarak canlandırma işlemi yapılmıştır. Canlandırılan stoklar inkübasyon sonrasında OD₆₀₀ 0,6 olacak şekilde 50 µl çekilerek, çift katlı hazırlanmış olan LB-cm(30 µg/ml) gradient katı besi yerine yayma ekimi yapılmıştır. Gece boyunca 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.3.2. Direkt ekim yöntemi

Direkt ekim yöntemi için Doksorubisin'i daha tutumlu kullanabilmek açısından küçük boyutlu 60 mm'lik petriler kullanılmıştır. 60 mm petriler için 8 ml besi yeri hazırlanmasının uygun olduğu belirlenmiştir. Besi yeri, Bacto Agar (BD-214010) ve LB Broth (L475) kullanılarak hazırlanmıştır. Her bir petriye dökülecek olan 8 ml besi yeri, ayrı ayrı cam tüplere aktarılmıştır. Otoklavlanan besi yerlerine 25 mg/ml cm'den son konsantrasyon 30µg/ml olacak şekilde 9,6µl ve 100 mM IPTG'den son konsantrasyon 33µM olacak şekilde 2,64 µl eklenmiştir. Doksorubisin (5mg/ml stok) çalışma sırasında DMSO ile çözülerek taze olarak hazırlanmış, son konsantrasyonlar 60 µg/ml, 90 µg/ml, 125 µg/ml, 175 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml olacak şekilde besi yerine eklenmiştir (Şekil 5). OD₆₀₀ 0,6 olacak şekilde örneklerden her bir petri için 25 µl alınarak direkt ekim gerçekleştirilmiştir. Gece boyunca 37°C'de inkübasyon sonrasında sonuçlar gözlemlenmiştir.



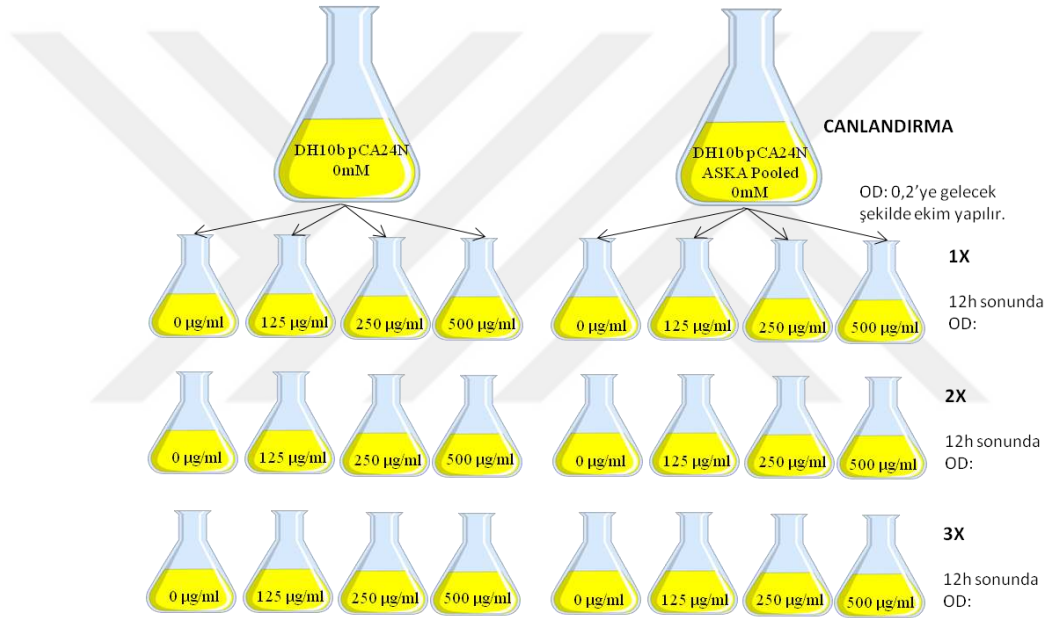
Şekil 5. Direkt ekim yöntemi için kullanılan deney dizaynı.

3.2.3.3. Zenginleştirme yöntemi

Bu yöntem kullanılarak hücreler belirli saat aralıklarında tekrar tekrar doksorubisine maruz bırakılmıştır. Doksorubisin sıvı ve katı besi yerinde farklı dinamikler gösterdiği için özellikle sıvı besi yerinde başlayıp katı besi yerinde devam edecek olan ve 2 ana aşamadan oluşan bu deneyde, büyük dikkat ve hassasiyet gösterilmiştir.

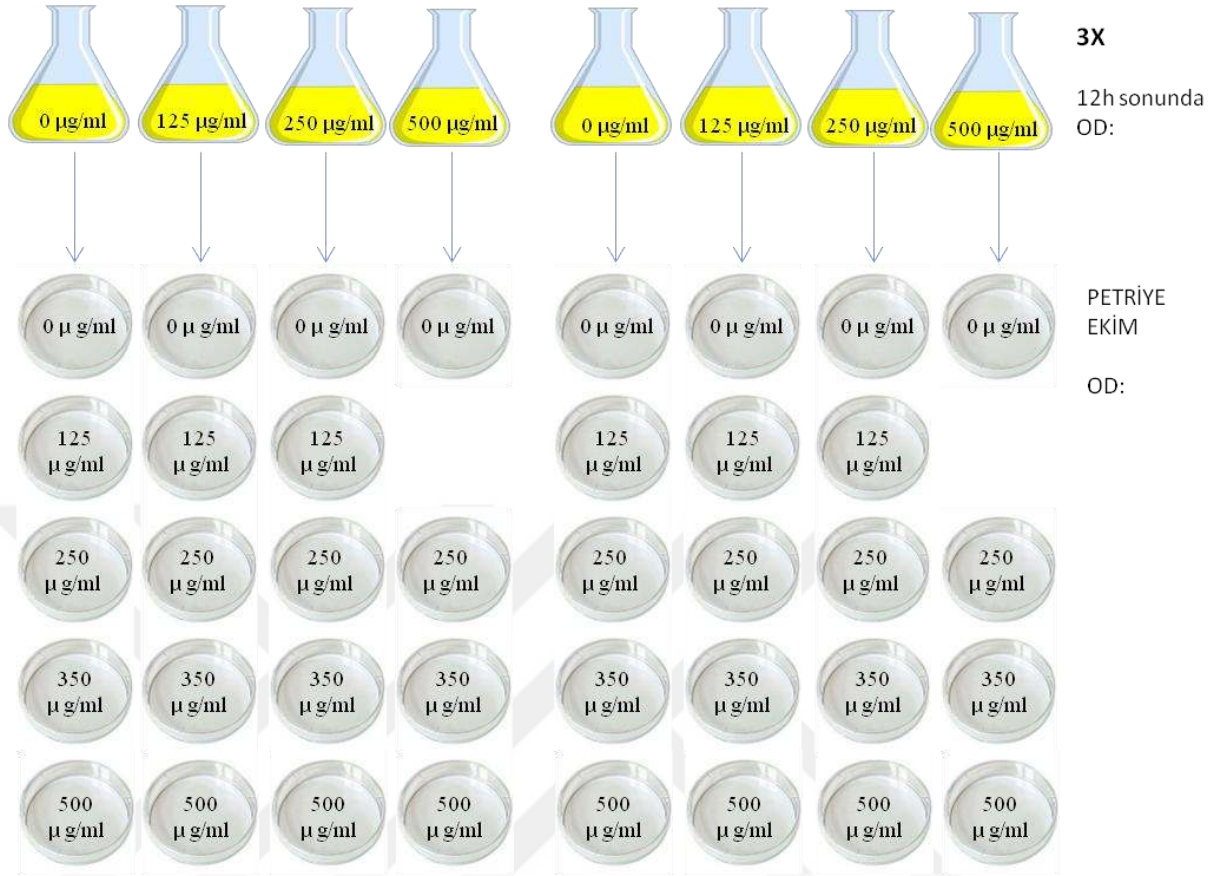
İlk aşamada suşlar sıvı besi yerinde farklı konsantrasyonlarda doksorubisin ile muamele edilerek, 12'şer saatlik 3 tekrar gerçekleştirilmiştir. 12 saatlik her bir döngü süreci ilacın yarılanma ömrü olarak bilinen 12-18,5 saat verisine göre belirlenmiştir. Laboratuvar stoklarında bulunan DH10b pCA24N::ASKA Pooled stoğundan 1 ml alınarak 5 ml LB-cm sıvı besiyerine bırakılmıştır. Kontrol olarak kullanılan DH10b(pCA24N) ise tek koloniden

kürdan ile dokunularak 5 ml LB besi yerine ekimi yapılmıştır. Gece boyunca büyüyen hücrelerden OD₆₀₀ değeri 0,2 olacak şekilde alınarak 50 ml LB sıvı besi yerine bırakılmıştır. Yaklaşık 3,5 saatlik inkübasyon sonrasında örnekler 5 ml'lik doksorubisin içeren farklı konsantrasyonlu (0 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml) besi yerlerine OD₆₀₀ 0,2 olarak eklenmiştir. 37 C'de 150 rpm'de çalkalamalı inkübatörde 12 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası her bir örnekten 200 µl alınarak, yeni 5 ml farklı doksorubisin konsantrasyonlu besi yerine aktarılmıştır. Aynı işlem toplamda 3 kez tekrarlanarak, zenginleştirme tamamlanmıştır. Her bir döngü sonunda OD₆₀₀ ölçümü yapıp, değerler kaydedilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. Zenginleştirme (Enrichment) ile seleksiyon yönteminin ilk aşamasının şematik gösterimi.

İkinci aşamada 3. döngü sonucunda elde edilen örneklerden 25 µl alınarak, farklı doksorubisin konsantrasyonları içeren katı besiyerlerine, yayma ekimleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. Zenginleştirme (Enrichment) ile seleksiyon yönteminin ikinci aşamasının şematik gösterimi.

3.2.3.4. Çizgi Ekim Yöntemi

Çizgi ekim yöntemi birçok deneysel çalışmada farklı teknikler sonucunda elde edilen bakteriyel kolonilerin farklı ortamlarda değerlendirilebilmesi ve ayrıca saflaştırılması için de kullanılabilen pratik yöntemlerden bir tanesidir. Bu yöntem, farklı katı besi yerinde üreyen kolonilere tek tek kürdan ile dokunularak, Çizgi ekim için hazırlanmış olan katı besi yerine düz bir çizgi halinde ekilmesi şeklinde gerçekleştirilmektedir. Bu tez çalışmasında bu yöntem hem bir seleksiyon yöntemi olarak, hem de tespit edilen değerli olabileceği düşünülen kolonilerin çoğaltılması için iki amaç doğrultusunda kullanılmıştır. Bu teknikte hazırlanan katı besi yeri petrisinde, bakterilerin ekileceği yerler cama yazar kalem ile çizgiler şeklinde işaretlenmektedir. Ardından bu işaretler üzerinden kolonilerin ekimi, steril kürdan yardımı ile gerçekleştirilmektedir. Deney düzeneği şekil 8’de gösterilmektedir. Çizgi ekim yöntemi sonucunda ilaç içermeyen (0 µg/ml) besi yerinde hedef kolonilerin çoğaltılması

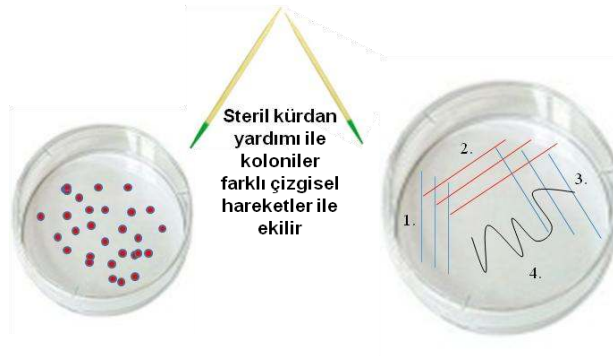
gerçekleştirilmekte, ayrıca, artan dokсорubisin konsantrasyonları içeren katı besiyerlerinde ek bir seleksiyon da sağlanmaktadır. Böylelikle tolerant kolonilerin seçimi gerçekleştirilmektedir.



Şekil 8. Çizgi Ekim Yöntemi için deney dizaynı.

3.2.3.5. Tek Koloni Ekim Yöntemi

Seyreltme ekimi olarak da bilinen bu yöntemde istenilen bakteri suşunun katı besi yerine tek koloni düşürülmesi amaçlanmaktadır. Steril kürdan yardımıyla gerçekleştirilen bu yöntemde, katı besi yerinde farklı çizgisel hareketler uygulanarak bakterilerin tek koloni olarak düşmesi sağlanmaktadır (Şekil 9).



Şekil 9. Tek koloni (Seyreltme ekim) tekniğinin gösterilmesi.

3.2.4. Tolerant Kolonilerin Plazmidlerindeki Gen Bilgilerinin Tespit Edilmesi

Seleksiyon çalışmalarında elde edilen kolonilerin gen bilgilerini tespit etmek için seçilen tolerant kolonilerin içerdiği pCA24N::gene rekombinant plazmidleri izole edilerek sekansa gönderilmiştir. Rekombinant plazmidin izolasyonu için, Geneall Exprep Plasmid SV mini (CatNo:101-150) kiti kullanılmıştır. Kitin protokolu uygulanarak rekombinant plazmidlerin izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen rekombinant plazmidler, %0,8'lik agaroz jelde yürütülerek DNR MiniBIS pro UV görüntüleme cihazında görüntülenmiştir. Yeterli miktarda elde edildiğinden emin olunan plazmidler insert gen içeriklerinin belirlenmesi adına sekansa gönderilmiştir. İnsertler, F-CA primeri (5' CATTAAGAGGAGAAATTAAGTATGAGAGG 3') ile tek yönlü olarak, sanger tekniği kullanılarak, hizmet alımı ile sekanslanmıştır (MacroGen, Hollanda).

3.2.4.1. Plazmid izolasyonu

Yapılan seleksiyon çalışmaları sonucunda elde edilen ve doksorubisine karşı toleranslı olduğu görülen koloniler seçilerek, plazmid izolasyonu yapılması için hazır hale getirilmiştir. Bunun için hedef tolerant koloniler öncelikle tek koloni ekimi yapılmıştır. Ardından tek koloniden kürdan ile 5 ml LB sıvı besi yerine inokule edilerek, gece boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Plazmid izolasyonu için yeterli derecede hücre elde edildikten sonra, hücreler santrifüjlenerek (17000 g'de 3 dk) pelletleri elde edilmiştir. Pelletlere, kullanılan kit (GeneAll, CatNo:101-150) protokolu uygulanarak plazmid izolasyonları gerçekleştirilmiştir.

Bunun için öncelikle yeterli miktarda hücre elde edildikten sonra, plazmid izolasyonu yapılacak olan hücreler pellet haline getirilmiştir. Pellet, 250 µl Buffer S1 solusyonu ile çözülmüştür. Ardından 250 µl Buffer S2 solusyonu eklenmiş ve hafifçe karıştırıldıktan sonra 350 µl Buffer S3 solusyonu eklenmiştir. Solusyonlar karıştırıldıktan sonra 10 dakika santrifüjlenmiştir. Supernatan SV column'a aktarıldıktan sonra 30 saniye santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından SV column üzerine 700 µl Buffer PW eklenerek, tekrar 30 saniye santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Tekrardan 1 dakika boyunca boş SV column santrifüjlenerek, columnların bufferlardan iyice temizlenmesi sağlanmıştır. Üzerlerine 50 µl elüsyon tamponu eklenerek 1 dakika santrifüj sonucu, kolona bağlanan rekombinant plazmidler izole edilmiştir.

3.2.4.2. İzole edilen örneklerin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi

Çalışmalarda % 0,8'lik agaroz (Sigma, CatNo:A9539-500G) jel kullanılmıştır. %0,8'lik agaroz jel hazırlamak için, 0,8 gram agaroz tartılarak 100 ml 1X TAE içerisinde çözümüştür. Agarozun homojen olarak çözülmesi için mikrodalga fırında kaynayana kadar yaklaşık 5 dakika tutulmuştur. Ardından ortalama 50°C'ye gelene kadar soğuması beklenmiştir. İçerisine 10µl EtBr (10mg/ml) (Etidyum Bromür) (Sigma, Cat No:E8751-1G) eklenmiştir. Jel kabının lastikleri takılarak, düzeneğe tarak yerleştirildikten sonra jel dökülmüştür. Oda sıcaklığında yaklaşık 25 dakika jelin donması beklenmiştir. Donan jelin kabındaki yan lastikler çıkartılmış ve kap, 1X TAE (Tris-EDTA Tamponu; 40 mM Tris, 20 mM acetic acid, and 1 mM EDTA) bufferla dolu olan elektroforez tankına kuyucuklar siyah tarafa yani katoda bakacak şekilde oturtulmuştur. Tarak dikkatlice çıkartılmıştır. Her bir kuyucuğa izolasyon örneklerinden 3 µl, 6X Loading Dye'dan 2 µl ve 1x TAE'den 5 µl eklenerek, total hacim 10 µl olacak şekilde yükleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Son olarak, 1kb DNA marker'dan (Thermo, Cat No: SM0311) 2 µl yüklendikten sonra tankın güç kaynağıyla bağlantısı yapılmıştır. Jele yüklemesi gerçekleştirilen plazmidler, 90 V'da 30 dakika katoddan anoda doğru yürütülmüştür. Süre sonunda jel görüntüsü alınmıştır.

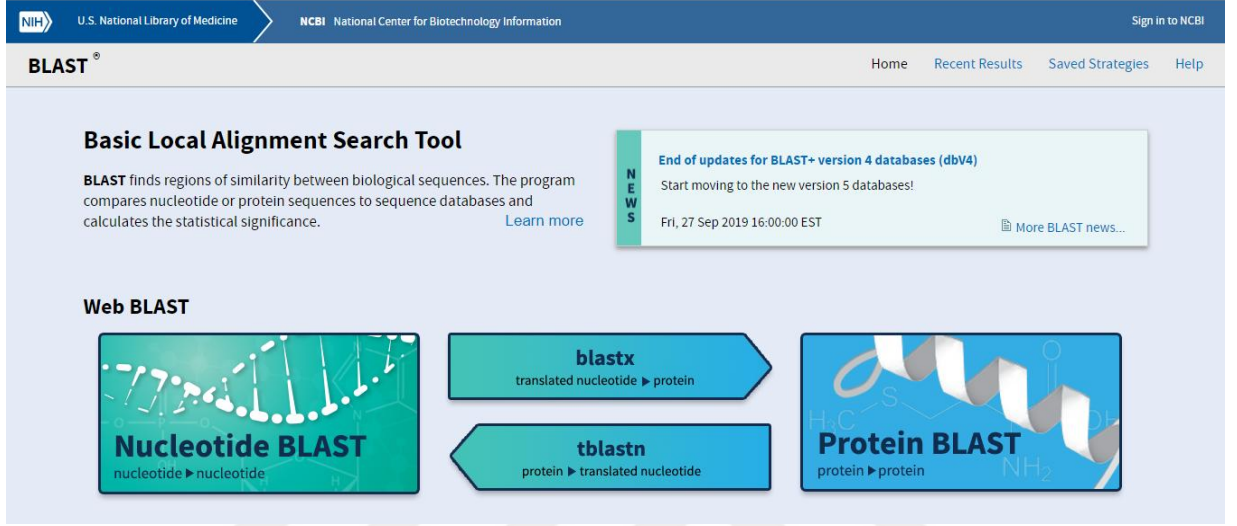
3.2.4.3. Sekansa gönderilmesi

İzolasyon ürünleri toplamda yaklaşık 100 ng olacak şekilde, 1 ml eppendorf tüplere aktarılmıştır. Plazmidlere ait jel görüntüleri örnekler ile eşleştirilerek, rapor haline getirilmiştir. Plazmidlerin içerdikleri insert dizilerinin sekanslanması için hizmet alımı yapılmıştır. Plazmid sekansına ait formlar doldurularak, pCA24N plazmidine ait primerler ve örnekler uygun şekilde paketlenerek sekanslanmak üzere sekansa gönderilmiştir. Sekans Primeri: 5' CATTAAGAGGAGAAATTAAGTATGAGAGG 3'.

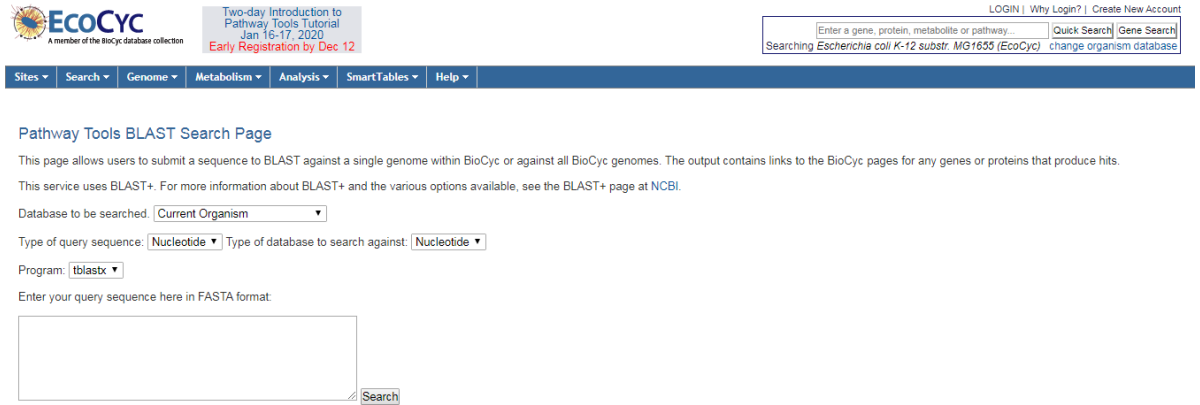
3.2.5. Sekans Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Blast Analizleri

Hizmet alımı sonucunda elde edilen sekans sonuçları incelenmiştir. Öncelikle sekanslara ait kromotogramlar değerlendirilmiştir ve sekansların okuma kalitesinden emin olunmuştur. Özellikle sekansın başlangıcı ve sonlanması esnasında gerçekleşen, kalitesiz olarak değerlendirilen sekans dizileri çıkartılmıştır (trimmed).

Sonuçlardan elde edilen sekansların trimmed aralıkları belirlenerek elde edilen kaliteli sekans dizileri NCBI ve ECOCYC veritabanlarında *E. coli* genomu içerisinde taranmıştır (Şekil 10 ve Şekil 11). Blast sonuçlarına göre sekansların gen bilgileri, aktiviteleri, uyumluluk kaliteleri ve yayın bilgileri belirlenmiştir.



Şekil 10. NCBI Blast veritabanı internet ekran görüntüsü.



Şekil 11. ECOCYC veritabanı internet ekran görüntüsü.

4. BULGULAR

4.1. Optimizasyon Çalışmaları: Doksorubisin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi İçin Yapılan Çalışma Sonuçları

Optimizasyon çalışmalarında MIC yöntemi, Disk difüzyon yöntemi, Büyüme Eğrisi ve Spot Test yöntemleri kullanılmıştır. Bu teknikler yardımı ile seleksiyon için kullanılacak olan konsantrasyonlar ve suş belirlenmiştir.

4.1.1. MIC Yöntemi Sonuçları

Literatür ışığında belirlenen 12 konsantrasyon kullanılarak MIC yöntemi uygulanmıştır. Çalışmada kullanılan suşlar stokta bulunan ASKA klon seti arasından seçilmiştir. Bakteriler, MIC testi için, başlangıç olarak OD₆₀₀ 0,05 konsantrasyonunda inoküle edilmiştir. Üreme olup olmadığı 3 gün süreyle OD₆₀₀ ölçümleri yapılarak kaydedilmiştir. Suşlara ait OD₆₀₀ değerleri Tablo 1’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde doksorubisinin suş üzerinde üremeyi azalttığı fakat öldürmediği, üremenin devam ettiği gözlemlenmiştir. Bir sonraki optimizasyon çalışmasında (büyüme eğrisi) konsantrasyonların artırılmasına ve farklı suşların da denenmesine karar verilmiştir.

Tablo 1. Farklı klonlara ait MIC yöntemi sonucunda elde edilen OD₆₀₀ değerleri.

	<i>E.coli</i> Suşları	0 µg/ml	2 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	12 µg/ml	15 µg/ml	17 µg/ml	20 µg/ml	25 µg/ml	30 µg/ml	40 µg/ml	50 µg/ml
1.gün	P15B8_cobT	0,401	0,347	0,291	0,236	0,226	0,203	0,193	0,207	0,186	0,167	0,162	0,167
2.gün	P15B8_cobT	0,609	0,635	0,548	0,448	0,406	0,360	0,322	0,315	0,265	0,248	0,218	0,193
3.gün	P15B8_cobT	0,625	0,601	0,555	0,466	0,463	0,407	0,375	0,399	0,352	0,303	0,233	0,211
1.gün	P48E11_asr(kont)	0,232	0,266	0,243	0,217	0,202	0,174	0,164	0,181	0,144	0,151	0,125	0,144
2.gün	P48E11_asr(kont)	0,416	0,488	0,448	0,418	0,376	0,301	0,273	0,274	0,234	0,207	0,171	0,180
3.gün	P48E11_asr(kont)	0,479	0,501	0,463	0,454	0,423	0,403	0,338	0,368	0,331	0,280	0,207	0,185
1.gün	P16G9_chaC	0,218	0,248	0,230	0,208	0,186	0,163	0,148	0,173	0,155	0,131	0,118	0,132
2.gün	P16G9_chaC	0,257	0,309	0,301	0,271	0,234	0,231	0,213	0,231	0,214	0,188	0,157	0,156
3.gün	P16G9_chaC	0,303	0,330	0,345	0,300	0,238	0,219	0,211	0,246	0,245	0,205	0,180	0,178
1.gün	P44G9_yieL	0,222	0,298	0,297	0,186	0,178	0,146	0,140	0,155	0,136	0,122	0,105	0,121
2.gün	P44G9_yieL	0,275	0,348	0,313	0,250	0,240	0,215	0,201	0,228	0,208	0,179	0,144	0,171
3.gün	P44G9_yieL	0,318	0,362	0,329	0,333	0,252	0,227	0,216	0,255	0,229	0,211	0,151	0,195

OD₆₀₀ değerleri incelendiğinde, ilaç konsantrasyonu arttıkça üremenin azaldığı ancak; 1. 2. ve 3 günlere ait değerler incelendiğinde üremenin devam ettiği, bu yüzden doksorubisinin bu konsantrasyonlarda test edilen suşlar için öldürücü olmadığı tespit edilmiştir. Örneğin plazmidinde *cobT* genini içeren klonun, doksorubisin içermeyen besi yerinde OD₆₀₀ değerleri, 1. Gün 0,401, 2.gün 0,609, 3.gün 0,625 olarak ölçülmüştür. En yüksek konsantrasyon olarak çalışılan 50 µg/ml doksorubisin içeren besi yerinde üreme için OD₆₀₀ değerleri, 1. Gün 0,167, 2.gün 0,193, 3.gün 0,211 olarak ölçülmüştür. Bu değerler karşılaştırıldığında, doksorubisin içermeyen besi yerinde gerçekleşen üreme ile arasındaki fark görülmektedir ancak bu konsantrasyonun seleksiyon için yeterli olmadığı değerlendirilmiştir.

4.1.2. Büyüme Eğrisi İle Yapılan Çalışma Sonuçları

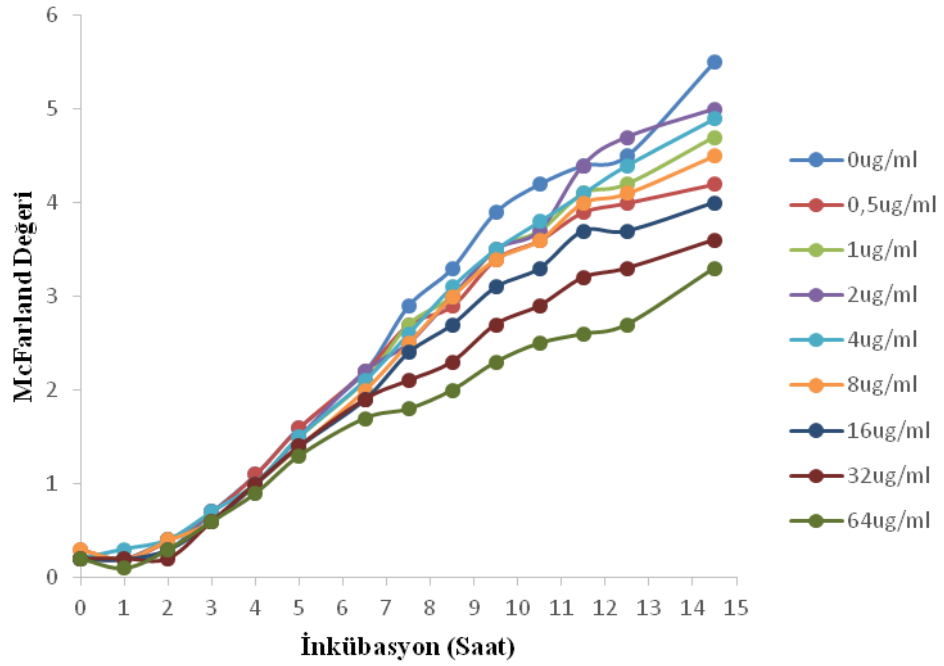
Literatüre bakılarak ilk olarak belirlenen doksorubisin konsantrasyonları 0 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml, 64 µg/ml olmuştur. ASKA klon seti havuzu ve negatif kontrol olarak karar verilen seçilen W3110 (pCA24N) suşu ile bu konsantrasyonlarda ayrı ayrı büyüme eğrileri gerçekleştirilmiştir. Bunun için örneklerin McFarland değerleri ölçülerek 0,2 konsantrasyonundan başlatılacak şekilde büyümeye bırakılmış ve her saat başı değerleri ölçülerek kaydedilmiştir (Tablo 2 ve Tablo 3). Bu iki örnek için elde edilen değerler grafik haline dönüştürülerek büyüme eğrileri ortaya çıkartılmıştır (Şekil 12 ve Şekil 13).

Tablo 2. ASKA klon seti havuzunun birinci büyüme eğrisi değerleri.

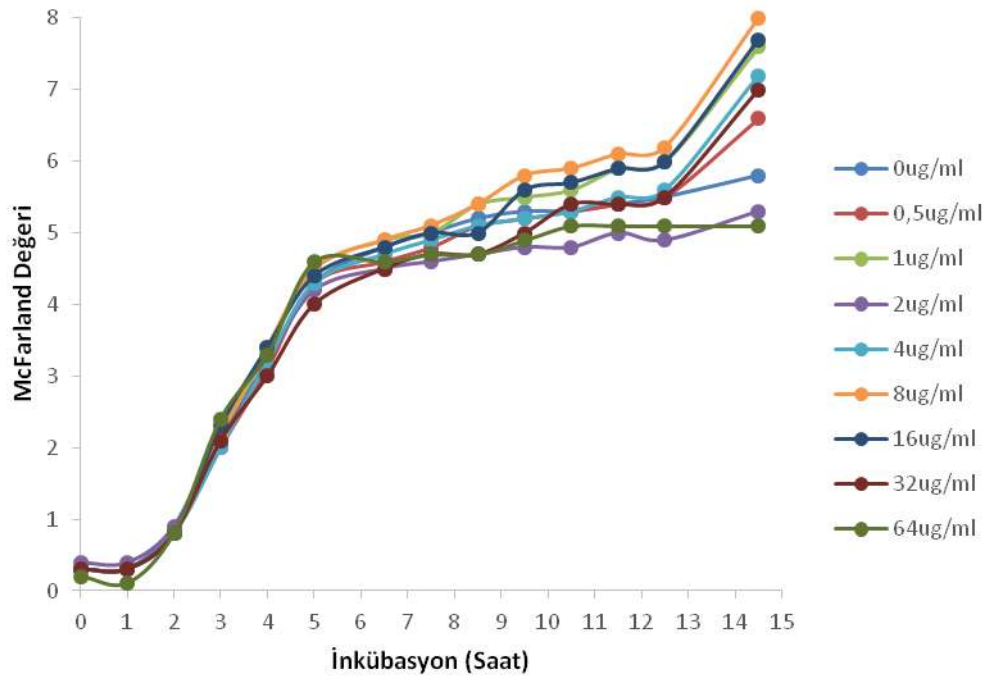
Saat	0µg/ml	0,5µg/ml	1µg/ml	2µg/ml	4µg/ml	8µg/ml	16µg/ml	32µg/ml	64µg/ml
06:37	0	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2
07:40	1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1
08:44	2	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,2
09:50	3	0,7	0,7	0,6	0,6	0,7	0,6	0,6	0,6
10:55	4	1,1	1,1	1	1	1	1	1	0,9
11:58	5	1,6	1,6	1,5	1,5	1,5	1,4	1,4	1,3
13:21	6,5	2,2	2,2	2,1	2,2	2,1	2	1,9	1,7
14:27	7,5	2,9	2,7	2,7	2,5	2,6	2,5	2,4	2,1
15:30	8,5	3,3	2,9	3	3	3,1	3	2,7	2,3
16:39	9,5	3,9	3,4	3,5	3,5	3,5	3,4	3,1	2,7
17:40	10,5	4,2	3,6	3,7	3,7	3,8	3,6	3,3	2,9
18:48	11,5	4,4	3,9	4,1	4,4	4,1	4	3,7	3,2
19:52	12,5	4,5	4	4,2	4,7	4,4	4,1	3,7	3,3
21:47	14,5	5,5	4,2	4,7	5	4,9	4,5	4	3,6

Tablo 3. Kontrol olarak seçilen W3110 pCA24N örneğinin büyüme eğrisi değerleri.

Saat		0µg/ml	0,5µg/ml	1µg/ml	2µg/ml	4µg/ml	8µg/ml	16µg/ml	32µg/ml	64µg/ml
06:28	0	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2
07:30	1	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1
08:38	2	0,9	0,8	0,8	0,9	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
09:43	3	2,2	2	2,1	2,1	2	2,2	2,3	2,1	2,4
10:51	4	3,2	3,1	3,4	3,2	3,2	3,4	3,4	3	3,3
11:53	5	4,3	4,3	4,5	4,2	4,3	4,5	4,4	4	4,6
13:24	6,5	4,8	4,6	4,9	4,5	4,7	4,9	4,8	4,5	4,6
14:30	7,5	5	4,8	5	4,6	4,9	5,1	5	4,7	4,7
15:30	8,5	5,2	5,1	5,4	4,7	5,1	5,4	5	4,7	4,7
16:36	9,5	5,3	5,2	5,5	4,8	5,2	5,8	5,6	5	4,9
17:42	10,5	5,3	5,3	5,6	4,8	5,3	5,9	5,7	5,4	5,1
18:44	11,5	5,4	5,4	5,9	5	5,5	6,1	5,9	5,4	5,1
19:48	12,5	5,5	5,5	6	4,9	5,6	6,2	6	5,5	5,1
21:44	14,5	5,8	6,6	7,6	5,3	7,2	8	7,7	7	5,1



Şekil 12. ASKA klon seti havuzunun birinci büyüme eğrisi grafiği.



Şekil 13. Kontrol olarak seçilen W3110 pCA24N örneğinin birinci büyüme eğrisi grafiği.

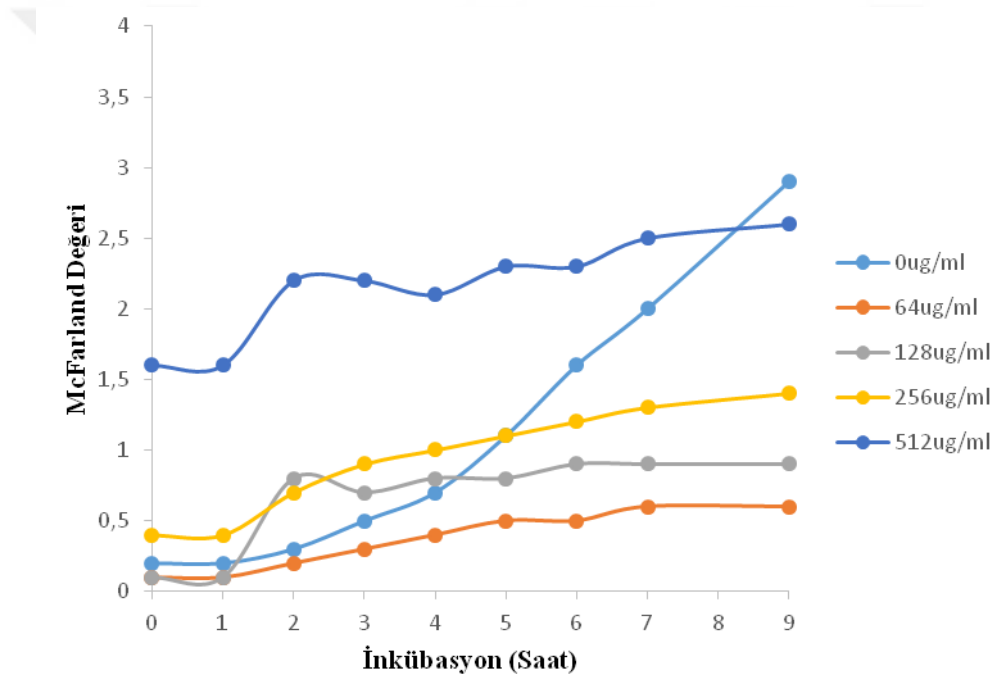
İlk büyüme eğrisi için, belirlenen konsantrasyonlar (0 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$, 16 $\mu\text{g/ml}$, 32 $\mu\text{g/ml}$, 64 $\mu\text{g/ml}$) ile başlatılan bu deneyde herhangi bir öldürücü eşik konsantrasyonu belirlenemediği için konsantrasyonlar artırılarak deney tekrarlanmıştır. Ölçülen McFarland değerleri Tablo 4 ve Tablo 5’de verilerek, şekil 14 ve şekil 15’de grafikleri gösterilmiştir (Tablo 4 ve Tablo 5, Şekil 14 ve Şekil 15).

Tablo 4. ASKA klon seti havuzunun ikinci büyüme eğrisi değerleri.

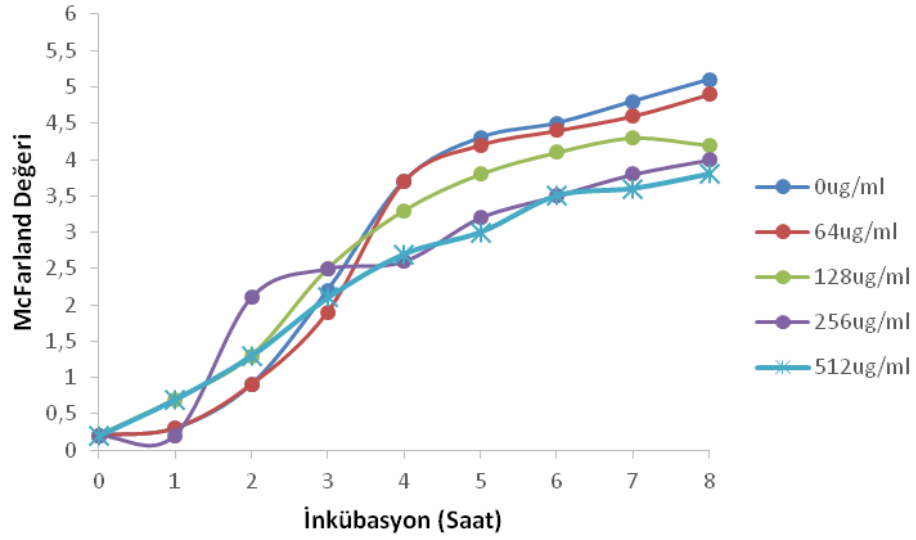
Saat		0 $\mu\text{g/ml}$	64 $\mu\text{g/ml}$	128 $\mu\text{g/ml}$	256 $\mu\text{g/ml}$	512 $\mu\text{g/ml}$
12:10	0	0,2	0,1	0,1	0,4	1,6
13:14	1	0,2	0,1	0,1	0,4	1,6
14:21	2	0,3	0,2	0,8	0,7	2,2
15:28	3	0,5	0,3	0,7	0,9	2,2
16:33	4	0,7	0,4	0,8	1	2,1
17:33	5	1,1	0,5	0,8	1,1	2,3
18:41	6	1,6	0,5	0,9	1,2	2,3
19:45	7	2	0,6	0,9	1,3	2,5
21:41	9	2,9	0,6	0,9	1,4	2,6

Tablo 5. Kontrol W3110 pCA24N örneğinin ikinci büyüme eğrisi değerleri.

Saat		0µg/ml	64µg/ml	128µg/ml	256µg/ml	512µg/ml
12:10	0					
13:14	1	0,3	0,3	0,7	0,2	0,7
14:21	2	0,9	0,9	1,3	2,1	1,3
15:26	3	2,2	1,9	2,5	2,5	2,1
16:30	4	3,7	3,7	3,3	2,6	2,7
17:36	5	4,3	4,2	3,8	3,2	3
18:38	6	4,5	4,4	4,1	3,5	3,5
19:43	7	4,8	4,6	4,3	3,8	3,6
21:39	8	5,1	4,9	4,2	4	3,8



Şekil 14. ASKA klon seti havuzunun ikinci büyüme eğrisi grafiği.



Şekil 15. Kontrol olarak seçilen W3110 pCA24N örneğinin ikinci büyüme eğrisi grafiği.

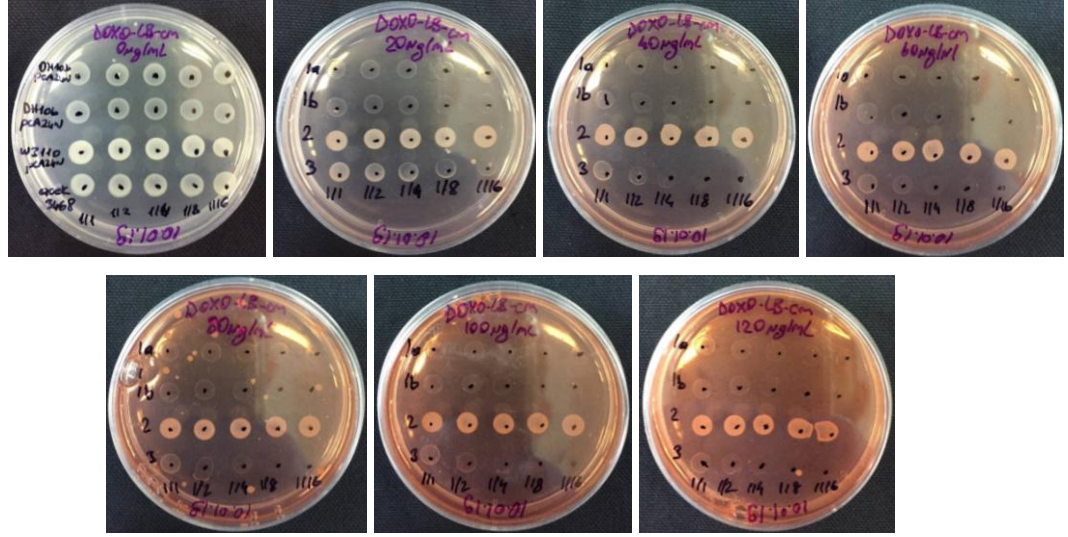
Doksorubisin sıvı besi yerinde farklı büyüme dinamikleri göstermiştir. Artan ilaç konsantrasyonlarında DMSO içerisinde gerektiği kadar çözünemeyen doksorubisin çökelti oluşturmuştur. Homojen bir karışım elde edilemediği için her aşamada anlamlı sonuçlar elde etmek mümkün olmamıştır.

4.1.3. Spot Test İle Dokсорubisin Direnç Seviyelerinin ve Uygun Suşun Belirlenmesi

Yöntem kısmında anlatıldığı üzere, uygulanan Spot testi suşlarının isimleri ve yerleşimi Tablo 6’da gösterilmektedir. Bu yöntem özellikle doğru suşun seçilimi için önemli bir yol gösterici olmuştur. Gece boyu inkübasyon sonrasında (1.gün) gerçekleşen üremeler şekil 16’da gösterilmiştir.

Tablo 6. Spot testi için kullanılan *E.coli* suşları

Petri Sıra No	<i>E.coli</i> Suşu Adı
1a	DH10b(pCA24N)
1b	DH10b(pCA24N)
2	W3110(pCA24N)
3	P34G8 AG1(pCA24N::aceK)



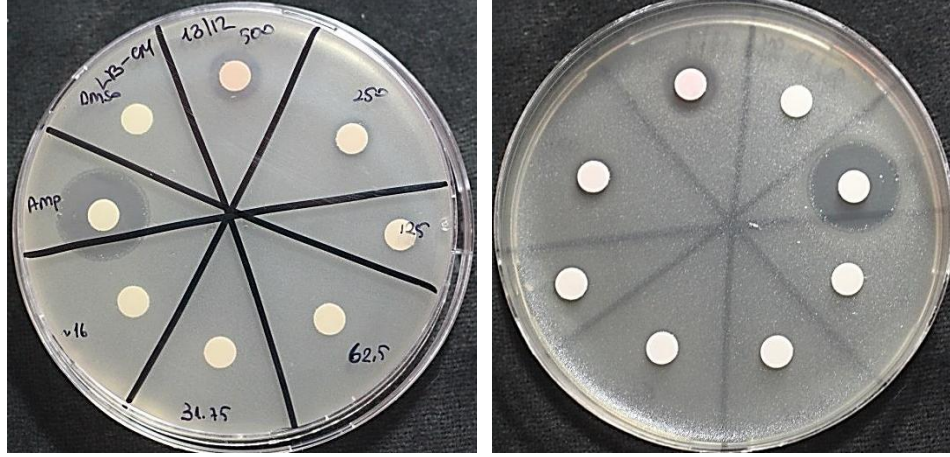
Şekil 16. *E. coli* W3110 (pCA24N), *E. coli* P34G8 AG1 (pCA24N:aceK) ve *E. coli* DH10b(pCA24N) suşlarının farklı doksorubisin konsantrasyonu içeren besiyerlerinde spot testi sonuçları.

Kontrol (0 µg/ml yani doksorubisin içermeyen besi yerine) grubuna yapılan ekim sonucunda tüm suşlarda üreme görülmüştür. Doksorubisin konsantrasyonu artmaya başladıkça *E. coli* DH10b suşunun üremesinin azaldığı ve ardından üremenin durduğu görülmektedir. *E. coli* W3110 (pCA24N) ve *E. coli* P34G8 AG1 (pCA24N:aceK) suşunun ise tüm konsantrasyonlarda ürediği tespit edilmiştir. Deney 5 gün süreyle takip edilmiştir.

4.1.4. Disk Difüzyon Yöntemi İle Konsantrasyon Belirlemesi

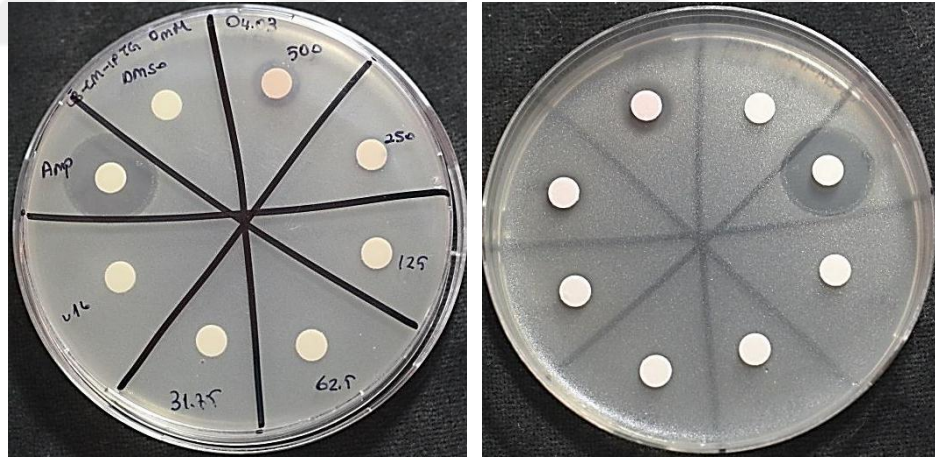
Disk difüzyon yöntemine ait detaylar yöntem kısmında verilmiştir. Bu teknik ile seri dilüsyonlarla DMSO içerisinde çözülerek hazırlanan 6 farklı konsantrasyona (16 µg/ml, 31.75 µg/ml, 62.5 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml) sahip doksorubisin disklerle emdirilerek disk difüzyon yöntemi çalışılmıştır.

Ayrıca, IPTG'nin doksorubisin duyarlılığı ile ilişkisinin de anlaşılabilmesi için rastgele seçilen bir ASKA suşu hem IPTG içeren (Şeki 18) hem de IPTG içermeyen (Şekil 17) katı besi yerinde disk difüzyon yöntemi ile çalışılmıştır. Yapılan bu çalışmada IPTG içeren katı besi yeri ve IPTG içermeyen katı besi yerinde herhangi bir farklılık tespit edilmemiştir.



Şekil 17. IPTG içermeyen katı besi yerinde Aska suşu disk difüzyonu.

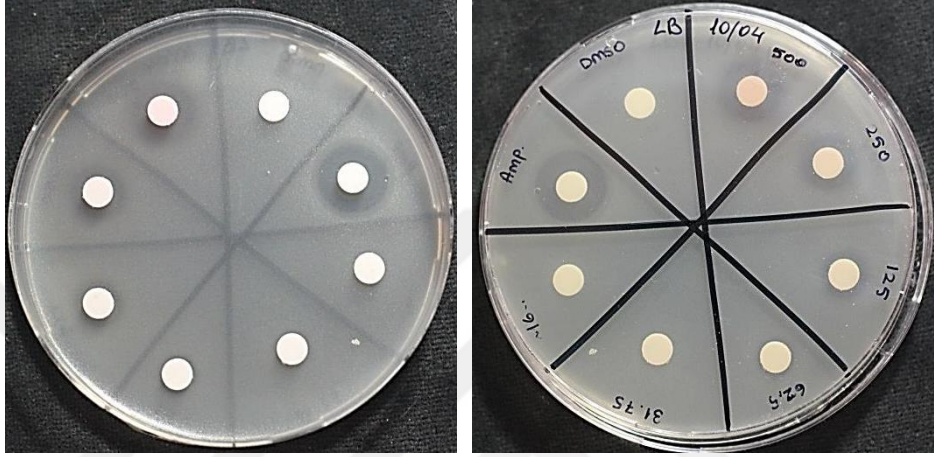
Disklerin etrafında oluşan zonlara bakarak değerlendirilmeler yapılmıştır. Ampisilin etrafında 18mm zon oluşmuştur. DMSO etrafında zon oluşumu görülmemiştir. Bu bulgu DMSO'nun ASKA klon setinde herhangi bir lethal etkisinin olmadığını göstermektedir. 500 $\mu\text{g/ml}$ doksorubisin emdirilen disk etrafında 10 mm zon oluşumu tespit edilmiştir.



Şekil 18. 33 μM IPTG içeren katı besi yerinde Aska suşu disk difüzyonu.

Gen regülasyonunu arttırdığı bilinen IPTG içeren katı besi yerinde çalışılan disk difüzyon deneyinde 500 $\mu\text{g/ml}$ l'de IPTG içermeyen katı besi yerinde olduğu gibi yaklaşık 10 mm zon oluşumu tespit edilmiştir. Aynı şekilde pozitif kontrol ampisilin etrafında 18 mm zon oluşumu gözlenirken, DMSO emdirilen disk etrafında herhangi bir zon oluşumu tespit edilmemiştir.

Bu teknikten önce çalışılan, spot testi sonuçlarına göre *E. coli* suşlarından DH10b'nin doksorubisine karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Bunun üzerine çalışmalara bu suş ile devam edilmesine ve ASKA pooled kütüphanesinin DH10b suşu içerisine gönderilmesine karar verilmiştir. Bu yüzden, öncelikle bu suş için kullanılacak konsantrasyonlara karar verilmesi adına disk difüzyon tekniği kullanılmıştır. DH10b suşunun doksorubisine karşı duyarlılığı disk difüzyon yöntemi ile çalışılmıştır ve tespit edilmiştir (Şekil 19).



Şekil 19. DH10b suşu ile yapılan disk difüzyonu.

Spot testi sonucunda doksorubisine karşı duyarlı olduğu görülen DH10b ile çalışılan disk difüzyon yönteminde 125 µg/ul'den başlayan ve giderek artan konsantrasyonlarda zon oluşumları tespit edilmiştir. Kontrol olarak kullanılan DMSO etrafında herhangi bir zon oluşumu görülmezken, ampisilin etrafında 18mm zon oluşumu tespit edilmiştir.

ASKA suşu için 500µg/ml'de zon oluşumu başlarken, DH10b suşu için 125 µg/ml konsantrasyonunda zon oluşumunun başladığı görülmektedir (Şekil 19). Zon oluşumu, doksorubisinin suşlar üzerinde lethal, üreme engelleyici etkisinin olduğunu ifade etmektedir. Disklerin etrafındaki zon oluşumları ve diğer ayrıntılar Tablo 7'de yer almaktadır.

Tablo 7. Zon oluşumu değerlendirmesi.

Bölüm	Disk İçeriği	Konsantrasyon	Şekil 17. Zon Oluşumu Suş: Aska Suşu Besi yeri: LB	Şekil 18. Zon Oluşumu Suş: Aska Suşu Besi yeri: LB_33 µM IPTG	Şekil 19. Zon Oluşumu Suş: DH10b Besi yeri: LB
1	Ampisilin	2 mg/ml	18 mm	18 mm	18 mm
2	DMSO		Yok	Yok	Yok
3	Doksorubisin	500 µg/ml	10 mm	10 mm	16 mm
4	Doksorubisin	250 µg/ml	Yok	Yok	12 mm
5	Doksorubisin	125 µg/ml	Yok	Yok	8 mm
6	Doksorubisin	62,5 µg/ml	Yok	Yok	Yok
7	Doksorubisin	31,25 µg/ml	Yok	Yok	Yok
8	Doksorubisin	16 µg/ml	Yok	Yok	Yok

Yapılan çalışmalar sonucunda Doksorubisine karşı DH10b suşu en duyarlı suş olarak tespit edilmiştir.

4.1.5. Kullanılacak Suş ve Doksorubisin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

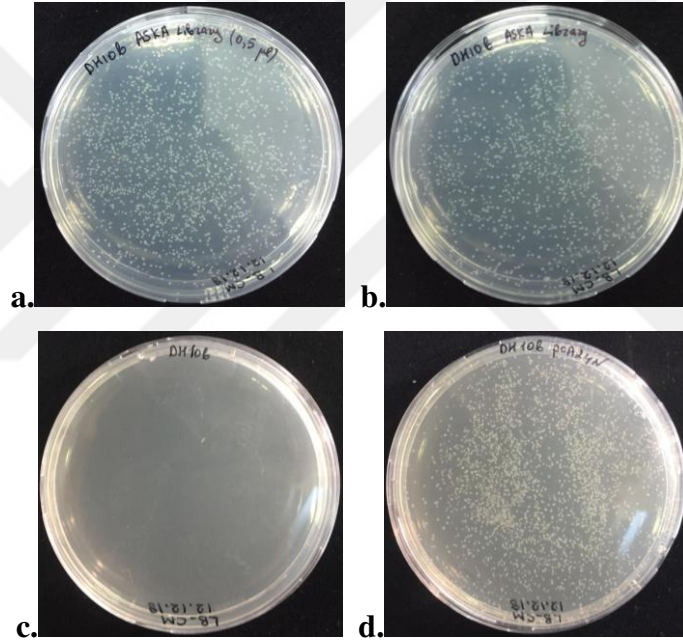
Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen bulgular değerlendirilerek, seleksiyon çalışmalarında kullanılacak olan konsantrasyonlar ve suş belirlenmiştir. Amaç direnç sağlayan genleri tespit etmek olduğu için elde edilen verilere bakılarak ASKA klon seti suşu yerine daha duyarlı olduğu tespit edilen DH10b suşuyla çalışmalara devam edilmesine karar verilmiştir. Bu karar ile birlikte ASKA klon setinden *E.coli* gen havuzu (pooled) elde edilerek, DH10b içerisine transformasyonu gerçekleştirilmiştir.

Seleksiyon için 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml konsantrasyonlarının ve DH10b içerisine transformasyonu gerçekleştirilen gen havuzunun kullanılmasına karar verilmiştir.

4.2. DH10b- ASKA Havuzunun Elde Edilmesi (DH10b-ASKA Pooled)

Optimizasyon çalışmalarında daha duyarlı olduğu ve seleksiyon çalışmaları için uygun olduğu belirlenen DH10b *E.coli* suşunun deneylerde kullanılabilmesi için ASKA plazmid havuzunun elde edilip, kompetant DH10b içerisine transforme edilmesi gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında ASKA plazmid havuzu Muğla SK Üniversitesi'nde Doç Dr. Bekir ÇÖL tarafından daha önce ASKA klon setinden elde edilen stoklar temin edilerek kullanılmıştır. ASKA Plazmid gen havuzu (ASKA Pooled) yöntemler kısmında anlatılan ısı şoku (heat shock) ile transformasyon yöntemi kullanılarak *E.coli* DH10b suşu içerisine transforme edilmiştir. Transformasyon sonucu binlerce koloni elde edilmiştir (Şekil 20). DH10b içerisinde oluşturulan bu kütüphane ile (DH10b ASKA gen havuzu) ile çalışmalara devam edilmiştir. Ayrıca herhangi bir gen içermeyen pCA24N plazmidi kompetant hale getirilen DH10b suşu içerisine transforme edilmiştir. Böylece deneylerde kontrol olarak kullanılmak üzere DH10b(pCA24N) suşu elde edilmiştir (Şekil 20). Elde edilen kolonilerden tek koloni ekimi yapılarak, kontrol suşu olan DH10b(pCA24N) saflaştırılarak kullanılmıştır (Şekil 20).



Şekil 20. ASKA Plazmid havuzunun ve herhangi bir gen içermeyen pCA24N plazmidinin DH10b suşu içerisine transformasyonu sonucu elde edilen koloniler.

Şekil 20’de, a. ve b. ASKA plazmid havuzunun kompetant *E.coli* DH10b suşu içerisine gönderilmesi sonucunda elde edilen binlerce koloni. c. Negatif Kontrol olarak herhangi bir plazmidin transforme edilmediği *E.coli* DH DH10b 10B suşu’nun kloramfenikol içeren besi yerine ekilmesi sonucu elde edilen petri fotoğrafı. d. Herhangi bir gen içermeyen pCA24N plazmidinin DH10b suşu içerisine transformasyonu sonucu elde edilen koloniler görülmektedir.

4.3. Doksorubisin ile Seleksiyon Çalışmaları

Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen verilere göre, seleksiyon çalışmaları planlanmış ve gerekli hesaplamalar yapılmıştır. Seleksiyon aşamasında Gradient Yöntemi, Direkt Ekim Yöntemi, Zenginleştirme (Enrichment) Yöntemi ve Çizgi Ekim Yöntemi kullanılmıştır.

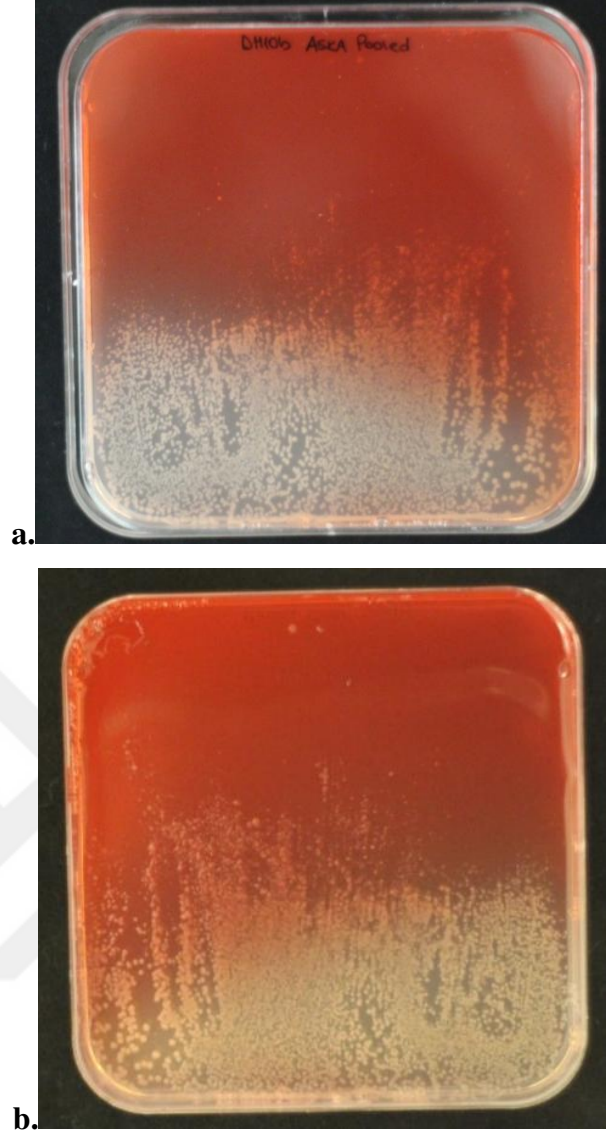
4.3.1. Gradient Yöntemi ile Tespit Edilen Tolerant Koloniler

DH10b ASKA gen havuzu seleksiyon yöntemlerinden biri olan gradient yöntemi ile doksorubisin seleksiyonundan geçirilmiştir. Burada doksorubisin konsantrasyonu 300 µg/ml'den başlatılarak 33 µM IPTG içeren LB-cm katı besi yerinde gradient olarak azaltılmıştır. Hazırlanan besi yerine kütüphane'nin yayma ekimi gerçekleştirilmiştir ve 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru üremenin azaldığı ve yüksek konsantrasyonda doksorubisin içeren bölge de kolonilerin tek tek seçilebildiği gözlemlenmiştir (Şekil 21).



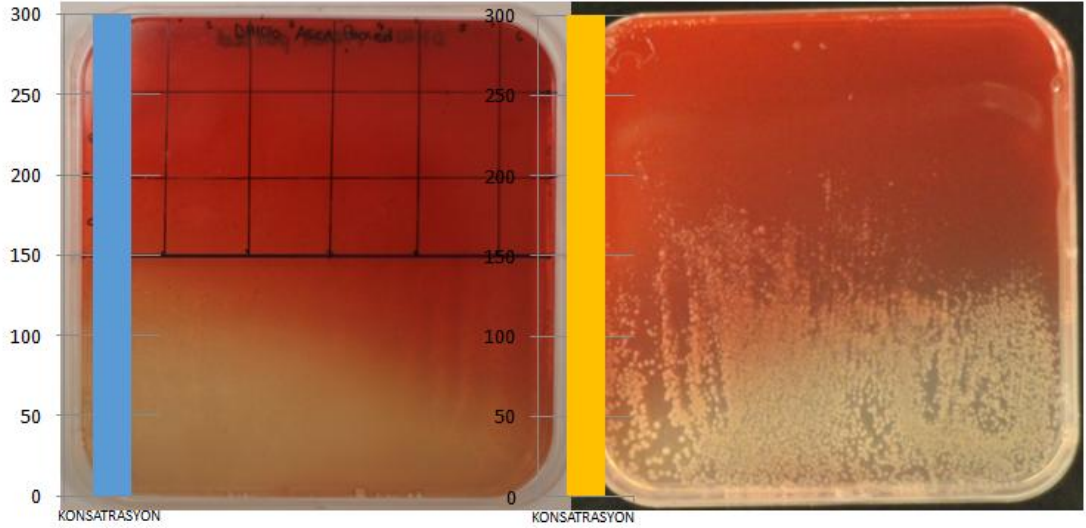
Şekil 21. Gradient yöntemi ile seleksiyon da kolonilerin gradient besi yerinde üreme yoğunluklarını gösteren petri fotoğrafı.

ASKA gen havuzundaki 4123 adet geni içeren DH10b suşunun (DH10b-ASKA pooled) en yüksek 300 µg/ml doksorubisin konsantrasyonu içeren gradient katı besi yerinde gece boyu inkübasyon sonuçları değerlendirilmiştir. Sonuçlar gözlemlenmiş ve fotoğraflanmıştır (Şekil 22).



Şekil 22. Gradient yönteminde inkübasyon sonucunda üreyen (DH10b-ASKA pooled) kolonileri.
a. Gradient petrisinin dışarıdan çekilmesi sonucu elde edilen petri görüntüsü. **b.** Gradient petrisinin içeriden çekilmesi sonucu elde edilen petri görüntüsü

300 µg/ml konsantrasyon ile dökülen gradient besi yerinde şekilde görüldüğü gibi doksorubisin miktarı az olan bölgede yoğun üreme, doksorubisin konsantrasyonu arttıkça da üremenin azaldığı görülmektedir. Konsantrasyon aralıklarının belirlenebilmesi için petri üzerinde grafiklendirme çalışması yapılmıştır (Şekil 23).

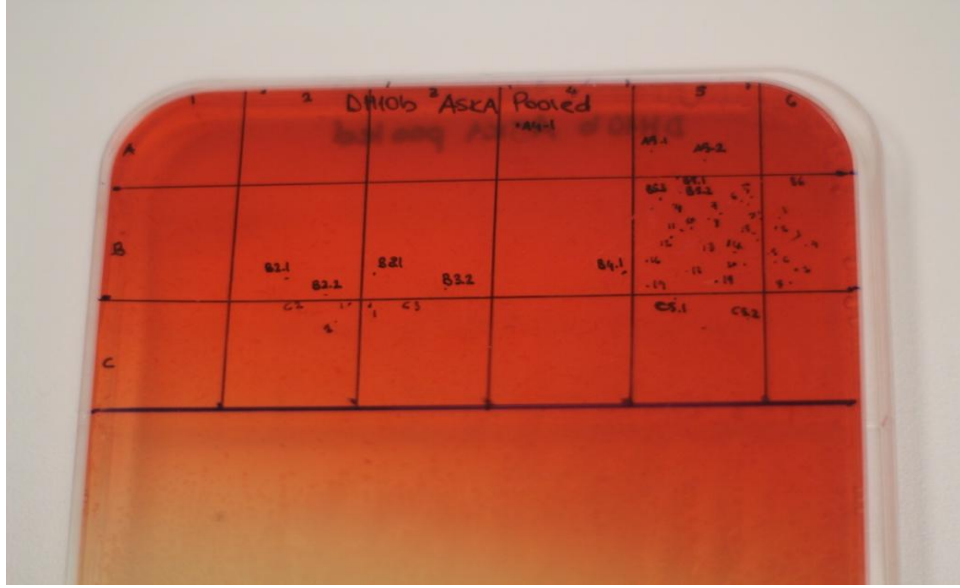


Şekil 23. Gradient Yöntemi kullanılarak hazırlanan besi yeri üzerinde bölgesel konsantrasyonların gösterilmesi.

Üreyen kolonilerin hangi konsantrasyon aralığında ürediklerini tespit etmek için petri üzerinde yapılan çizimler sonucunda tolerant kolonilerin yaklaşık gösterdikleri tolerans seviyeleri belirlenmiştir. Petri üzerinde yapılan çizimler sonucunda gösterilen konsantrasyon aralıklarında bulunan koloniler titizlikle işaretlenerek belirlenmiştir. Seçilen koloniler, üredikleri bölgeleri ifade edecek şekilde isimlendirilmiştir (Şekil 24).

150 µg/ml konsantrasyon üzerinde doksorubisin içeren bölgelerdeki koloniler hedef koloniler olarak belirlenmiştir. Petri üzerinde, 150 µg/ml-200 µg/ml; 200 µg/ml-250 µg/ml ve 250 µg/ml-300 µg/ml konsantrasyon aralığında olduğu bilinen üç konsantrasyon aralığı belirlenmiştir. Bu konsantrasyon aralıklarında üreme gösteren kolonilerin tolerant oldukları tespit edilmiştir.

Gradient petrisi üzerinde yapılan özenli değerlendirmeler sonucunda toleransı diğer kolonilere göre daha yüksek olduğuna karar verilen 43 koloni seçilmiştir. Bu toleranslı koloniler gradient petrisinde bulundukları lokasyonlara göre isimlendirilerek listelenmiş ve yaklaşık tolerans değerleri not alınmıştır. Gradient yöntemi ile seleksiyon sonucu seçilen tolerant koloniler ve bilgileri Tablo 8’de yer almaktadır.



Şekil 24. Gradient yöntemi ile seleksiyon sonucu seçilen tolerant kolonilerin gradient petrisinde isimlendirilmesi ve gösterilmesi.

Tablo 8. Gradient ile seleksiyon yöntemi sonucu tespit edilen tolerant koloniler.

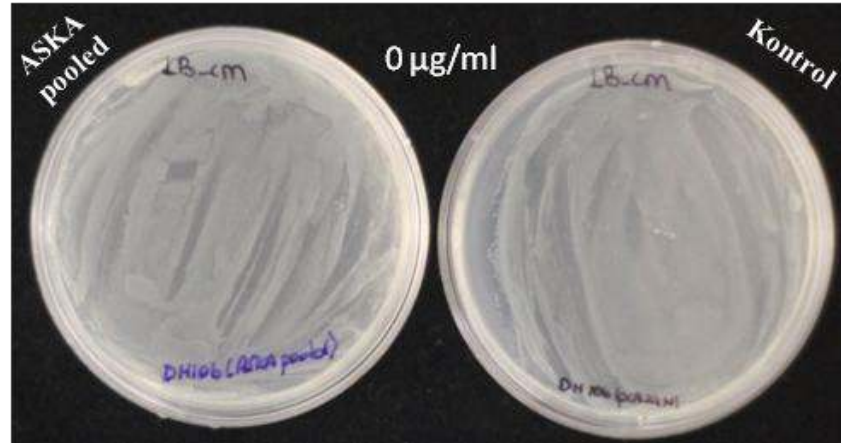
Örnek No	Lokasyon	Seçilen Konsantrasyon Aralığı	Örnek No	Lokasyon	Seçilen Konsantrasyon Aralığı
1	A4.1	250-300 µg/ml	23	B5.15	200-250 µg/ml
2	A5.1	250-300 µg/ml	24	B5.16	200-250 µg/ml
3	A5.2	250-300 µg/ml	25	B5.17	200-250 µg/ml
4	B2.1	200-250 µg/ml	26	B5.18	200-250 µg/ml
5	B2.2	200-250 µg/ml	27	B5.19	200-250 µg/ml
6	B3.1	200-250 µg/ml	28	B5.20	200-250 µg/ml
7	B3.2	200-250 µg/ml	29	B6.1	200-250 µg/ml
8	B4.1	200-250 µg/ml	30	B6.2	200-250 µg/ml
9	B5.1	200-250 µg/ml	31	B6.3	200-250 µg/ml
10	B5.2	200-250 µg/ml	32	B6.4	200-250 µg/ml
11	B5.3	200-250 µg/ml	33	B6.5	200-250 µg/ml
12	B5.4	200-250 µg/ml	34	B6.6	200-250 µg/ml
13	B5.5	200-250 µg/ml	35	B6.7	200-250 µg/ml
14	B5.6	200-250 µg/ml	36	B6.8	200-250 µg/ml
15	B5.7	200-250 µg/ml	37	C2.1	150-200 µg/ml
16	B5.8	200-250 µg/ml	38	C2.2	150-200 µg/ml
17	B5.9	200-250 µg/ml	39	C2.3	150-200 µg/ml
18	B5.10	200-250 µg/ml	40	C3.1	150-200 µg/ml
19	B5.11	200-250 µg/ml	41	C3.2	150-200 µg/ml
20	B5.12	200-250 µg/ml	42	C3.3	150-200 µg/ml
21	B5.13	200-250 µg/ml	43	Kontrol	0-50 µg/ml
22	B5.14	200-250 µg/ml			

Seçilen tolerant koloniler arasından hipertolerant kolonilerin seçilmesi amacıyla bu koloniler çizgi ekim yöntemi ile değerlendirilmiştir (Bakınız, izgi ekim ile seleksiyon sonuçları, şekil 39). Yüksek konsantrasyonlu bölgelerde üreyen koloniler seçilerek, plazmidleri sekans analizine gönderilmiştir.

4.3.2. Direkt Ekim Yöntemi ile Tespit Edilen Tolerant

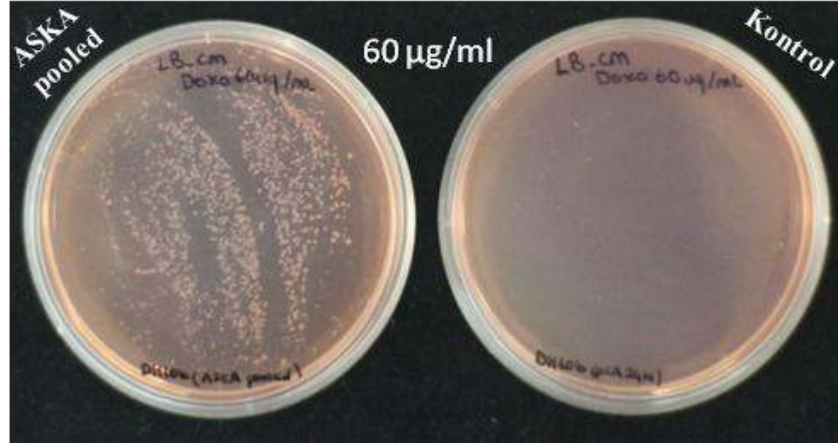
Direkt ekim yöntemi ile seleksiyonda, kontrol olarak DH10b(pCA24N) suşu ve seleksiyon için DH10b ASKA gen havuzu (DH10b ASKA gene pooled) hücre konsantrasyonu OD₆₀₀ 0,5 olacak şekilde 0 μg/ml, 60 μg/ml, 90 μg/ml, 125 μg/ml, 175 μg/ml 250 μg/ml, 500 μg/ml doksorubisin konsantrasyonlu, 33 μM IPTG içeren LB-cm besi yerlerine ekilmiştir ve 37 °C’de gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Gece boyunca inkübasyon sonucunda kontrol DH10b(pCA24N) suşu ve DH10b ASKA gen havuzu kütüphanesinde 0 μg/ml doksorubisin konsantrasyonlu besi yerinde aynı üreme grlmştir. Kontrol DH10b(pCA24N) suşunun ekimlerinde 0 μg/ml’den sonraki artan doksorubisin konsantrasyonlarında üreme görülmemiştir. ASKA gen havuzu kütüphanesinin ekimlerinde ise 60 μg/ml’den, 500 μg/ml konsantrasyonuna kadar tüm konsantrasyondaki besi yerlerinde üreme azalan şekilde grlmştir (şekil 25 - 31).



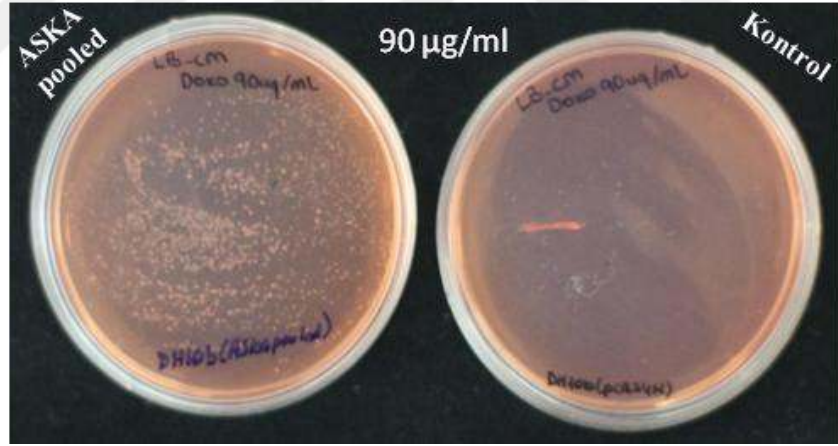
şekil 25. 0 μg/ml doksorubisin içeren katı besi yerine DH10b- ASKA pooled ve kontrol DH10b-pCA24N direkt ekimi.

DH10b(pCA24N) suşu ve DH10b ASKA gen havuzu kütüphanesinde 0 μg/ml doksorubisin konsantrasyonlu besi yerinde aynı üreme grlmřtir. Bu sonuç bize hücreleri uygun ve eřit konsantrasyonda ektięimizi göstermiştir.



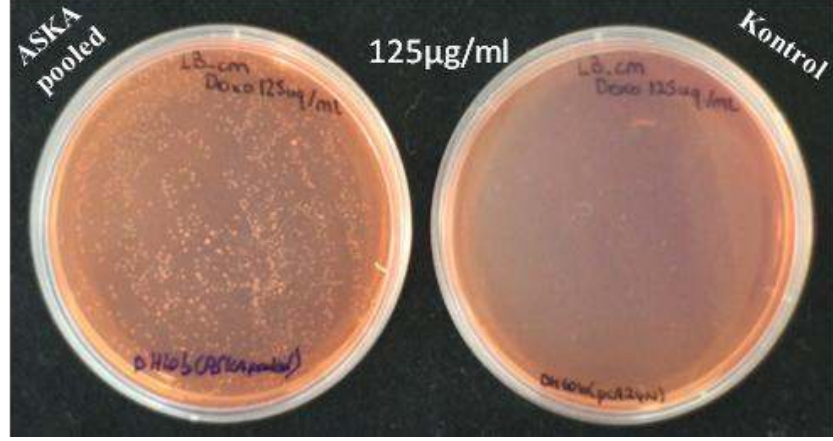
Şekil 26. 60 µg/ml doksorubisin içeren katı besiyerine DH10b-ASKA pooled ve kontrol DH10b - pCA24N direkt ekimi.

60 µg/ml doksorubisin içeren katı besiyerinde DH10b(pCA24N) suşunda hiç üreme görülmez iken DH10b ASKA gen havuzu kütüphanesinde binlerce koloni görülmüştür.



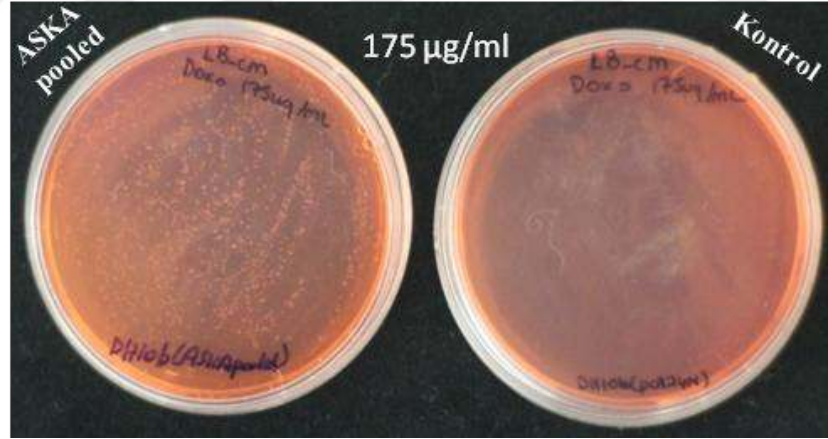
Şekil 27. 90 µg/ml doksorubisin içeren katı besiyerine DH10b -ASKA pooled ve kontrol DH10b - pCA24N direkt ekimi.

90 µg/ml doksorubisin içeren katı besiyerinde DH10b(pCA24N) suşunda hiç üreme görülmez iken DH10b ASKA gen havuzu kütüphanesinde binlerce koloni görülmüştür. 90 µg/ml doksorubisin konsantrasyonunda kontrol suşa göre toleranslı olan suşlar gözlemlenmiştir.



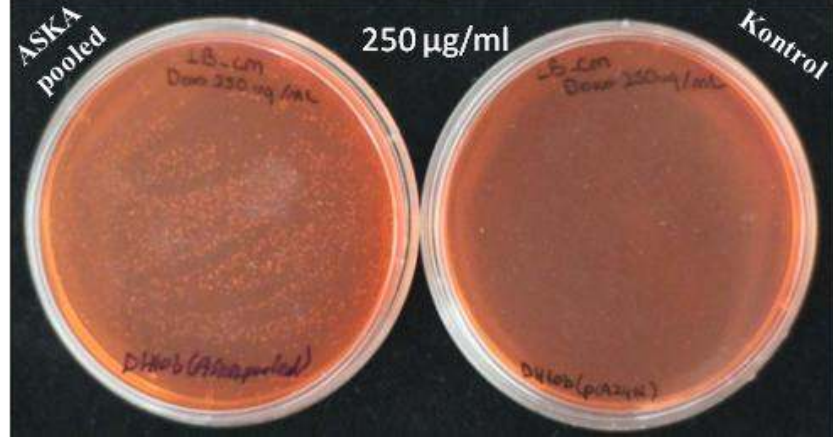
Şekil 28. 125 µg/ml dokсорubisin içeren katı besi yerine DH10b-ASKA pooled ve kontrol DH10b-pCA24N direkt ekimi.

125 µg/ml dokсорubisin içeren katı besi yerinde DH10b(pCA24N) suşunda hiç üreme görülmez iken DH10b ASKA gen havuzu kütüphanesinde binlerce koloni görülmüştür. Bu konsantrasyonda 60 µg/ml ve 90 µg/ml konsantrasyonlarına göre kısmen daha az koloni görülmüştür.



Şekil 29. 175 µg/ml dokсорubisin içeren katı besi yerine DH10b-ASKA pooled ve kontrol DH10b-pCA24N direkt ekimi.

175 µg/ml dokсорubisin içeren katı besi yerinde DH10b(pCA24N) suşunda hiç üreme görülmez iken DH10b ASKA gen havuzu kütüphanesinde binlerce koloni görülmüştür. Bu konsantrasyonda 60 µg/ml, 90 µg/ml ve 125 µg/ml konsantrasyonlarına göre kısmen daha az koloni görülmüştür.



Şekil 30. 250 µg/ml dokсорubisin içeren katı besi yerine DH10b-ASKA pooled ve kontrol DH10b-pCA24N direkt ekimi.

250 µg/ml dokсорubisin içeren katı besi yerinde DH10b(pCA24N) suşunda hiç üreme görülmez iken DH10b ASKA gen havuzu kütüphanesinde binlerce koloni görülmüştür. Bu konsantrasyonda 60 µg/ml, 90 µg/ml, 125 µg/ml ve 175 µg/ml konsantrasyonlarına göre kısmen daha az koloni görülmüştür. DH10b ASKA gen havuzu kütüphanesindeki klonların üreme durumları değerlendirildiğinde, kolonilerin tek tek düşmesi de göz önünde bulundurularak, bu konsantrasyonda seçim yapılması uygun görülmüştür.

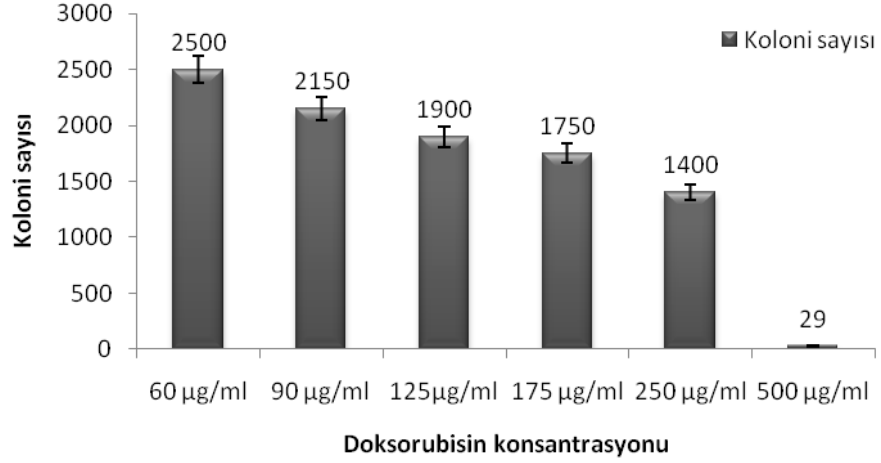


Şekil 31. 500 µg/ml dokсорubisin içeren katı besi yerine DH10b-ASKA pooled ve kontrol DH10b-pCA24N direkt ekimi.

En yüksek dokсорubisin konsantrasyonu olarak 500 µg/ml dokсорubisin içeren besi yerinde kontrol DH10b(pCA24N) suşunda hiç üreme görülmez iken DH10b ASKA gen

havuzu kütüphanesinde onlarca koloni görülmüştür. Bu koloniler direkt ekim seleksiyonu için en değerli koloniler olarak not alınmıştır.

Direkt ekim ile seleksiyon yöntemi değerlendirildiğinde, koloni sayıları ilaç konsantrasyonu arttıkça azaldığı görülmüştür (Şekil 32).



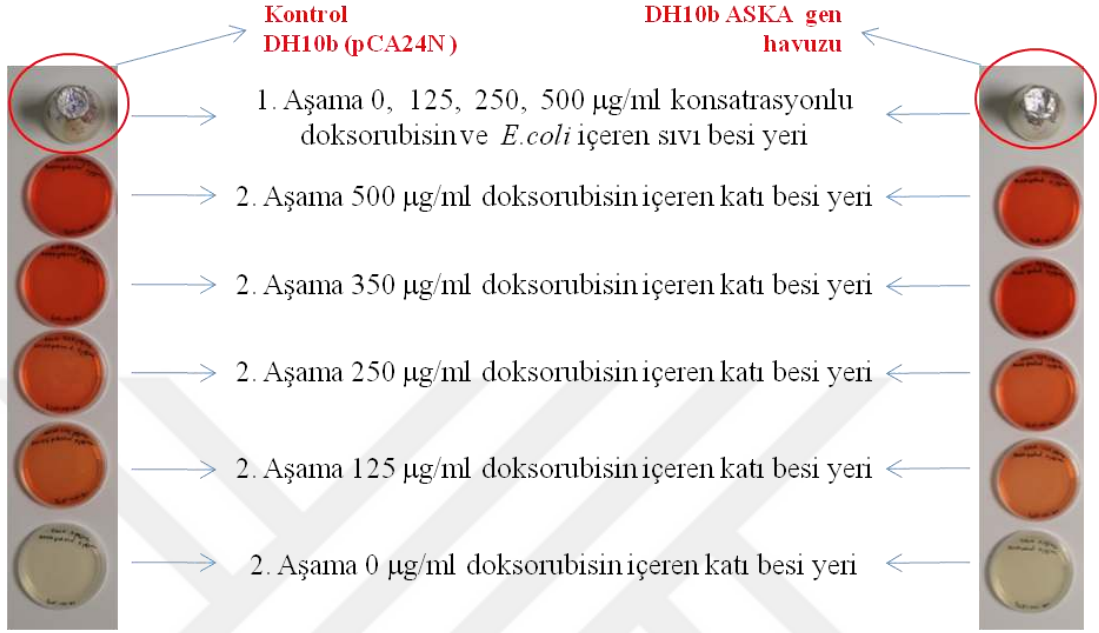
Şekil 32. Direkt ekim ile seleksiyon yönteminde Doksorubisin konsantrasyonu ve koloni sayısı ilişkisinin grafik ile gösterilmesi.

Direkt ekim ile seleksiyon sonucunda, 250 µg/ml ve 500 µg/ml doksorubisin içeren besiyerlerinden tolerant olduğu düşünülen koloniler seçilmiştir. 250 µg/ml doksorubisin içeren besi yerinden 24 koloni, 500 µg/ml doksorubisin içeren besi yerinden 19 koloni seçilmiştir. Toplamda seçilen 43 adet tolerant olduğu düşünülen kolonilerden hipertolerantların seçilmesi için çizgi ekim seleksiyon yöntemi kullanılmıştır (Bakınız, çizgi ekim ile seleksiyon, Şekil 38).

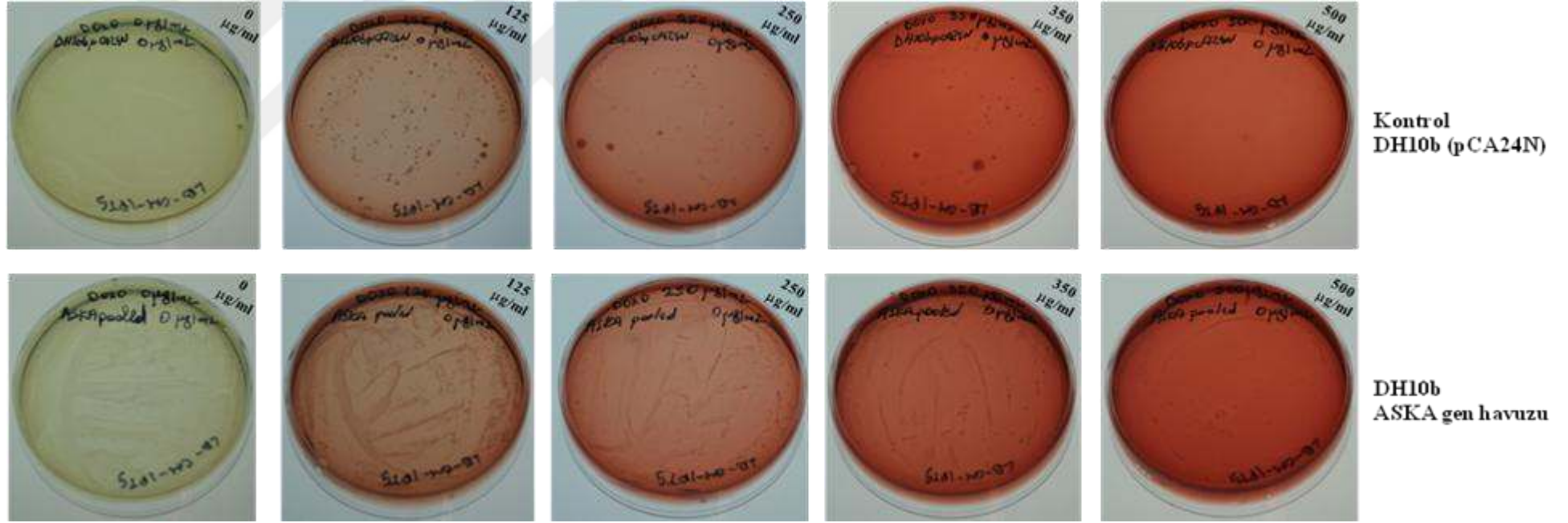
4.3.3. Zenginleştirme (Enrichment) Yöntemi ile Seleksiyon

Seleksiyon çalışmalarının en önemlilerinden biri olan Zenginleştirme ile seleksiyon yöntemi iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada, kontrol DH10b(pCA24N) suşu ve DH10b ASKA gen havuzu kütüphanesinde bulunan klonlar 0 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml konsantrasyonlarında doksorubisin ve 33 µM IPTG içeren LB-CM besiyerlerinde, her 12 saatte bir doksorubisinli besiyerleri tazelenerek, 3 tekrar şeklinde büyütülmüştür. İkinci aşamada, büyütülen kontrol serisi ve DH10b ASKA gen havuzu serisi, 0 µg/ml, 125 µg/ml,

250 µg/ml, 350 µg/ml, 500 µg/ml dokсорubisin konsantrasyonlu katı besi yerlerine yayma ekimi yöntemi ile inoküle edilmiştir (Şekil 33 - Şekil 37).

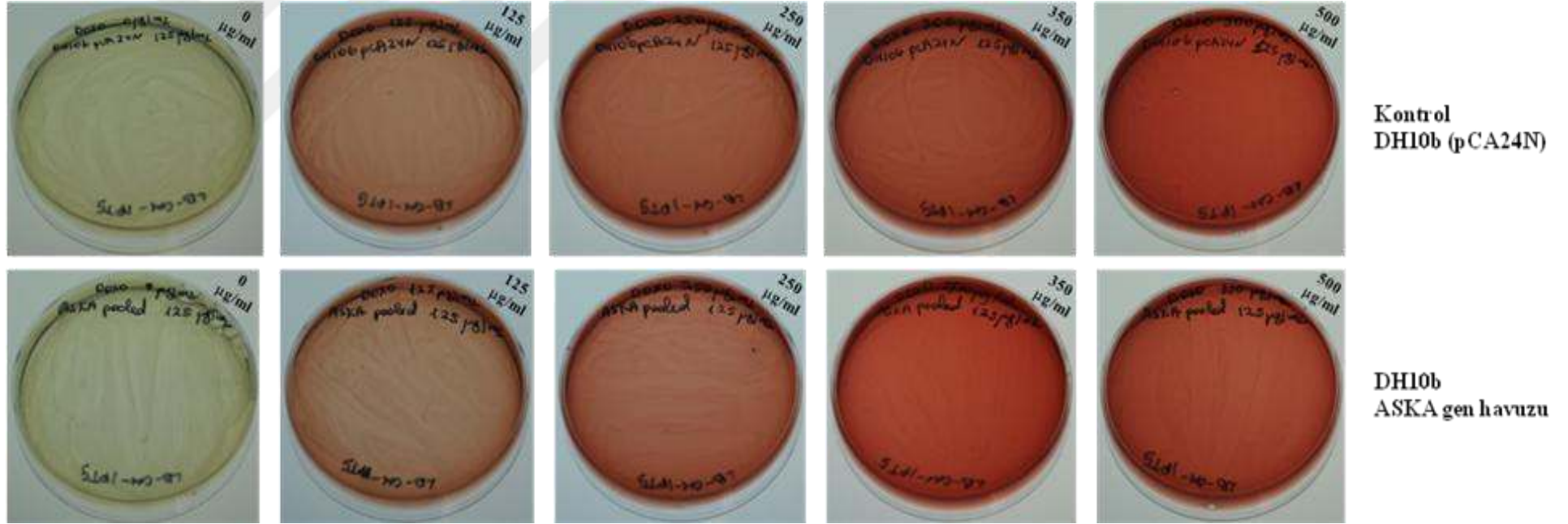


Şekil 33. 1. Aşamadan gelen 0, 125, 250, 500 µg/ml dokсорubisin konsantrasyonlu sıvı besi yerindeki suşların, 0 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 350 µg/ml, 500 µg/ml dokсорubisin konsantrasyonlu katı besi yerlerine ekimi.



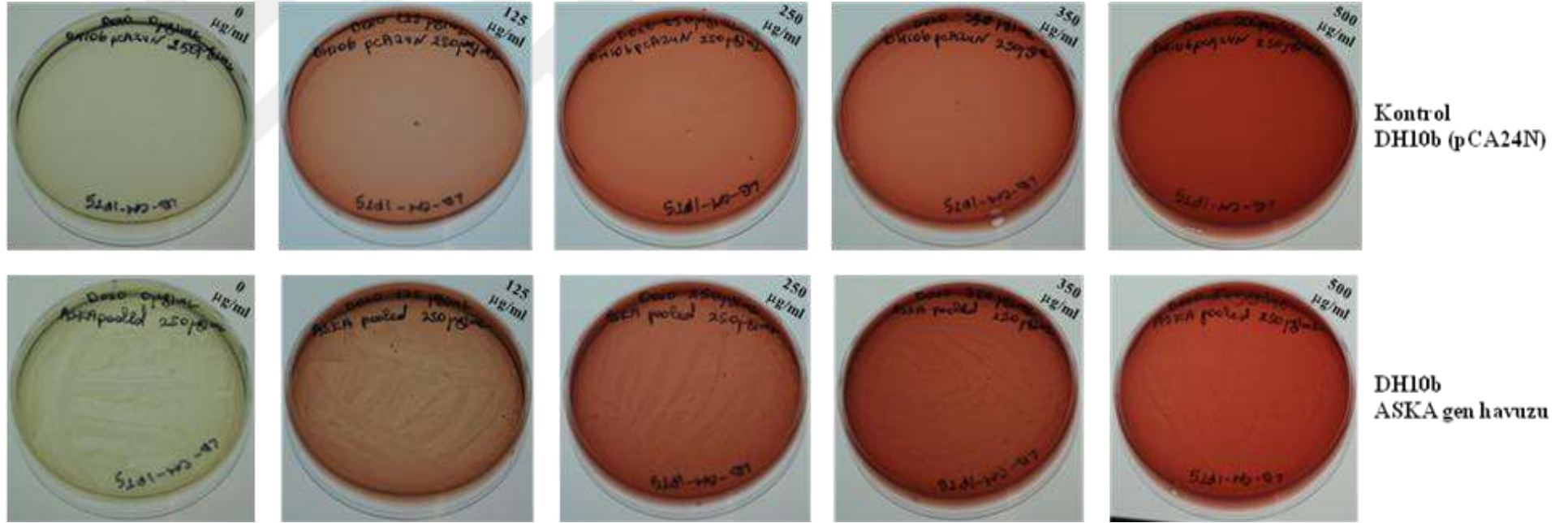
Şekil 34. DH10b-pCA24N ve DH10b-ASKA Pooled suşlarının zenginleştirme yöntemi ile seleksiyon'un birinci aşamasında doksorubisin içermeyen besiyerlerinde büyütülen örneklerin artan konsantrasyonlarda doksorubisin içeren katı besiyerlerine ekim sonuçları.

Doksorubisin içermeyen sıvı besiyerlerinde zengileştirme yöntemi tekniğine göre büyütülen kontrol DH10b(pCA24N) suşu ve DH10b ASKA gen havuzu kütüphanesinde bulunan klonlar değerlendirilmiştir. Kontrol ile DH10b ASKA gen havuzu arasındaki üreme farkı dikkat çekmiştir.



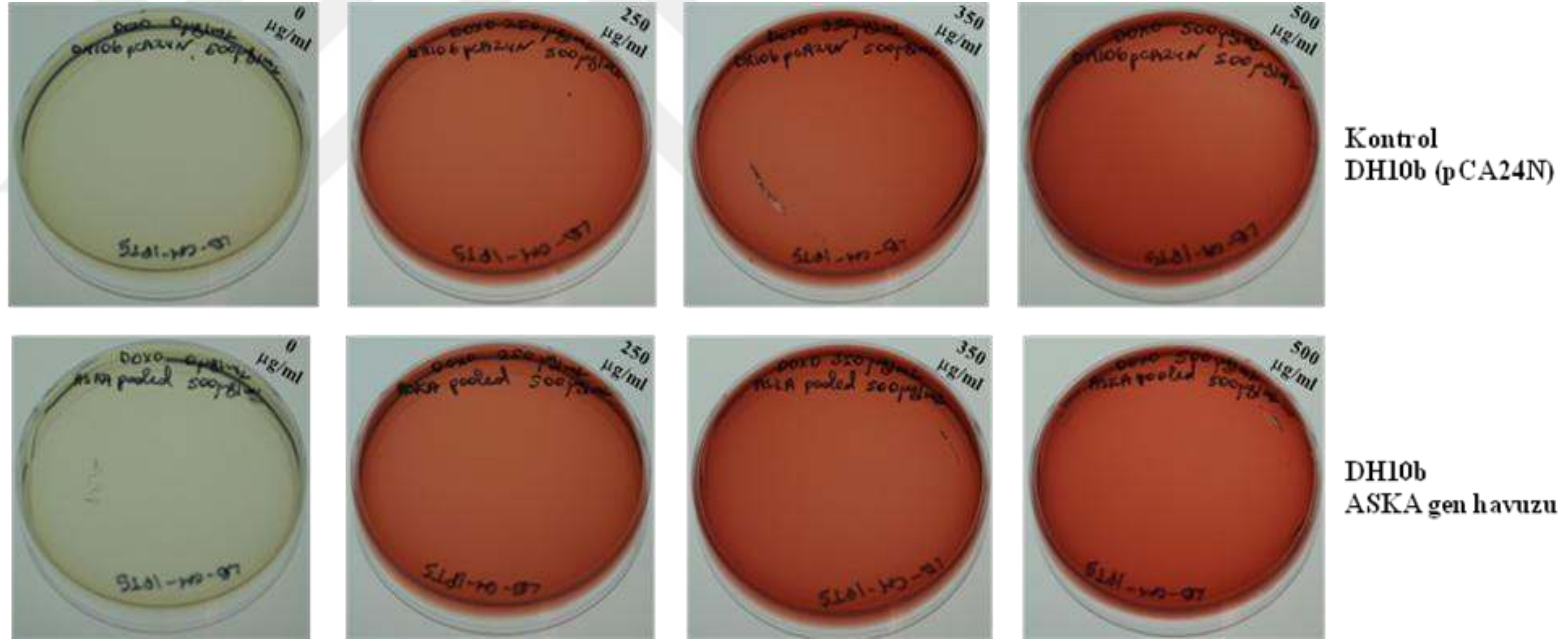
Şekil 35. DH10b-pCA24N ve DH10b-ASKA Pooled suşlarının zenginleştirme yöntemi ile seleksiyon'un birinci aşamasında 125 µg/ml dokсорubisin içeren besiyerlerinde büyütülen örneklerin artan konsantrasyonlarda dokсорubisin içeren katı besiyerlerine ekim sonuçları.

Sonuçlar değerlendirildiğinde, zenginleştirme yöntemi ile seleksiyon'da 125 µg/ml dokсорubisin seçici konsantrasyon olarak görülmemiştir. Burada kontrol suşunda yayma şeklinde üremeler görülme, DH10b ASKA gen havuzunda ise kontrole göre çok daha yoğun üreme görülmektedir. Ancak üremelerin yayma şeklinde olmasından dolayı bu konsantrasyondan klon seçilmesi gerçekleşmemiştir. 125 µg/ml dokсорubisin konsantrasyonu sıvı besi yerinde seçim sağlayacak kadar öldürücü bir doz olarak görülmemiştir.



Şekil 36. DH10b-pCA24N ve DH10b-ASKA Pooled suşlarının zenginleştirme yöntemi ile seleksiyon'un birinci aşamasında 250 µg/ml dokсорubisin içeren besiyerlerinde büyütülen örneklerin artan konsantrasyonlarda dokсорubisin içeren katı besiyerlerine ekim sonuçları.

Sonuçlar değerlendirildiğinde, zenginleştirme yöntemi ile seleksiyon'da 250 µg/ml dokсорubisin konsantrasyonu DH10b ASKA gen havuzundan tolerant klonların seçilebilmesi için uygun konstrasyon olarak görülmüştür. 250 µg/ml dokсорubisin içeren sıvı besi yerinde büyütülen kontrol ekilen hiçbir katı besi yerinde üreme göstermemiştir. 250 µg/ml dokсорubisin konsantrasyonu bu yöntemde kontrol için öldürücü doz olduğu görülmüştür. DH10b ASKA gen havuzundan tolerantlı klonların seçilimi bu seriden gerçekleştirilmiştir.



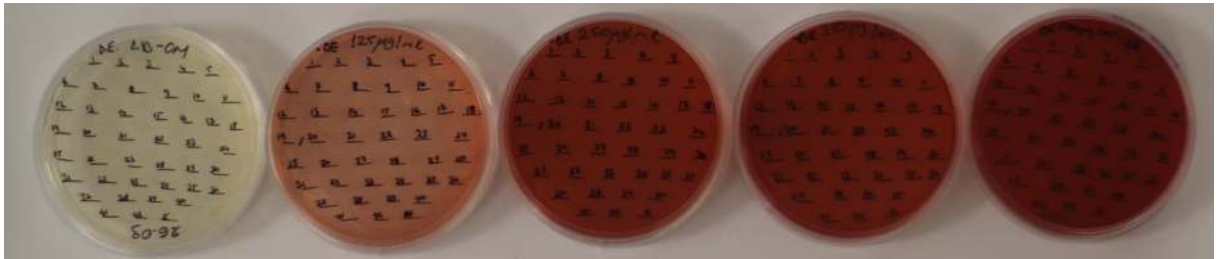
Şekil 37. DH10b-pCA24N ve DH10b-ASKA Pooled suşlarının zenginleştirme yöntemi ile seleksiyon'un birinci aşamasında 500 µg/ml dokсорubisin içeren besiyerlerinde büyütülen örneklerin artan konsantrasyonlarda dokсорubisin içeren katı besiyerlerine ekim sonuçları.

Sonuçlar değerlendirildiğinde, zenginleştirme yöntemi ile seleksiyon'un birinci aşamasında 500 µg/ml dokсорubisin konsantrasyonu içeren sıvı besiyerlerinde büyütülen DH10b(pCA24N) suşu ve DH10b ASKA gen havuzundaki klonların artan dokсорubisin konsantrasyonlu katı besiyerlerine ekimi sonucu hiçbir üreme tespit edilememiştir.

Zenginleştirme yöntemi ile seleksiyon sonucunda, birinci aşamada 250 µg/ml konsantrasyonunda doksorubisine maruz bırakılan DH10b ASKA gen havuzunun içerdiği klonlardan seçilebilmiştir. 250 µg/ml sıvı besi yerinde büyütülerek, artan doksorubisin konsantrasyonlarında katı besiyelerine ekilen kütüphanede 250 µg/ml doksorubisin konsantrasyonu içeren katı besi yerinden 21 klon, 350 µg/ml doksorubisin konsantrasyonu içeren katı besi yerinden 17 klon, 500 µg/ml doksorubisin konsantrasyonu içeren katı besi yerinden 5 klon seçilmiştir. Bu yöntem sonucunda toplamda 43 adet doksorubisine tolerant olduğu düşünülen klonlar çoğaltılması ve canlılıklarından emin olunması adına doksorubisin içermeyen LB katı besiyelerine çizgi ekim yöntemi ile ekilmiştir.

4.3.4. Çizgi Ekim Yöntemi ile Hipertolerantların Seçilmesi

Direkt Ekim, Gradient ve Enrichment yöntemlerinde elde edilen bulgular incelenmiştir. Seleksiyon yöntemlerinden toplamda tolerant olduğu düşünülen 129 koloni seçilerek çizgi ekimleri gerçekleştirilmiştir. Bunlardan gradient ve direkt ekim yöntemlerinden seçilen kolonilerin çizgi ekimi artan konsantrasyonlarda (0 µg/ml, 250 µg/ml, 350 µg/ml, 500 µg/ml) doksorubisin içeren katı besi yerinde gerçekleştirilmiştir. Bu sayede tolerantlardan hipertolerant olan klonların seçilmesi için ek bir seleksiyon sağlanmıştır (Şekil 38 ve Şekil 39). Zenginleştirme yönteminde örnekler tekrar tekrar ilaca maruz bırakıldığı için bu yöntemden gelen kolonilerin çizgi ekimi doksorubisin içermeyen katı besi yerine yapılmıştır. Bu sayede bu klonların canlılıkları test edilmiştir (Şekil 40).



Şekil 38. Direkt Ekim yöntemi ile seleksiyon sonucu seçilen tolerant klonların çizgi ekim yöntemi ile seleksiyonu.



Şekil 39. Gradient yöntemi ile seleksiyon sonucu seçilen toleran klonların çizgi ekim yöntemi ile seleksiyonu.



Şekil 40. Zenginleştirme (Enrichment), Direkt Ekim ve Gradient yöntemi ile seleksiyon sonucu seçilen toleran klonların çizgi ekim yöntemi canlandırılması.

Çizgi ekim yöntemi sonucunda, direkt ekim yönteminden 10 adet hipertolerant klon, gradient yöntemi ile seleksiyon yönteminden 10 adet hipertolerant klon, zenginleştirme yöntemi ile seleksiyon'dan 14 adet hipertolerant klon olmak üzere toplamda 34 adet hipertolerant koloni seçilmiştir (Tablo 9. ve Tablo 10.).

Tablo 9. Seleksiyon çalışmalarında seçilen örnek sayıları.

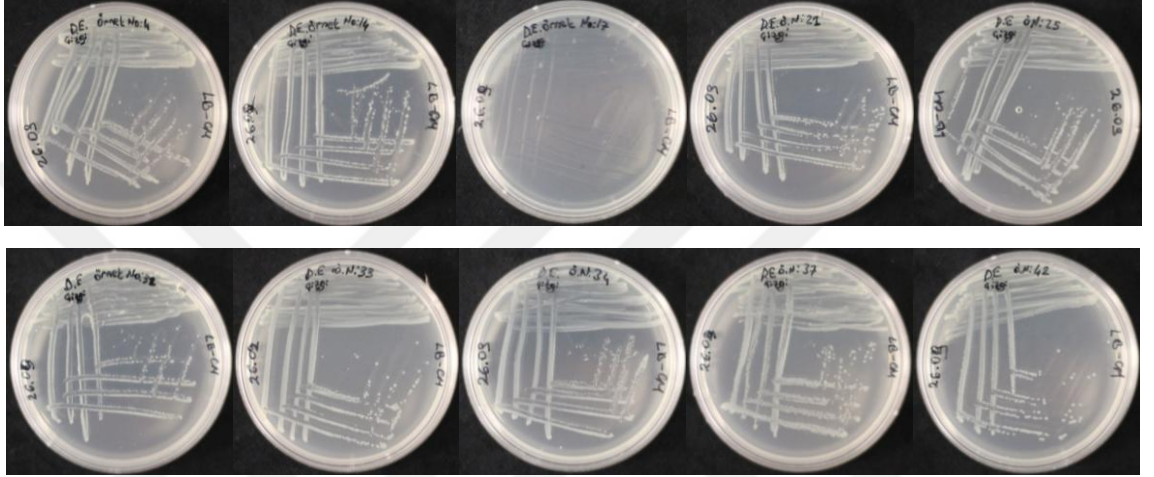
Yöntem	Seçilen Örnek Sayısı
Direkt Ekim Yöntemi	10
Gradient Yöntemi	10
Enrichment Yöntemi	14

Tablo 10. Seleksiyon yöntemleri sonucu seçilen hipertolerant koloniler.

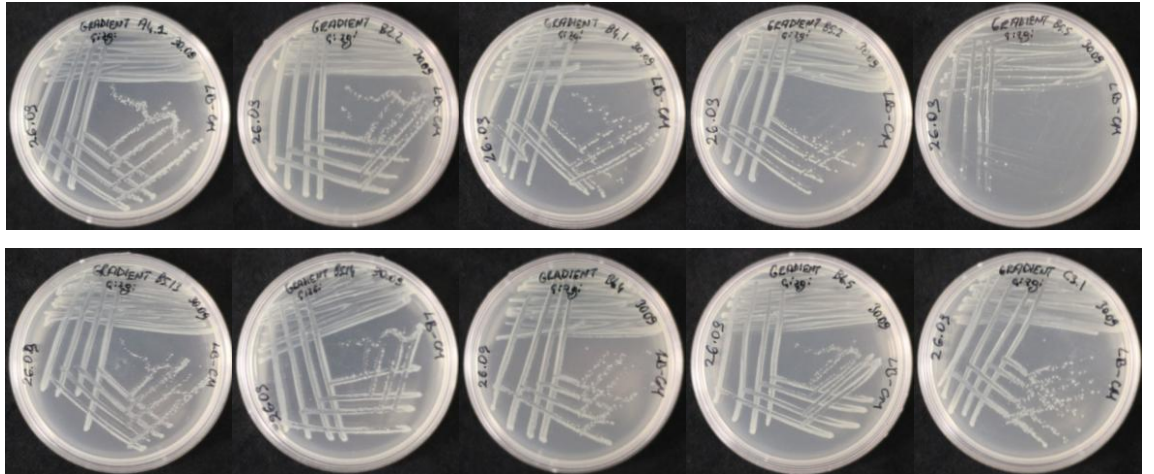
Seçildiği seleksiyon yöntemi	Koloni adı	Tolerans gösterdiği yaklaşık konsantrasyon
Direkt Ekim	DE4	500 µg/ml
Direkt Ekim	DE14	500 µg/ml
Direkt Ekim	DE17	500 µg/ml
Direkt Ekim	DE32	250 µg/ml
Direkt Ekim	DE42	250 µg/ml
Direkt Ekim	DE34	250 µg/ml
Direkt Ekim	DE37	250 µg/ml
Direkt Ekim	DE25	250 µg/ml
Direkt Ekim	DE33	250 µg/ml
Direkt Ekim	DE21	250 µg/ml
Gradient	G-A4.1	250-300 µg/ml
Gradient	G-B2.2	200-230 µg/ml
Gradient	G-B4.1	200-250 µg/ml
Gradient	G-B5.2	200-250 µg/ml
Gradient	G-B5.5	200-250 µg/ml
Gradient	G-B5.13	200-250 µg/ml
Gradient	G-B5.14	200-250 µg/ml
Gradient	G-B6.4	200-250 µg/ml
Gradient	G-B6.5	200-250 µg/ml
Gradient	G-C3.1	150-2500
Zenginleştirme (Enrichment)	E-12	250 µg/ml
Zenginleştirme (Enrichment)	E-21	250 µg/ml
Zenginleştirme (Enrichment)	E-22	250 µg/ml
Zenginleştirme (Enrichment)	E-7	250 µg/ml
Zenginleştirme (Enrichment)	E-29	350 µg/ml
Zenginleştirme (Enrichment)	E-30	350 µg/ml
Zenginleştirme (Enrichment)	E-31	350 µg/ml
Zenginleştirme (Enrichment)	E-35	350 µg/ml
Zenginleştirme (Enrichment)	E-40	350 µg/ml
Zenginleştirme (Enrichment)	E-41	350 µg/ml
Zenginleştirme (Enrichment)	E-42	350 µg/ml
Zenginleştirme (Enrichment)	E-2	500 µg/ml
Zenginleştirme (Enrichment)	E-3	500 µg/ml
Zenginleştirme (Enrichment)	E-4	500 µg/ml

4.3.5. Seçilen Hipertolerant Kolonilerin Tek Koloni Yöntemi ile Çoğaltılması ve Saflaştırılması

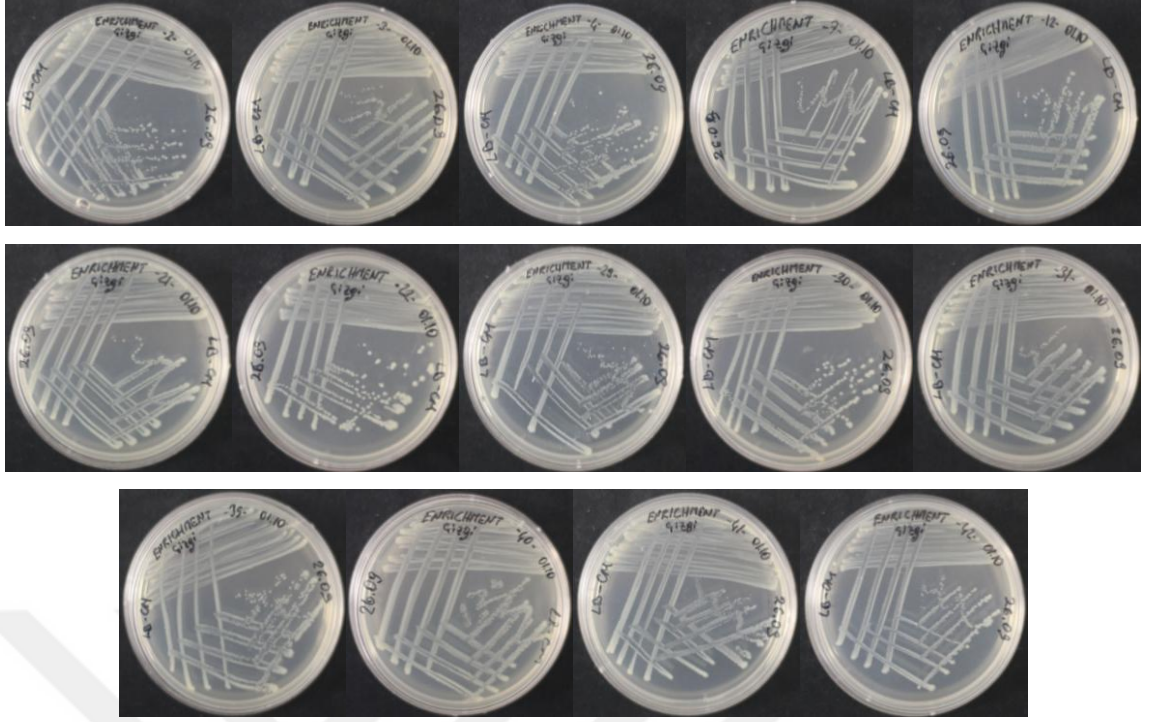
Seleksiyon yöntemlerinde tolerant olarak belirlenen ve sonrasında çizgi ekim yönteminde hipertolerant olarak seçilen kolonilerin saflaştırılması ve çoğaltılması için her bir hipertolerant olduğu düşünülen koloninin tek koloni ekimi yapılmıştır (Şekil 41, Şekil 42, Şekil 43).



Şekil 41. Direkt ekim ile seleksiyon yöntemi sonucu seçilen hipertolerant klonların tek koloni ekim sonuçları.



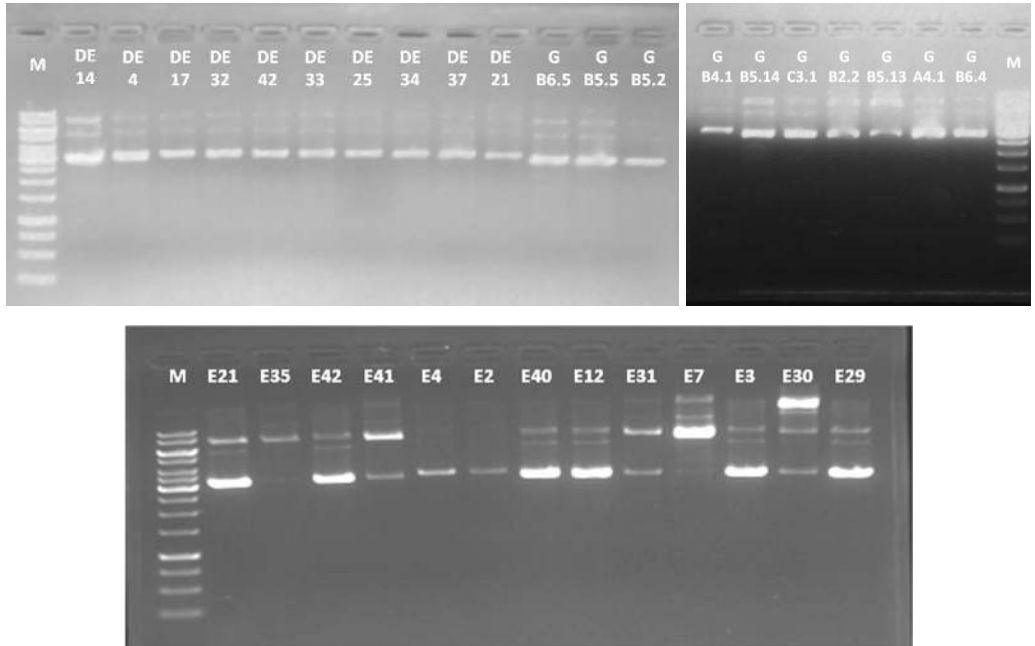
Şekil 42. Gradient ile seleksiyon yöntemi sonucu seçilen hipertolerant klonların tek koloni ekim sonuçları.



Şekil 43. Zenginleştirme (Enrichment) ile seleksiyon yöntemi sonucu seçilen hipertolerant klonların tek koloni ekim sonuçları.

4.4. Hipertolerant Klonların İçerdiği Rekombinant Plazmidlerin Eldesi

Geneall plazmid izolasyon kiti kullanılarak yapılan plazmid izolasyonu görüntüleme yapılmak üzere agaroz jele yüklenmiştir. Yükleme miktarları yöntemler kısmında yer almaktadır. Jel görüntüleri şekil 44’de yer almaktadır. (Şekil 44).



Şekil 44. Hipertolerant kolonilerin rekombinant plazmidlerinin izolasyon jel (%0,8) görüntüsü.

4.5. Rekombinant Plazmidlerdeki Insert Sekanslarının Belirlenmesi ve Bazı Biyoinformatik Analizler

Bu aşamada hipertolerant kolonilerin rekombinant plazmidleri izole edilip hizmet alımı ile plazmidlerinin taşıdıkları insert gen dizileri sekanslanmıştır. Bu gen dizilerine ait sekans bilgileri Ek1’de sunulmuştur. Elde edilen sekans bilgileri NCBI Blast ve ECOCY veritabanları taranarak BlastX analizleri yapılarak, eşleştikleri en yakın gen bilgileri tespit edilmiştir (Tablo 11).

Tablo 11. Hipertolerant kolonilerin rekombinant plazmidlerinin taşıdıkları insertlerin, BlastX analizi sonucu elde edilen gen bilgileri.

Örnek İsmi	Aktivite	Query cover	Ident
PDE-4	<i>recA</i> , DNA recombination/repair protein	99%	100%
PDE-14	<i>recA</i> , DNA recombination/repair protein	100%	100%
PDE-17	<i>mdtK</i> , multidrug efflux pump	90%	100%
PDE-21	<i>mdtK</i> , multidrug efflux pump	99%	100%
PDE-25	<i>mdtK</i> , multidrug efflux pump	99%	100%
PDE-32	<i>mdtK</i> , multidrug efflux pump	90%	100%
PDE-33	<i>mdtK</i> , multidrug efflux pump	90%	100%
PDE-34	<i>mdtK</i> , multidrug efflux pump	90%	100%
PDE-37	<i>mdtK</i> , multidrug efflux pump	100%	100%
PDE-42	<i>mdtK</i> , multidrug efflux pump	80%	100%
PG-A4.1	<i>recA</i> , DNA recombination/repair protein	99%	100%
PG-B2.2	<i>recA</i> , DNA recombination/repair protein	99%	100%
PG-B4.1	<i>mdtK</i> , multidrug efflux pump	90%	100%
PG-B5.2	<i>recA</i> , DNA recombination/repair protein	98%	100%
PG-B5.5	<i>recA</i> , DNA recombination/repair protein	99%	100%
PG-B5.13	<i>recA</i> , DNA recombination/repair protein	99%	100%
PG-B5.14	<i>recA</i> , DNA recombination/repair protein	99%	100%
PG-B6.4	<i>recA</i> , DNA recombination/repair protein	99%	100%
PG-B6.5	<i>recA</i> , DNA recombination/repair protein	99%	100%
PG-C3.1	<i>recA</i> , DNA recombination/repair protein	99%	100%
PE-2	<i>mdtK</i> , multidrug efflux pump	90%	100%
PE-3	<i>recA</i> , DNA recombination/repair protein	99%	100%
PE-4	<i>mdtK</i> , multidrug efflux pump	90%	100%
PE-7	<i>recA</i> , DNA recombination/repair protein	70%	70%
PE-12	<i>recA</i> , DNA recombination/repair protein	99%	100%
PE-21	<i>recA</i> , DNA recombination/repair protein	99%	100%
PE-22	<i>recA</i> , DNA recombination/repair protein	96%	100%
PE-29	<i>recA</i> , DNA recombination/repair protein	99%	100%
PE-30	<i>recA</i> , DNA recombination/repair protein	99%	100%
PE-31	<i>recA</i> , DNA recombination/repair protein	100%	100%
PE-35	<i>recA</i> , DNA recombination/repair protein	99%	100%
PE-40	<i>recA</i> , DNA recombination/repair protein	99%	100%
PE-41	<i>recA</i> , DNA recombination/repair protein	99%	100%
PE-42	<i>recA</i> , DNA recombination/repair protein	99%	100%

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında *E.coli* genomuna ait 4123 adet genin doksorubisin antikanser ajanı ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Bunun için, oluşturulan *E. coli* gen havuzu farklı konsantrasyonlarda doksorubisin içeren ortamlarda yetiştirilerek, havuz içerisinden doksorubisine karşı toleranslı olan klonların seçimleri gerçekleştirilmiştir.

Bu amaç doğrultusunda öncelikle, kullanılacak doksorubisin konsantrasyonları belirleme çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda bir çok optimizasyon deneyleri yapılarak, doksorubisin'in katı ve sıvı besiyerlerinde toksisitesine bakılmıştır. Yapılan çalışmalarda, MIC, Spot Test, Disk difüzyon ve Büyüme eğrisi teknikleri kullanılmıştır. Burada Doksorubisin'in sıvı ve katı besiyerlerinde farklı dinamikler gösterdiği görülmüştür. Artan ilaç konsantrasyonlarında DMSO içerisinde gerektiği kadar çözünemeyen doksorubisin çökelti oluşturmuştur. Homojen bir karışım elde edilemediği için her aşamada anlamlı sonuçlar elde etmek mümkün olmamıştır. Bunun üzerine katı besiyerinde çalışmalara devam edilmesine karar verilmiştir. Bu sırada, ayrıca farklı *E.coli* suşlarının, doksorubisine karşı farklı toleransa sahip oldukları gözlemlenmiştir.

Büyüme eğrisi çalışmalarında, seçilen tüm klonların beklenen konsantrasyonlarda doksorubisine karşı duyarlılık göstermemesi, çalışmalarda farklı *E.coli* suşlarının da denenmesi fikrini ortaya çıkarmıştır. Bunun üzerine optimizasyon çalışmaları olan spot testlerinde farklı *E.coli* suşları ile spot testleri yapılmış ve doksorubisin ajanının DH10b suşu üzerinde etkili olduğu, ancak diğer suşlarda beklenen etkiyi göstermediği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, seleksiyon çalışmalarına DH10b suşu ile devam edilmesinin daha uygun olacağı kararına varılmıştır. Kütüphane DH10b *E.coli* suşuna transforme edilerek, DH10b ASKA pooled elde edilmiştir. DH10b *E.coli* suşunun disk difüzyon yöntemi ile doksorubisin tolerans seviyeleri belirlenmiştir.

Elde edilen DH10b ASKA pooled, farklı tekniklerde seleksiyon aşamalarından geçirilmiştir. Bunun için (Zenginleştirme) Enrichment, Gradient Ekim, Direkt Ekim ve Çizgi Ekim yöntemleri kullanılmıştır. DH10b ASKA pooled, her bir yöntem ile farklı doksorubisin konsantrasyonu içeren ortamlarda büyütülmüş ve havuz içerisindeki doksorubisine karşı toleranslı olan klonların avlanması sağlanmıştır. Yabani tip oranla daha yüksek doksorubisin konsantrasyonunda üreme gösteren klonlar seçilerek, aralarından hipertolerantların belirlenmesi için tekrardan seleksiyon işlemlerinden geçirilmiştir. Hipertolerant klonlar belirlendikten sonra, içedikleri rekombinant plazmidler izole edilerek,

plazmidlerin taşıdıkları insert gen dizileri, hizmet alımı yapılarak, sanger yöntemi ile sekanslanmış ve biyoinformatik analizler ile sekanslanan gen dizilerinin aktiviteleri belirlenmiştir. Böylelikle, hücrenin doksorubisin kemoterapotik ajanına karşı tolerans sağlamasında görevli olabileceği düşünülen genler ve aktiviteleri tespit edilmiştir. Bunlardan bir tanesi DNA rekombinasyon ve tamir mekanizmasında görevli olan RecA proteinini kodlayan *recA* geni olup, diğeri de bir multidrug efluks pompası (ilacı hücre dışına atabilen) olan MdtK proteinini kodlayan, *mdtK* genidir.

5.1. RecA, DNA rekombinasyon ve tamir mekanizması

Escherichia coli, hücrede DNA hasarının onarımı için bir takım enzimatik yollara sahiptir. “DNA Onarım Enzimleri” sınıfı altında toplanan enzimler, bu yollarda görev almaktadır. Bunlardan en önemlilerinden *Escherichia coli* K-12’de bulunan, RecA proteini çeşitli biyokimyasal fonksiyonlara hizmet etmektedir. RecA, hem DNA sarmal değişim reaksiyonlarını katalize ederek homolog rekombinasyonda görev yapmakta, hem de represör protein LexA üzerindeki etkisiyle SOS tepkisinin DNA hasarına verdiği cevabı uyarmak için düzenleyici bir protein görevi görmektedir (Adikesavan ve ark, 2011, Fernandez ve ark, 2000).

Bu bulgulara göre RecA, DNA’ya zarar veren ajanlara, DNA replikasyon inhibitörlerine, asit biyosentezi inhibitörlerine, iyon kanalı inhibitörlerine ve ayrıca Ca^{2+} bağlayıcı protein inhibitörleri de dâhil olmak üzere, çeşitli kimyasallara karşı direnç sağlamaktadır (Maeda, 2019). Buna ek olarak, glutamin ve diğer amino asitlerin biyosentezinin düzenlenmesinde de rol oynamaktadır (Maeda, 2019). Ayrıca, DNA hasarı sonucunda meydana gelebilecek mutasyonların engellenmesi için çok önemli bir protein olarak bilinmektedir (Kuzminov, 1999; Courcelle, 2003).

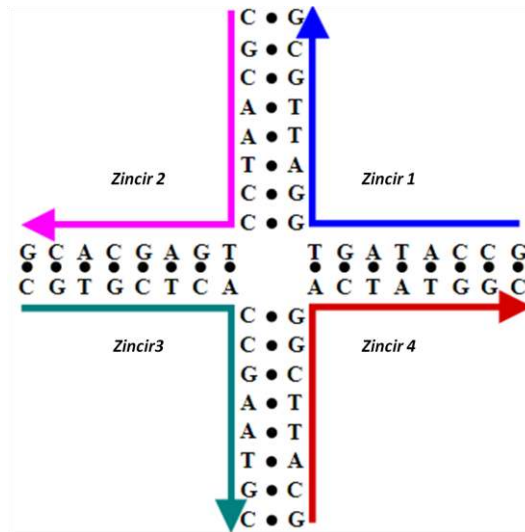
Kimyasal ajanlar ve UV ışınması da dâhil olmak üzere, çeşitli nedenlerle DNA hasarı meydana gelebilmektedir (Maeda, 2019). *recA* geni herhangi bir operonun parçası olmayıp, genomda, çevresinde DNA metabolizmasıyla ilgili genlerin olmadığı bilinmektedir. Normal şartlarda, *recA* ekspresyonu, hücre başına 1,000 ila 10,000 monomer aralığındayken, DNA hasarı meydana geldiği zaman bu oran 50 katına kadar çıkabilmektedir (Karu, 1982).

DNA hasarı çoğunlukla çift zincirli yapının, tek zincirinde meydana gelmesine karşılık, nadir olarak aynı anda her iki zincirde de gerçekleşebilmektedir. Çift zincirde meydana gelen hasarlar (Double Strand Breaks-DSB), hasarlı bölgenin kesilip çıkarılarak, sağlam zincir ve

enzim aracılığıyla tekrar sentezlenmesi ile yani eksizyon onarım yolları kullanılarak tamir edilememektedir. Çünkü bu hasar sonucu, kalıp olarak kullanılabilecek sağlam DNA zinciri bulunmamaktadır. Bu durumda çift zincir kırıkları, bozulmamış homolog DNA bölgelerinde, homolog rekombinasyonda görevli olan RecA proteini aracılığı ile tamir edilmektedir (Meddows, 2004).

E.coli'de *recA* geni etkinliğini tespit etmek amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır. İn vivo olarak gerçekleştirilen çift zincir hasarlarının onarımı, iki farklı rekombinasyon yolundan biri ile gerçekleştirilmektedir. Her iki yolda da RecBCD ve RecA'ya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu iki yoldan biri RuvABC etkinliğiyle gerçekleşirken, diğeri RecG etkinliğiyle gerçekleşmektedir (Meddows, 2004). RecA'nın temel hedefi, DNA çift zincirinde meydana gelen hasarı katalize edecek olan homolog DNA bölgesini taramaktır. Bu tarama işlemini bir filament oluşturarak gerçekleştirmektedir. Filament oluşumu için ATP gerekirken, uzaması için ATP gerekmemektedir (Galletto, 2006). RecA'nın bu aktivitesi, RecBCD'nin etkinliğiyle sağlanmaktadır (Cockram, 2015). RecA, DNA çevresinde filamentler oluşturmak üzere polimerleşmekte ve bu filament yapısı içinde kalan DNA'nın uzunluğunu 1,5 katına çıkarmaktadır (Courcelle, 2003). Bu filament yapısı kolay depolimerize olabileceği için DNA'da farklı katlanmalar meydana getirebilmektedir (Fulconis, 2006).

RecA filamenti, iki DNA bağlanma bölgesine sahiptir. Bu filament, homolog bir zincir bulana kadar tarama işlemine devam etmektedir. Tarama sonucunda bulunan, homolog tek sarmal DNA ya da üç veya dört sarmallı bir DNA, bağlanma bölgeleri sayesinde eşleştirilerek bir rekombinasyon kompleksi oluşturulmaktadır. Oluşturulan bu kompleks Holliday birleşimi (Holliday Junction) olarak bilinmektedir (Şekil 45) (Courcelle, 2003).



Şekil 45. Holliday birleşimi (Holliday Junction) yapısı

Rekombinasyon için oluşturulan bu kompleks daha sonra polimerizasyonun gerçekleştirilebilmesi için RuvABC ya da RecG (helikaz) aktivitesiyle çözülmektedir. (Courcelle, 2003; Whitby, 1994; Parsons, 1992). Replikasyonun durduğu bölgelere bağlanan RecA, yapısal olarak da DNA onarımına katkı sağlamaktadır. ssDNA'nın ilgili gen ve enzimlerle onarılması beklenirken, DNA'ya tutunan RecA filamentleri DNA'yı kendi içindeki eksonükleaz aktivitelerinden korumaktadır (Courcelle, 2003a).

RecA'nın bunlara ek olarak farklı işlevleri de bulunmaktadır. DNA'da bir hasar olduğu zaman, DNA onarımı için yardıma ihtiyaç duyulmaktadır. Örneğin RecA, çeşitli etkenlere bağlı olarak duran replikasyonda, tek zincirli DNA'ya bağlanarak, UmuD proteinin transkripsiyonunu teşvik etmektedir. Artan UmuD proteini sayesinde duran replikasyona karşılık olarak rastgele, bazıları bağlayabilen bir kompleks oluşturmuş olmaktadır. Polimerizasyon RecA tarafından aktive edilen Polimeraz V ile gerçekleşmektedir (Jiang, 2009). Bu rastgele baz ekleme durumu hataya açık bir sentez olup, nokta mutasyonlara neden olabilmesine karşılık, büyük bir DNA hasarı durumunda hayat kurtarıcı olarak görülmektedir (Kuzminov, 1999; Rajagopalan, 1992).

DNA çift zincir kırıkları (DSB), kemoterapi ve radyasyonun ortak bir sonucunda meydana gelen en ölümcül DNA hasarlarından bir tanesi olarak kabul edilmektedir. Meydana gelen tek bir DSB ile hücre döngüsü durdurulabilir ve DNA tamir mekanizmaları etkinleştirilebilir (Bennett ve ark, 1993, Allen ve ark, 2003). DSB'lerin koordineli olarak onarımı, hücrenin hayatta kalması için büyük önem taşımaktadır. Bu onarımda homolog rekombinasyon merkezi bir role sahiptir. DNA, doksorubisin gibi sitotoksik ilaçların meydana getirdiği kemotoksositeye bağlı DNA hasarından, homolog rekombinasyona bağlı olarak kurtulabilmektedir (Vispe ve ark, 1998, Arias-Lopez ve ark, 2006). Bunlara ek olarak, aşırı ve kontrolsüz olarak gerçekleşebilecek homolog rekombinasyonlar genomun bütünlüğünün korunması için tehdit oluşturabilmektedir (Raderschall ve ark, 2002).

Bakteriyel RecA proteini, Memeli Rad51 ve maya Rad51 proteinlerinin yapısal, biyokimyasal ve genetik homoloğu olarak bilinmektedir. Bu proteinler, bakterilerde görüldüğü gibi ökaryotlarda da homolog rekombinasyon ile DNA tamirinde çok büyük önem taşımaktadır (Slupianek ve ark, 2001).

recA geninin insan hücrelerinde homolog geni incelendiğinde ise karşılığının, RAD51 geni olduğu görülmüştür. Bu gen tarafından kodlanan enzim, DNA çift sarmal kopmalarının onarılmasına yardımcı olan RAD51 protein ailesinin bir üyesidir. RAD51 ailesi üyeleri bakteriyel RecA, Archaeal RadA ve maya Rad51'e homologtur (Shinohara ve ark, 1992; Seitz

ve ark, 1998). Bu proteinin, mayadan insana kadar birçok ökaryotta yüksek oranda korunduğu görülmüştür (Shinohara ve ark, 1993). Koehn ve arkadaşlarının 2007 yılında yapmış oldukları bir çalışmada RAD51 protein seviyelerinin, normal ve malign meme hücre hatlarında, doksorubisine cevap olarak, hücre döngüsü durumundan bağımsız olarak farklı şekilde düzenlenebildiğini göstermektedir (Koehn ve ark, 2007).

Ökaryotlarda Rad51 aşırı ekspresyonu, çeşitli kanserlerde görülmektedir (örn, pankreas kanseri) (Maacke ve ark, 2000, Thacker, 2005). Çalışılan çeşitli deneysel tümör sistemlerinde, Rad51'in aşırı ekspresyonunun homolog rekombinasyonu arttırdığı ve böylece DNA'ya zarar veren kemoteraplere ve radyasyona karşı direnç gösterdiği bildirilmiştir (Vispe ve ark, 1998, Raderschall ve ark, 2002, Xu ve ark, 2005). Jonathan ve arkadaşlarının yumuşak doku sarkomlarında doksorubisin ile yaptığı çalışmalarda Rad51'in aşırı eksprese edildiği ve doksorubisinin kemoterapötik etkisine karşı direnç gösterdiği ilk defa rapor edilmiştir (Jonathan ve ark, 2007).

Homolog rekombinasyonun sık görüldüğü kanserlerden biri olan multipl miyelom (MM), B hücrelerinde malign tümörlerin oluşumuyla meydana gelen bir plazma hücre kanseridir. Bu kanser çeşidi tüm kanserlerin %15'ini oluşturan en yaygın ikinci kanser olup, kanserli hastaların büyük bir çoğunluğu tedavi edilememektedir (Siege ve ark, 2014). Bu tümör çeşidiyle yapılan deneysel çalışmalarda DNA tamir mekanizmaları göze çarpmaktadır. David ve ark. yaptığı çalışmalarda, doksorubisinle tedavi edilmiş MM hastalarının, MM hücre dizilerinden ve kemik iliklerinden alınan örneklerde yüksek düzeyde Rad51 ekspresyonu olduğu tespit edilmiştir (David ve ark, 2014). MM hücrelerinde Rad51 ekspresyonunun homolog rekombinasyonu arttırdığı ve hastalık ilerlemesine aracılık ettiği gösterilmiştir (Shammas ve ark, 2009). Kassambara ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptığı çalışmalarda da MM hastalarında Rad51 ekspresyonunun sağ kalımı negatif yönde etkilediği bildirilmektedir (Kassambara ve ark, 2014).

5.2. *mdtK*, multidrug efflux pump MdtK

İlaçların hücre dışına aktif olarak taşınmasında en çok görev alan “ilaç direnci translokazları (ilaç ekstrüzyon translokaz)” adı verilen bir transmembran protein familyası olarak bilinmektedir (Bolhuis, 1997; Nikaido, 1996; Poole, 2000; Poole, 2000; van Veen, 1997). Günümüzde, beş adet ilaç ekstrüzyon translokaz familyası tanımlanmaktadır (Bolhuis, 1997; Nikaido, 1996 Putman, 2000, van Veen, 1997). Bunlar MF (ana kolaylaştırıcı) ailesi,

SMR (küçük çoklu ilaç direnci) ailesi, RND (direnç nodülasyon hücre bölünmesi) ailesi, ABC (ATP bağlama kaseti) ailesi ve yakın zamanda tanımlanmış MATE (çoklu ilaç ve toksik bileşik ekstrüzyonu) ailesidir (Brown, 1999). Böylesine geniş bir protein ailesinde doksorubisin ilacı için hedef geni bulup, ilaç dizaynlarının bu bilgiye göre yapılması, büyük önem taşımaktadır.

Çoklu antimikrobiyel transporter ailelerinden olan MATE (Multi-Antimicrobial Toxin Extrusion) proteinleri, çoklu ilaç ve toksin ekstrüzyonu veya çoklu ilaç ve toksik bileşik ekstrüzyonu olarak da bilinmekte olup, ilaç/sodyum veya proton antiporterları olarak görev yapan bir protein ailesidir (Brown, 1999; Kuroda, 2008; Omote, 2006). MATE proteinleri bakterilerde, arkealarda ve ökaryotlarda, metabolik ve ksenobiyotik organik katyonların temel taşıyıcıları olarak işlev görmektedirler (Kuroda, 2008; Omote, 2006).

Bu proteinlerin ilk olarak keşfedilmesi *Vibrio parahaemolyticus*'tan NorM proteini ile gerçekleşmiştir. *Vibrio parahaemolyticus* çoklu antimikrobiyal maddelere (norfloksasin, kanamisin, etidyum bromür vb.) direnç gösteren bir bakteridir. Bu bakteri ile yapılan çalışmalar sonucunda, çoklu efluks proteini olan NorM ve bunun *E.coli*'de homologu olan protein bulunmuştur (Morita ve ark, 1998). NorM, Na⁺ ile kaplanmış, çoklu ilaç taşınmasının sağlanabildiği, ilaç/sodyum antiporterlarının ilk örneğidir (Morita ve ark, 2007).

norM, *norE*, *ydhE* genleri *mdtK* geninin homologu olarak literatüre kazandırılmış genlerdir. Farklı bakterilerde tespit edilmiş, ancak benzer aktivitelere sahip oldukları (multidrug efflux pump) görülmüştür. *ydhE*, *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli* bakterisinde (Blattner ve ark, 1997; Morita ve ark, 1998; Yang ve ark, 2003); *norM*, *Vibrio parahaemolyticus* bakterisinde (Morita ve ark, 1998); *norE* *Paracoccus denitrificans* bakterisinde; *vmrA* *Vibrio parahaemolyticus* bakterisinde; *vcrM* *Vibrio cholerae* bakterisinde (Begum ve ark, 2005; Nazmul ve ark, 2003) teşhis edilmiş olup hepsinin benzer aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. *E. coli* bakterisinde *ydhE* ve *mdtK* olarak isimlendirilen bu gen son olarak *mdtK* olarak isimlendirilmiştir (Morita ve ark, 1998).

MdtK, hücrenin iç zarında lokalize olmuş 457 amino asit büyüklüğünde bir protein olup, ilaçları dışarı pompalayan (efluks) bir taşıyıcı (transporter) proteindir. NorM olarak da adlandırılan bu protein transporterlardan, çoklu antimikrobiyel dışarı atış pompası (Multi Antimicrobial Extrusion (MATE)) ailesine ait bir protein olup, çoklu ilaç/oligosakkarid lipid/polisakkarid filipaz (Multidrug/Oligosaccharidyl-lipid/Polysaccharide (MOP) flippase) süper ailesine ait olduğu bildirilmiştir (Brown, 1999; Saier, 1916).

Literatür taraması yapıldığında, *Vibrio parahaemolyticus* hücrelerinde enerjiye bağlı taşıma transporterı olarak bulunan bir efluks sisteminin norfloksasin ilacını taşıdığı görülmüştür. Bunun üzerine, temel ilaç efluks pompası olarak bilinen AcrAB transporterını içermeyen *E. coli* suşu (*E. coli* KAM3) ile yapılan çalışmalarda, hücrede, *mdtK* ekspresyonunu arttırdıkça, norfloksasin, siprofloksasin, akriflavin ve tetrafenilfosfonyum (TPP+) ilaçlarına karşı direnç artışı gözlemlenmiştir (Morita, 1998). Bu suшта MdtK ekspresyonunun artması, TPP+ ve deoksikolat ilaç direncinde 32 kat; norfloksasin, enoksasin ve doksorubisin ilaç direncinde 8 kat; trimetoprim ilaç direncinde 4 kat; kloramfenikol, fosfomisin, etidyum bromür ve benzalkonyum ilaç direncinde 2 kat artışa sebep olduğu rapor edilmiştir (Nishino, 2001; Yang, 2003).

mdtK geninin insan hücrelerinde homolog geni araştırıldığında, SLC47A1 genine karşılık geldiği görülmüştür. SLC47A1 geninin kodlamış olduğu SLC47A1 proteini, insan genomunda, 47. solute carrier ailesinin 1. üyesi olarak tanımlanmıştır. Bu protein, çoklu ilaç ve toksin ekstrüzyon proteini (MATE1) olup (Otsuka ve ark, 2005), bakteri, archaea ve ökaryotlarda bulunan bu taşıyıcıların MATE (çok ilaç ve toksik bileşik ekstrüzyon) ailesine ait olduğu bildirilmiştir (Morita ve ark, 1998).

Landini ve arkadaşlarının 2017 yılında yapmış oldukları bir çalışmada LC22A1, SLC47A1, SLCO1B1 ABCB1, ABCC2, ABCC3 gibi çeşitli transporter proteinlerinin kanser hücrelerinde, melphalan, vinblastin, doksorubisin, etoposid, paklitaksel ve auronofin gibi çeşitli kimyasal ilaçlar ile ilişkisi olduğunu bildirmişlerdir (Landini ve ark, 2017). Doksorubisinin de içerisinde olduğu bu önemli kemoterapötik ajanların hücre içerisine ve dışarısına taşınmasına aracılık eden bu transporterların mekanizmalarının daha detaylı bir şekilde araştırılması büyük önem taşımaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser tedavilerinde en çok karşılaşılan sorunlardan bir tanesi, uygulanan ilaçların sağlıklı hücrelerde toksik etki göstermesi iken, bir diğeri de hastalıklı hücrelerin kemoterapötiklere karşı direnç kazanmalarındır. Bu sorunlara müdahale edilebilmesi için hızlı ve pratik yaklaşımlar kullanılarak, direnç mekanizmalarının anlaşılması gerekmektedir.

Bakteriler moleküler çalışmalarda hızlı sonuçların elde edilebildiği önemli model organizmalardır. Bu organizmaların kullanılması ile bir canlının bir kimyasala karşı direnç mekanizmalarının anlaşılabilmesi mümkün olmaktadır. Kemoterapotik ajanlara karşı klinik direnç geliştiren bakteriyel türlerin bilinmesi ve bu organizmaların direncinin altında yatan mekanizmaların araştırılması büyük önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında araç olarak kullanılan organizma *E.coli* bakterisi olup, doksorubisin ile hücre arasındaki ilişkiye dair bilgilerin elde edilebilmesi için farklı suşları kullanılmıştır. Burada, doksorubisinin farklı suşlarda, farklı tolerans seviyeleri görülmüştür. Bu farklılıklarının suşlarda görülen farklı genotiplerden kaynaklandığı düşünülmüştür. Bir *E. coli* suşunun genotipi, hücrelerin belirli ortamlarda büyütülüp büyütülemeyeceğini, belirli DNA tipleri ile transformasyon için kullanılıp kullanılamayacağını ve belirli klonlama stratejileri için uygun olup olmadıklarını belirlemesi bakımından önemli bilgilerdir.

E.coli AG1 ve *E.coli* DH10b suşlarının genotipleri karşılaştırılmıştır. *E.coli* AG1 suşunun “*endA1 recA1 gyrA96 thi-1 relA1 glnV44 hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)*” genotipine sahip olduğu görülürken, ve *E.coli* DH10b suşunun “*str. K-12 F- Δ(ara-leu)7697[Δ(rapA'-cra')] Δ(lac)X74[Δ('yahH-mhpE)] duplication(514341-627601) [nmpC-gltI] galK16 galE15 e14-(icdWT mcrA) φ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 Tn10.10 nupG rpsL150(StrR) rph+ spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ- Missense(dnaA glmS glyQ lpxK mreC murA) Nonsense(chiA gatZ fhuA? yigA ygcG) Frameshift(flhC mglA fruB)*” genotipine sahip olduğu görülmüştür. Aralarında görülen bu gen bakımından farklılıklar değerlendirildiğinde, DH10b suşunda *mrr-hsdRMS-mcrBC* gen birliğinin delesyona uğratıldığı ancak AG1 suşunda bu genlerin genomda yer aldıkları görülmüştür. Bu gibi farklılıklar hücrelerin ilaca karşı verdikleri cevap açısından bir önem taşıyabilir. Doksorubisin ilacı ile yapılan çalışmalarda *E.coli* DH10b suşunun kullanılmasının daha uygun olduğu gösterilmiştir.

Bu tez çalışması ile, genomik, moleküler genetik, mikrobiyoloji ve kısmen biyoinformatik alanlarının kullanılması ile doksorubisinin hedef bakteri olarak seçilen *E.coli* kullanılarak, doksorubisinin hücrede ilişkisi olduğu düşünülen gen bilgilerine ulaşılmıştır. Bu

tez çalışmasında farklı teknikler kullanılarak, öneride bulunulmuş olan hedeflere ulaşılmıştır. Doksorubisin kemoterapötik ajanının hücrede etkileşime girdiği gen/protein bilgileri elde edilmiş olup, yapılan literatür taramaları ile yorumlanmıştır. Ayrıca bu tez çalışmasında gerçekleştirilen deneysel tekniklerin optimizasyon çalışmaları, ileride yapılacak olan farklı çalışmalar için önemli bilgiler sunmaktadır.

Bu model organizma ile yapılan deneyler sonucunda, doksorubisin ile MdtK ve RecA proteinleri arasında ilişkiler gözlemlenmiştir. Gerek doksorubisinin DNA'ya verdiği hasarın tamirinin RecA proteini ile sağlanması, gerek ise hücre içerisine giren doksorubisinin MdtK proteini ile dışarı atılması mekanizmaları olsun hücrenin doksorubisin ile ilişkisine ipuçları vermektedir. Bu gözlemler, kemoduyarlılık için doğrudan ilişkili bilgiler olup, hedeflenen terapötik ilaçların tasarlanması sırasında dikkate alınması gereken önemli bilgilerdir. Elde edilen gen bilgileri literatür ışığında ve biyoinformatik analizler ile değerlendirilerek insandaki homologları tespit edilmiştir. MdtK'nın insan genomundaki homologunun SLC47A1, RecA'nın insan genomundaki homologunun Rad51 olduğu görülmüş ve bu sonuçlar yorumlanarak tartışma kısmında rapor edilmiştir.

Deneylerden elde ettiğimiz sonuçlara ve literatüre bakarak *recA* ve *mdtK* genleri ve homologlarının özellikle doksorubisine ve benzer yapıdaki ilaçlara direnç sağladığı görülmektedir. İleride yapılacak olan çalışmalarda bu genlere bağlı olarak meydana gelen direnci kırmak amacıyla kombine ilaç tedavileriyle bu genlerin de dikkate alınması önerilmektedir. Ayrıca, gelecekte yapılacak çalışmalarda ASKA klon seti kullanılması çeşitli ilaç ve kimyasallar ile bağlantılı olabilecek genlerin, etkin ve hızlı tespit edilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

Adikesavan AK, Katsonis P, Marciano DC, Lua R, Herman C, Lichtarge O. Separation of recombination and SOS response in *Escherichia coli* RecA suggests LexA interaction sites. *PLoS Genet.* 2011.

Allen C, Miller CA, Nickoloff JA. The mutagenic potential of a single DNA double-strand break in a mammalian chromosome is not influenced by transcription. *DNA Repair (Amst).* 2003;2(10):1147-1156.

Arcamone F, Bernardi L, Giardino P. Synthesis and antitumor activity of 4 demethoxydaunorubicin, 4 demethoxy 7,9 diepidaunorubicin, and their β anomers. *Cancer Treat Rep.* 1976.

Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G. Adriamycin, 14- hydroxydaimomycin, a new antitumor antibiotic from *S. Peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng.* 1969.

Arias-Lopez C, Lazaro-Trueba I, Kerr P. p53 modulates homologous recombination by transcriptional regulation of the RAD51 gene. *EMBO Rep.* 2006.

Armstrong GT, Chen Y, Yasui Y. Reduction in late mortality among 5-year survivors of childhood cancer. In: *New England Journal of Medicine.* ; 2016.

Baguley BC. A Brief History Of Cancer Chemotherapy. In: *Anticancer Drug Development.* ; 2002.

Begum A, Rahman MM, Ogawa W, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T. Gene cloning and characterization of four MATE family multidrug efflux pumps from *Vibrio cholerae* non-O1. *Microbiol Immunol.* 2005.

Bennett CB, Lewis AL, Baldwin KK, Resnick MA. Lethality induced by a single site-specific double-strand break in a dispensable yeast plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993.

Bezabeh T, Mowat MRA, Jarolim L, Greenberg AH, Smith ICP. Detection of drug-induced apoptosis and necrosis in human cervical carcinoma cells using ¹H NMR spectroscopy. *Cell Death Differ.* 2001.

Binaschi M, Bigioni M, Cipollone A. Anthracyclines: selected new developments. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2001.

Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* (80-). 1997.

Blum RH, Carter SK. A new anticancer drug with significant clinical activity. *Ann Intern Med.* 1974.

Bolhuis H, Van Veen HW, Poolman B, Driessen AJM, Konings WN. Mechanisms of multidrug transporters. *FEMS Microbiol Rev.* 1997.

Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: The multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst.* 2000.

Boucek RJ, Olson RD, Brenner DE, Ogunbunmi EM, Inui M, Fleischer S. The major metabolite of doxorubicin is a potent inhibitor of membrane-associated ion pumps: A correlative study of cardiac muscle with isolated membrane fractions. *J Biol Chem.* 1987.

Brown DF, Kothari D. Comparison of antibiotic discs from different sources. *J Clin Pathol.* 1975.

Brown MH, Paulsen IT, Skurray RA. The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters [2]. *Mol Microbiol.* 1999.

Brunnberg U, Mohr M, Noppeney R. Induction therapy of AML with ara-C plus daunorubicin versus ara-C plus gemtuzumab ozogamicin: A randomized phase II trial in elderly patients. *Ann Oncol.* 2012.

Cagel M, Grotz E, Bernabeu E, Moretton MA, Chiappetta DA. Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside. *Drug Discov Today.* 2017.

Chaires JB. Equilibrium Studies on the Interaction of Daunomycin with Deoxypolynucleotides. *Biochemistry.* 1983.

Chaires JB, Dattagupta N, Crothers DM. Studies on Interaction of Anthracycline Antibiotics and Deoxyribonucleic Acid: Equilibrium Binding Studies on Interaction of Daunomycin with Deoxyribonucleic Acid. *Biochemistry.* 1982.

Chaires JB, Dattagupta N, Crothers DM. Kinetics of the Daunomycin-DNA Interaction. *Biochemistry.* 1985.

Chaires JB, Herrera JE, Waring MJ. Preferential Binding of Daunomycin to 5'TACG and 5'TAGC Sequences Revealed by Footprinting Titration Experiments. *Biochemistry*. 1990.

Chaires JB, Satyanarayana S, Suh D, Fokt I, Przewloka T, Priebe W. Parsing the free energy of anthracycline antibiotic binding to DNA. *Biochemistry*. 1996.

Chihara D, Westin JR, Oki Y. Management strategies and outcomes for very elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer*. 2016.

Cockram CA, Filatenkova M, Danos V, El Karoui M, Leach DRF. Quantitative genomic analysis of RecA protein binding during DNA double-strand break repair reveals RecBCD action in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015.

Coleman MP, Forman D, Bryant H. Cancer survival in Australia, Canada, Denmark, Norway, Sweden, and the UK, 1995-2007 (the international cancer benchmarking partnership): An analysis of population-based cancer registry data. *Lancet*. 2011.

Colvin M, Hait WN. Alkylating Agents and Platinum Antitumor Compounds. In: *Holland Frei Cancer Medicine* 8. ; 2010.

Courcelle J, Donaldson JR, Chow KH, Courcelle CT. DNA damage-induced replication fork regression and processing in Escherichia coli. *Science* (80-). 2003.

Courcelle J, Hanawalt PC. RecA-Dependent Recovery of Arrested DNA Replication Forks. *Annu Rev Genet*. 2003.

Craigie J. Sarcoma 37 and ascites tumours. *Ann R Coll Surg Engl*. 1952.

Dagert M, Ehrlich SD. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene*. 1979.

Alagpulinsa DA, Ayyadevara S, Shmookler Reis RJ. A small molecule inhibitor of RAD51 reduces homologous recombination and sensitizes multiple myeloma cells to doxorubicin. *Front Oncol*. 2014.

DeVita VT, Chu E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res*. 2008.

Di Marco A, Gaetani M, Orezzi P. “Daunomycin”, a new antibiotic of the rhodomycin group [18]. *Nature*. 1964.

Dubost M, Ganter P, Maral R. RUBIDOMYCIN: A NEW ANTIBIOTIC WITH CYTOSTATIC PROPERTIES. *Cancer Chemother Rep*. 1964.

Ehrlich P, Hata S. *Die Experimentelle Chemotherapie Der Spirillosen.*; 1910.

Fernández De Henestrosa AR, Ogi T, Aoyagi S. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 2000.

Fujiwara A, Hoshino T, Westley JW. Anthracycline antibiotics. *Crit Rev Biotechnol*. 1985.

Fulconis R, Mine J, Bancaud A, Dutreix M, Viovy JL. Mechanism of RecA-mediated homologous recombination revisited by single molecule nanomanipulation. *EMBO J*. 2006.

Fux CA, Shirliff M, Stoodley P, Costerton JW. Can laboratory reference strains mirror “real-world” pathogenesis? *Trends Microbiol.* 2005.

Galletto R, Amitani I, Baskin RJ, Kowalczykowski SC. Direct observation of individual RecA filaments assembling on single DNA molecules. *Nature.* 2006.

Galmarini D, Galmarini CM, Galmarini FC. Cancer chemotherapy: A critical analysis of its 60 years of history. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012.

Gatta G, Capocaccia R, Coleman MP, Gloeckler Ries LA, Berrino F. Childhood cancer survival in Europe and the United States. *Cancer.* 2002.

Gilman A, Philips FS, Hedgpeth JW. The biological actions and therapeutic applications of the B-chloroethyl amines and sulfides. *Science* (80-). 1946.

Giordano SH, Lin YL, Kuo YF, Hortobagyi GN, Goodwin JS. Decline in the use of anthracyclines for breast cancer. *J Clin Oncol.* 2012.

Goodman LS, Wintrobe MM, Dameshek W, Goodman MJ, Gilman A, McLennan MT. Nitrogen mustard therapy: Use of Methyl-Bis(Beta-Chloroethyl)amine Hydrochloride and Tris(Beta-Chloroethyl)amine Hydrochloride for Hodgkin’s Disease, Lymphosarcoma, Leukemia and Certain Allied and Miscellaneous Disorders. *J Am Med Assoc.* 1946.

Hayashi K, Morooka N, Yamamoto Y. Highly accurate genome sequences of Escherichia coli K-12 strains MG1655 and W3110. *Mol Syst Biol.* 2006.

Hientz K, Mohr A, Bhakta-Guha D, Efferth T. The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. *Oncotarget.* 2017.

Hui RCY, Francis RE, Guest SK. Doxorubicin activates FOXO3a to induce the expression of multidrug resistance gene ABCB1 (MDR1) in K562 leukemic cells. *Mol Cancer Ther.* 2008.

Jemal A, Siegel R, Ward E. Cancer Statistics, 2006. *CA Cancer J Clin.* 2006.

Jiang Q, Karata K, Woodgate R, Cox MM, Goodman MF. The active form of DNA polymerase ν is UmuD' 2 C-RecA-ATP. *Nature.* 2009.

Hannay JAF, Liu J, Zhu QS. Rad51 overexpression contributes to chemoresistance in human soft tissue sarcoma cells: A role for p53/activator protein 2 transcriptional regulation. *Mol Cancer Ther.* 2007.

Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med.* 2002.

Karu AE, Belk ED. Induction of E. coli recA protein via recBC and alternate pathways: Quantitation by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *MGG Mol Gen Genet.* 1982.

Kassambara AA, Gourzones-Dmitriev C, Sahota S. A DNA repair pathway score predicts survival in human multiple myeloma: The potential for therapeutic strategy. *Oncotarget.* 2014.

Koehn H, Magan N, Isaacs RJ, Stowell KM. Differential regulation of DNA repair protein Rad51 in human tumour cell lines exposed to doxorubicin. *Anticancer Drugs.* 2007.

Koeller J, Eble M. Mitoxantrone: A novel anthracycline derivative. *Clin Pharm.* 1988.

Kuroda T, Tsuchiya T. Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2009.

Kuzminov A. Recombinational Repair of DNA Damage in *Escherichia coli* and Bacteriophage λ . *Microbiol Mol Biol Rev*. 1999.

Landini I, Lapucci A, Pratesi A. Selection and characterization of a human ovarian cancer cell line resistant to auranofin. *Oncotarget*. 2017.

Lerman LS. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *J Mol Biol*. 1961.

Li HJ, Crothers DM. Relaxation studies of the proflavine-DNA complex: The kinetics of an intercalation reaction. *J Mol Biol*. 1969.

Maacke H, Jost K, Opitz S. DNA repair and recombination factor Rad51 is over-expressed in human pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene*. 2000.

Maeda T, Horinouchi T, Sakata N, Sakai A, Furusawa C. High-throughput identification of the sensitivities of an *Escherichia coli* Δ recA mutant strain to various chemical compounds. *J Antibiot (Tokyo)*. 2019.

Manov I, Pollak Y, Broneshter R, Iancu TC. Inhibition of doxorubicin-induced autophagy in hepatocellular carcinoma Hep3B cells by sorafenib - The role of extracellular signal-regulated kinase counteraction. *FEBS J*. 2011.

Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, Shirjang S, Baradaran B. The different mechanisms of cancer drug resistance: A brief review. *Adv Pharm Bull.* 2017.

Martinez R, Chacon-Garcia L. The Search of DNA-Intercalators as Antitumoral Drugs: What it Worked and What did not Work. *Curr Med Chem.* 2012.

Kitagawa M, Ara T, Arifuzzaman M. Complete set of ORF clones of Escherichia coli ASKA library (A complete set of E. coli K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res.* 2005.

Mattes WB, Hartley JA, Kohn KW. DNA sequence selectivity of guanine-N7 alkylation by nitrogen mustards. *Nucleic Acids Res.* 1986.

McFarland J. The nephelometer: An instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *J Am Med Assoc.* 1907.

McMurry L, Petrucci RE, Levy SB. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980.

Meddows TR, Savory AP, Lloyd RG. RecG helicase promotes DNA double-strand break repair. *Mol Microbiol.* 2004.

Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev.* 2004.

Morita Y, Kataoka A, Shiota S, Mizushima T, Tsuchiya T. NorM of *Vibrio parahaemolyticus* is an Na⁺-driven multidrug efflux pump. *J Bacteriol.* 2000.

Morita Y, Kodama K, Shiota S. NorM, putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998.

Morrison WB. Cancer Chemotherapy: An Annotated History. *J Vet Intern Med.* 2010.

Mukai H, Kogawa T, Matsubara N, Naito Y, Sasaki M, Hosono A. A first-in-human Phase 1 study of epirubicin-conjugated polymer micelles (K-912/NC-6300) in patients with advanced or recurrent solid tumors. *Invest New Drugs.* 2017.

Nabhan C, Byrtek M, Rai A. Disease characteristics, treatment patterns, prognosis, outcomes and lymphoma-related mortality in elderly follicular lymphoma in the United States. *Br J Haematol.* 2015.

Huda NM, Chen J, Morita Y, Kuroda T, Mizushima T, Tsuchiya T. Gene cloning and characterization of VcrM, a Na⁺-coupled multidrug efflux pump, from *Vibrio cholerae* non-O1. *Microbiol Immunol.* 2003.

Nikaido H. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J Bacteriol.* 1996.

Nishiyama N, Matsumura Y, Kataoka K. Development of polymeric micelles for targeting intractable cancers. *Cancer Sci.* 2016.

Omote H, Hiasa M, Matsumoto T, Otsuka M, Moriyama Y. The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *Trends Pharmacol Sci.* 2006.

Otsuka M, Matsumoto T, Morimoto R, Arioka S, Omote H, Moriyama Y. A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005.

Parsons CA, Tsaneva I, Lloyd RG, West SC. Interaction of Escherichia coli RuvA and RuvB proteins with synthetic Holliday junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992.

Patnaik JL, Byers T, DiGuseppi C, Dabelea D, Denberg TD. Cardiovascular disease competes with breast cancer as the leading cause of death for older females diagnosed with breast cancer: A retrospective cohort study. *Breast Cancer Res*. 2011.

Peng X, Chen B, Lim CC, Sawyer DB. The cardiotoxicology of anthracycline chemotherapeutics: Translating molecular mechanism into preventative medicine. *Mol Interv*. 2005.

Poole K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-positive bacteria and the mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000.

Poon RTP, Borys N. Lyso-thermosensitive liposomal doxorubicin: A novel approach to enhance efficacy of thermal ablation of liver cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2009.

Putman M, van Veen HW, Konings WN. Molecular Properties of Bacterial Multidrug Transporters. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000.

Raderschall E, Bazarov A, Cao J. Formation of higher-order nuclear Rad51 structures is functionally linked to p21 expression and protection from DNA damage-induced apoptosis. *J Cell Sci*. 2002.

Raderschall E, Stout K, Freier S, Suckow V, Schweiger S, Haaf T. Elevated levels of Rad51 recombination protein in tumor cells. *Cancer Res.* 2002.

Rajagopalan M, Lu C, Woodgate R, O'Donnell M, Goodman MF, Echols H. Activity of the purified mutagenesis proteins UmuC, UmuD', and RecA in replicative bypass of an abasic DNA lesion by DNA polymerase III. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992.

Ricci MS, Zong W. Chemotherapeutic Approaches for Targeting Cell Death Pathways. *Oncologist.* 2006.

Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2005.

Rimal H, Lee SW, Lee JH, Oh TJ. Understanding of real alternative redox partner of *Streptomyces peucetius* DoxA: Prediction and validation using in silico and in vitro analyses. *Arch Biochem Biophys.* 2015.

Roy U, Barber P, Tse-Dinh YC, Batrakova E V., Mondal D, Nair M. Role of MRP transporters in regulating antimicrobial drug inefficacy and oxidative stress-induced pathogenesis during HIV-1 and TB infections. *Front Microbiol.* 2015.

Ruiz-Ruiz C, Robledo G, Cano E, Redondo JM, Lopez-Rivas A. Characterization of p53-mediated up-regulation of CD95 gene expression upon genotoxic treatment in human breast tumor cells. *J Biol Chem.* 2003.

Anderson RD, Veigl ML, Baxter J, Sedwick WD. DNA Sequence Specificity of Doxorubicin-induced Mutational Damage in *uvrB*– *Escherichia coli*. *Cancer Res.* 1991.

Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol.* 2001.

Schinkel AH, Kemp S, Dolle M, Rudenko G, Wagenaar E. N-glycosylation and deletion mutants of the human MDR1 P-glycoprotein. *J Biol Chem.* 1993.

Seitz EM, Brockman JP, Sandler SJ, Clark AJ, Kowalczykowski SC. RadA protein is an archaeal RecA protein homolog that catalyzes DNA strand exchange. *Genes Dev.* 1998.

Shammas MA, Reis RJS, Koley H, Batchu RB, Li C, Munshi NC. Dysfunctional homologous recombination mediates genomic instability and progression in myeloma. *Blood.* 2009.

Shinohara A, Ogawa H, Matsuda Y, Ushio N, Ikeo K, Ogawa T. Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to RAD51 and recA. *Nat Genet.* 1993.

Shinohara A, Ogawa H, Ogawa T. Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell.* 1992.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against her2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 2001.

Slupianek A, Schmutte C, Tomblin G. BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance. *Mol Cell*. 2001.

Smith LA, Cornelius VR, Plummer CJ. Cardiotoxicity of anthracycline agents for the treatment of cancer: Systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMC Cancer*. 2010.

Strebhardt K, Ullrich A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 Years of progress. *Nat Rev Cancer*. 2008.

Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. From the Cardiotoxic Mechanisms to Management. *Prog Cardiovasc Dis*. 2007.

Thacker J. The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. *Cancer Lett*. 2005.

Thomas P, Sekhar AC, Upreti R, Mujawar MM, Pasha SS. Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast cfu enumeration and single colony isolation from diverse samples. *Biotechnol Reports*. 2015.

Tormo E, Pineda B, Serna E. MicroRNA Profile in Response to Doxorubicin Treatment in Breast Cancer. *J Cell Biochem*. 2015.

Verweij J, Pinedo HM. Mitomycin C: mechanism of action, usefulness and limitations. *Anticancer Drugs*. 1990.

Vispé S, Cazaux C, Lesca C, Defais M. Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. *Nucleic Acids Res*. 1998.

Wang Z, Sun Y. Targeting p53 for novel anticancer therapy. *Transl Oncol.* 2010.

Waring M. Variation of the supercoils in closed circular DNA by binding of antibiotics and drugs: Evidence for molecular models involving intercalation. *J Mol Biol.* 1970.

Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* 1953.

Weiss RB. The anthracyclines: Will we ever find a better doxorubicin? *Semin Oncol.* 1992.

Whitby MC, Vincent SD, Lloyd RG. Branch migration of Holliday junctions: identification of RecG protein as a junction specific DNA helicase. *EMBO J.* 1994.

World Health Organization. *19th WHO Model List of Essential Medicines.*; 2015.

Xu ZY, Loignon M, Han FY, Panasci L, Aloyz R. Xrcc3 induces cisplatin resistance by stimulation of Rad51-related recombinational repair, S-phase checkpoint activation, and reduced apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005.

Yang S, Clayton SR, Zechiedrich EL. Relative contributions of the AcrAB, MdfA and NorE efflux pumps to quinolone resistance in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2003.

Zgoda JR, Porter JR. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. *Pharm Biol.* 2001.

Zhang X, Tang N, Hadden TJ, Rishi AK. Akt, FoxO and regulation of apoptosis.
Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res. 2011.

Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, Van't Riet K. Modeling of the
bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol.* 1990.



EKLER

EK1 _İnsertlerin Sekans dizileri

PDE-4

TATCGACGAAAACAAACAGAAAGCGTTGGCGGCAGCACTGGGCCAGATTGAGAAACAATTT
GGTAAAGGCTCCATCATGCGCCTGGGTGAAGACCGTTCCATGGATGTGGAAACCATCTCTACCGGT
TCGCTTTCCTACTGGATATCGCGCTTGGGGCAGGTGGTCTGCCGATGGGCCGTATCGTCGAAATCTAC
GGACCGGAATCTTCCGGTAAAACACGCTGACGCTGCAGGTGATCGCCGCAGCGCAGCGTGAAGG
TAAACCTGTGCGTTTATCGATGCTGAACACGCGCTGGACCCAATCTACGCACGTAAACTGGGCGT
CGATATCGACAACCTGCTGTGCTCCCAGCCGGACACCGGCGAGCAGGCACTGGAAATCTGTGACGC
CCTGGCGCGTTCTGGCGCAGTAGACGTTATCGTCGTTGACTCCGTGGCGGCACTGACGCCGAAAGC
GGAAATCGAAGGCGAAATCGGCGACTCTCACATGGGCCTTGCGGCACGTATGATGAGCCAGGCGA
TGCCTAAGCTGGCGGGTAACCTGAAGCAGTCCAACACGCTGCTGATCTTCATCAACCAGATCCGTA
TGAAAATTGGTGT

PDE-14

ATCGACGAAAACAAACAGAAAGCGTTGGCGGCAGCACTGGGCCAGATTGAGAAACAATTTG
GTAAAGGCTCCATCATGCGCCTGGGTGAAGACCGTTCCATGGATGTGGAAACCATCTCTACCGGT
CGCTTTCCTACTGGATATCGCGCTTGGGGCAGGTGGTCTGCCGATGGGCCGTATCGTCGAAATCTACG
GACCGGAATCTTCCGGTAAAACACGCTGACGCTGCAGGTGATCGCCGCAGCGCAGCGTGAAGGT
AAAACCTGTGCGTTTATCGATGCTGAACACGCGCTGGACCCAATCTACGCACGTAAACTGGGCGTC
GATATCGACAACCTGCTGTGCTCCCAGCCGGACACCGGCGAGCAGGCACTGGAAATCTGTGACGCC
CTGGCGCGTTCTGGCGCAGTAGACGTTATCGTCGTTGACTCCGTGGCGGCACTGACGCCGAAAGCG
GAAATCGAAGGCGAAATCGGCGACTCTCACATGGGCCTTGCGGCACGTATGATGAGCCAGGCGAT
GCGTAAGCTGGCGGGTAACCTGAAGCAGTCCAACACGCTGCTGATCTTCATCAACCAGATCCGTAT
GAAAATTGGTGTG

PDE-17

AGTGAAGCGCGTCTGTTATTAGCATTAGCAATCCCGGTGATTCTCGCGCAAATCGCCCAAAC
TGCGATGGGTTTTGTGCGATACCGTGATGGCGGGCGGCTATAGTGCCACCGACATGGCGGGCGGTGCG
TATCGGTACTTCTATCTGGCTTCCGGCGATCCTCTTTGGTCACGGACTGCTGCTGGCATTAAACGCCG
GTTATCGCGCAATTAAATGGTTCCGGTTCGACGTGAGCGCATTGCGCATCAGGTGCGACAAGGTTTC
TGGCTGGCAGGTTTTGTTCCGTTCTCATTATGCTGGTGTGCTGTGGAATGCAGGTTACATTATCCGCT
CCATGGAAAACATCGATCCGGCTCTGGCGGACAAAGCCGTGGGTTATCTGCGTGCGTTGTTGTGGG
GCGCGCCGGGATATCTGTTCTTCCAGGTTGCCCGTAACCAGTGTGAAGGTCTGGCAAAAACCAAGC
CGGGTATGGTAATGGGCTTTATCGGCCTGCTGGTGAACATCCCGGTGAACTATATCTTTATTTATGG
TCATTTCCGGTATGCCTGAGCTCGGTGGCGTTGGTTGTGGCGTGGCTACTGCGGCGGTGTATTGGGTC
ATGTTT

PDE-21

GAAGTATATCAGTGAAGCGCGTCTGTTATTAGCATTAGCAATCCCGGTGATTCTCGCGCAAA
TCGCCCAAACCTGCGATGGGTTTTGTGCGATACCGTGATGGCGGGCGGCTATAGTGCCACCGACATGG
CGGCGGTGCTATCGGTACTTCTATCTGGCTTCCGGCGATCCTCTTTGGTCACGGACTGCTGCTGGC
ATTAACGCCGGTTATCGCGCAATTAAATGGTTCCGGTTCGACGTGAGCGCATTGCGCATCAGGTGCG
ACAAGGTTTCTGGCTGGCAGGTTTTGTTCCGTTCTCATTATGCTGGTGTGCTGTGGAATGCAGGTTAC
ATTATCCGCTCCATGGAAAACATCGATCCGGCTCTGGCGGACAAAGCCGTGGGTTATCTGCGTGCG
TTGTTGTGGGGCGCGCCGGGATATCTGTTCTTCCAGGTTGCCCGTAACCAGTGTGAAGGTCTGGCA
AAAACCAAGCCGGGTATGGTAATGGGCTTTATCGGCCTGC

PDE-25

GAAGTATATCAGTGAAGCGCGTCTGTTATTAGCATTAGCAATCCCGGTGATTCTCGCGCAAA
TCGCCCCAACTGCGATGGGTTTTGTCGATACCGTGATGGCGGGCGGCTATAGTGCCACCGACATGG
CGGCGGTTCGCTATCGGTACTTCTATCTGGCTTCCGGCGATCCTCTTTGGTCACGGACTGCTGCTGGC
ATTAACGCCGGTTATCGCGCAATTAAATGGTTCCGGTCGACGTGAGCGCATTGCGCATCAGGTGCG
ACAAGGTTTCTGGCTGGCAGGTTTTGTTTCCGTTCTCATTATGCTGGTGCTGTGGAATGCAGGTAC
ATTATCCGCTCCATGGAAAACATCGATCCGGCTCTGGCGGACAAAGCCGTGGGTTATCTGCGTGCG
TTGTTG

PDE-32

GTGAAGCGCGTCTGTTATTAGCATTAGCAATCCCGGTGATTCTCGCGCAAATCGCCCCAACT
GCGATGGGTTTTGTCGATACCGTGATGGCGGGCGGCTATAGTGCCACCGACATGGCGGCGGTTCGCT
ATCGGTACTTCTATCTGGCTTCCGGCGATCCTCTTTGGTCACGGACTGCTGCTGGCATTAAACGCCGG
TTATCGCGCAATTAAATGGTTCCGGTCGACGTGAGCGCATTGCGCATCAGGTGCGACAAGGTTTCT
GGCTGGCAGGTTTTGTTTCCGTTCTCATTATGCTGGTGCTGTGGAATGCAGGTTACATTATCCGCTC
CATGGAAAACATCGATCCGGCTCTGGCGGACAAAGCCGTGGGTTATCTGCGTGCGTTGTTGTGGGG
CGCGCCGGGATATCTGTTCTTCCAGGTTGCCCGTAACCAGTGTGAAGGTCTGGCAAAAACCAAGCC
GGGTATGGTAATGGGCTTTATCGGCCTGCTGGTGAACATCCCGGTGAACATATCTTTATTTATGGT
CATTTCCGGTATGCCTGAGCTCGGTGGCGTTGGTTGTGGCGTGGCTACTGCGGCGGTGTATTGGGTCA
TGTTCC

PDE-33

AGTGAAGCGCGTCTGTTATTAGCATTAGCAATCCCGGTGATTCTCGCGCAAATCGCCCCAAAC
TGCGATGGGTTTTGTCGATACCGTGATGGCGGGCGGCTATAGTGCCACCGACATGGCGGCGGTTCGC
TATCGGTACTTCTATCTGGCTTCCGGCGATCCTCTTTGGTCACGGACTGCTGCTGGCATTAAACGCCG
GTTATCGCGCAATTAAATGGTTCCGGTCGACGTGAGCGCATTGCGCATCAGGTGCGACAAGGTTTC
TGGCTGGCAGGTTTTGTTTCCGTTCTCATTATGCTGGTGCTGTGGAATGCAGGTTACATTATCCGCT
CCATGGAAAACATCGATCCGGCTCTGGCGGACAAAGCCGTGGGTTATCTGCGTGCGTTGTTGTGGG
GCGCGCCGGGATATCTGTTCTTCCAGGTTGCCCGTAACCAGTGTGAAGGTCTGGCAAAAACCAAGC
CGGGTATGGTAATGGGCTTTATCGGCCTGCTGGTGAACATCCCGGTGAACATATCTTTATTTATGG
TCATTTCCGGTATGCCTGAGCTCGGTGGCGTTGGTTGTGGCGTGGCTACTGCGGCGGTGTATTGGGTC
ATGTTT

PDE-34

GTGAAGCGCGTCTGTTATTAGCATTAGCAATCCCGGTGATTCTCGCGCAAATCGCCCCAACT
GCGATGGGTTTTGTCGATACCGTGATGGCGGGCGGCTATAGTGCCACCGACATGGCGGCGGTTCGCT
ATCGGTACTTCTATCTGGCTTCCGGCGATCCTCTTTGGTCACGGACTGCTGCTGGCATTAAACGCCGG
TTATCGCGCAATTAAATGGTTCCGGTCGACGTGAGCGCATTGCGCATCAGGTGCGACAAGGTTTCT
GGCTGGCAGGTTTTGTTTCCGTTCTCATTATGCTGGTGCTGTGGAATGCAGGTTACATTATCCGCTC
CATGGAAAACATCGATCCGGCTCTGGCGGACAAAGCCGTGGGTTATCTGCGTGCGTTGTTGTGGGG
CGCGCCGGGATATCTGTTCTTCCAGGTTGCCCGTAACCAGTGTGAAGGTCTGGCAAAAACCAAGCC
GGGTATGGTAATGGGCTTTATCGGCCTGCTGGTGAACATCCCGGTGAACATATCTTTATTTATGGT
CATTTCCGGTATGCCTGAGCTCGGTGGCGTTGGTTGTGGCGTGGCTACTGCGGCGGTGTATTGGGTCA
TGTTCC

PDE-37

AAGTATATCAGTGAAGCGCGTCTGTTATTAGCATTAGCAATCCCGGTGATTCTCGCGCAAAT
CGCCCCAACTGCGATGGGTTTTGTCGATACCGTGATGGCGGGCGGCTATAGTGCCACCGACATGGC
GGCGGTTCGCTATCGGTACTTCTATCTGGCTTCCGGCGATCCTCTTTGGTCACGGACTGCTGCTGGCA
TTAACGCCGGTTATCGCGCAATTAAATGGTTCCGGTCGACGTGAGCGCATTGCGCATCAGGTGCGA
CAAGGTTTCTGGCTGGCAGGTTTTGTTTCCGTTCTCATTATGCTGGTGCTGTGGAATGCAGGTTACA
TTATCCGCTCCATGGAAAACATCGATCCGGCTCTGGCGGACAAAGCCGTGGGTTATCTGCGTGCGT

TGTTGTGGGGCGCGCCGGGATATCTGTTCTTCCAGGTTGCCCGTAACCAGTGTGAAGGTCTGGCAA
AAACCAAGCCGGGTATGGTAATGGGCTTTATCGGCCTGCTGGTGAACATCCCGGTGAACATATCT
TTATTTATGGTCATTTCCGGTATGCCTGAGCTCGGTGGCGTTGGTTGTGGCGTGGCTACTGCGGCGGT
GTATTGG

PDE-42

TCAGTGAAGCGCGTCTGTTATTAGCATTAGCAATCCCGGTGATTCTCGCGCAAATCGCCCAA
ACTGCGATGGGTTTTGTCGATACCGTGATGGCGGGCGGCTATAGTGCCACCGACATGGCGGGCGGTC
GCTATCGGTACTTCTATCTGGCTTCCGGCGATCCTCTTTGGTACGGACTGCTGCTGGCATTAAACGC
CGGTTATCGCGCAATTAAATGGTTCCGGTGCACGTGAGCGCATTGCGCATCAGGTGCGACAAGGTT
TCTGGCTGGCAGGTTTTGTTTCCGTTCTCATTATGCTGG

PG-A4.1

GTAAGGCTCCATCATGCGCCTGGGTGAAGACCGTTCCATGGATGTGGAACCATCTCTACC
GGTTCGCTTTCACTGGATATCGCGCTTGGGGGCAGGTGGTCTGCCGATGGGCGGTATCGTCGAAAT
CTACGGACCGGAATCTTCCGGTAAAACCACGCTGACGCTGCAGGTGATCGCCGCAGCGCAGCGTG
AAGGTAAAACCTGTGCGTTTATCGATGCTGAACACGCGCTGGACCCAATCTACGCACGTAAACTGG
CGTTCGATATCGACAACCTGCTGTGCTCCCAGCCGGACACC

PG-B2.2

ACAAACAGAAAGCGTTGGCGGCAGCACTGGGCCAGATTGAGAAACAATTTGGTAAAGGCTC
CATCATGCGCCTGGGTGAAGACCGTTCCATGGATGTGGAACCATCTCTACCGGTTGCTTTCACTG
GATATCGCGCTTGGGGCAGGTGGTCTGCCGATGGGCGGTATCGTCGAAATCTACGGACCGGAATCT
TCCGGTAAAACCACGCTGACGCTGCAGGTGATCGCCGCAGCGCAGCGTGAAGGTAAAACCTGTGC
GTTTATCGATGCTGAACACGCGCTGGACCCAATCTACGCACGTAAACTGGGCGTCGATATCGACAA
CCTGCTGTGCTCCCAGCCGGACACCGGCGAGCAGGCACTGGAAATCTGTGACGCCCTGGCGCGTTC
TGGCGCAGTAGACGTTATCGTCGTTGACTCCGTGGCGGCACTGACGCCGAAAGCGGAAATCGAAG
GCGAAATCGGCGACTCTCACATGGGCCTTGCGGCACGTATGATGAGCCAGGCGATGCGTAAGCTG
GCGGGTAACCTGAAGCAGTCCAACACGCTGCTGATCTTCATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGT
GTGATGTTCCGTA

PG-B4.1

AGTGAAGCGCGTCTGTTATTAGCATTAGCAATCCCGGTGATTCTCGCGCAAATCGCCCAAAC
TGCGATGGGTTTTGTCGATACCGTGATGGCGGGCGGCTATAGTGCCACCGACATGGCGGGCGGTCGC
TATCGGTACTTCTATCTGGCTTCCGGCGATCCTCTTTGGTACGGACTGCTGCTGGCATTAAACGCCG
GTTATCGCGCAATTAAATGGTTCCGGTGCACGTGAGCGCATTGCGCATCAGGTGCGACAAGGTTTC
TGGCTGGCAGGTTTTGTTTCCGTTCTCATTATGCTGGTGTGTGGAATGCAGGTTACATTATCCGCT
CCATGGAAAACATCGATCCGGCTCTGGCGGACAAAGCCGTGGGTTATCTGCGTGCGTTGTTGTGGG
GCGCGCCGGGATATCTGTTCTTCCAGGTTGCCCGTAACCAGTGTGAAGGTCTGGCAAAAACCAAGC
CGGGTATGGTAATGGGCTTTATCGGCCTGCTGGTGAACATCCCGGTGAACATATCTTTATTTATGG
TCATTTCCGTATGCCTGAGCTCGGTGGCGTTGGTTGTGGCGTGGCTACTGCGGCGGTGATTGGGTC
ATGTTT

PG-B5.2

CGAAAACAAACAGAAAGCGTTGGCGGCAGCACTGGGCCAGATTGAGAAACAATTTGGTAAA
GGCTCCATCATGCGCCTGGGTGAAGACCGTTCCATGGATGTGGAACCATCTCTACCGGTTGCTTT
CACTGGATATCGCGCTTGGGGC

PG-B5.5

GCCAGATTGAGAAACAATTTGGTAAAGGCTCCATCATGCGCCTGGGTGAAGACCGTTCCATG
GATGTGGAACCATCTCTACCGGTTGCTTTCACTGGATATCGCGCTTGGGGCAGGTGGTCTGCCG
ATGGGCCGTATCGTCGAAATCTACGGACCGGAATCTTCCGGTAAAACCACGCTGACGCTGCAGGTG
ATCGCCGCAGCGCAGCGTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTATCGATGCTGAACACGCGCTGGACCCA

ATCTACGCACGTAAACTGGGCGTCGATATCGACAACCTGCTGTGCTCCCAGCCGGACACCGGCGAG
CAGGCACTGGAAATCTGTGACGCCCTGGCGCGTTCTGGCGCAGTAGACGTTATCGTCGTTGACTCC
GTGGCGGCACTGACGCCGAAAGCGGAAATCGAAGGCGAAATCGGCGACTCTCACATGGGCCTTGC
GGCACGTATGATGAGCCAGGCGATGCGTAAGCTGGCGGGTAAC

PG-B5.13

CGGCAGCACTGGGCCAGATTGAGAAACAATTTGGTAAAGGCTCCATCATGCGCCTGGGTGAA
GACCGTTCCATGGATGTGGAACCATCTCTACCGGTTTCGCTTTCACTGGATATCGCGCTTGGGGCA
GGTGGTCTGCCGATGGGCCGTATCGTCGAAATCTACGGACCGGAATCTTCCGGTAAAACACGCTG
ACGCTGCAGGTGATCGCCGCAGCGCAGCGTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTATCGATGCTGAACAC
GCGCTGGACCAATCTACGCACGTAAACTGGGCGTCGATA

PG-B5.14

GGCAGCACTGGGCCAGATTGAGAAACAATTTGGTAAAGGCTCCATCATGCGCCTGGGTGAA
GACCGTTCCATGGATGTGGAACCATCTCTACCGGTTTCGCTTTCACTGGATATCGCGCTTGGGGCA
GGTGGTCTGCCGATGGGCCGTATCGTCGAAATCTACGGACCGGAATCTTCCGGTAAAACACGCTG
ACGCTGCAGGTGATCGCCGCAGCGCAGCGTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTATCGATGCTGAACAC
GCGCTGGACCAATCTACGCACGTAAACTGGGCGTCGATATCGACAACCTGCTGTGCTCCCAGCCG
GACACCGGCGAGCAGGCACTGGAAATCTGTGACGCCCTGGCGCGTTCTGGCGCAGTAGACGTTATC
GTCGTTGACTCCGTGGCGGCACTGACGCCGAAAGCGGAAATCGAAGGCGAAATCGGCGACTCTCA
CATGGGCCTTGGCGCACGTATGATGAGCCAGGCGATGCGTAAGCTGGCGGGTAACCTGAAGCAGT
CCAACACGCTGCTGATCTTCATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGTGTGATGTTTCGGTAACCCGG
AAACCACTACCGG

PG-B6.4

CTATCGACGAAAACAAACAGAAAGCGTTGGCGGCAGCACTGGGCCAGATTGAGAAACAATT
TGGTAAAGGCTCCATCATGCGCCTGGGTGAAGACCGTTCCATGGATGTGGAACCATCTCTACCGG
TTCGCTTTCACTGGATATCGCGCTTGGGGCAGGTGGTCTGCCGATGGGCCGTATCGTCGAAATCTAC
GGACCGGAATCTTCCGGTAAAACACGCTGACGCTGCAGGTGATCGCCGCAGCGCAGCGTGAAGG
TAAAACCTGTGCGTTTATCGATGCTGAACACGCGCTGGACCAATCTACGCACGTAAACTGGGCGT
CGATATCGACAACCTGCTGTGCTCCCAGCCGGACACCGGCGAGCAGGCACTGGAAATCTGTGACGC
CCTGGCGCGTTCTGGCGCAGTAGACGTTATCGTCGTTGACTCCGTGGCGGCACTGACGCCGAAAGC
GGAAATCGAAGGCGAAATCGGCGACTCTCACATGGGCCTTGGCGCACGTATGATGAGCCAGGCGA
TGCGTAAGCTGGCGGGTAACCTGAAGCAGTCCAACACGCTGCTGATCTTCATCAACCAGATCCGTA
TGAAAATTGGTG

PG-B6.5

GGCAGCACTGGGCCAGATTGAGAAACAATTTGGTAAAGGCTCCATCATGCGCCTGGGTGAA
GACCGTTCCATGGATGTGGAACCATCTCTACCGGTTTCGCTTTCACTGGATATCGCGCTTGGGGCA
GGTGGTCTGCCGATGGGCCGTATCGTCGAAATCTACGGACCGGAATCTTCCGGTAAAACACGCTG
ACGCTGCAGGTGATCGCCGCAGCGCAGCGTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTATCGATGCTGAACAC
GCGCTGGACCAATCTACGCACGTAAACTGGGCGTCGATATCGACAACCTGCTGTGCTCCCAGCCG
GACACCGGCGAGCAGGCACTGGAAATCTGTGACGCCCTGGCGCGTTCTGGCGCAGTAGACGTTATC
GTCGTTGACTCCGTGGCGGCACTGACGCCGAAAGCGGAAATCGAAGGCGAAATCGGCGACTCTCA
CATGGGCCTTGGCGCACGTATGATGAGCCAGGCGATGCGTAAGC

PG-C3.1

GAAACAATTTGGTAAAGGCTCCATCATGCGCCTGGGTGAAGACCGTTCCATGGATGTGGA
CCATCTCTACCGGTTTCGCTTTCACTGGATATCGCGCTTGGGGCAGGTGGTCTGCCGATGGGCCGTAT
CGTCGAAATCTACGGACCGGAATCTTCCGGTAAAACACGCTGACGCTGCAGGTGATCGCCGCAGC
GCAGCGTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTATCGATGCTGAACACGCGCTGGACCAATCTACGCACG
TAAACTGGGCGTCGATATCGACAACCTGCTGTGCTCCCAGCCGGACACCGGCGAGCAGGCACTGG
AAATCTGTGACGCCCTGGCGCGTTCTGGCGCAGTAGACGTTATCGTCGTTGACTCCGTGGCGGCAC

TGACGCCGAAAGCGGAAATCGAAGGCGAAATCGGCGACTCTCACATGGGCCTTGCGGCACGTATG
ATGAGCCAGGCGATGCGTAAGCTGGCGGGTAACCTGAAGCAGT

PE-2

TCAGTGAAGCGCGTCTGTTATTAGCATTAGCAATCCCGGTGATTCTCGCGCAAATCGCCCAA
ACTGCGATGGGTTTTGTCGATACCGTGATGGCGGGCGGCTATAGTGCCACCGACATGGCGGCGGTG
GCTATCGGTACTTCTATCTGGCTTCCGGCGATCCTCTTTGGTCACGGAAGTCTGCTGGCATTAAACGC
CGGTTATCGCGCAATTAAATGGTTCCGGTCGACGTGAGCGCATTGCGCATCAGGTGCGACAAGGTT
TCTGGCTGGCAGGTTTTGTTTCCGTTCTCATTATGCTGGTGCTGTGGAATGCAGGTTACATTATCCG
CTCCATGGAAAACATCGATCCGGCTCTGGCGGACAAAGCCGTGGGTTATCTGCGTGCGTTGTTGTG
GGGCGCGCCGGGATATCTGTTCTTCCAGGTTGCCCGTAACCAGTGTGAAGGTCTGGCAAAAACCAA
GCCGGGTATGGTAATGGGCTTTATCGGCCTGCTGGTGAACATCCCGGTGAACTATATCTTTATTTAT
GGTCATTTCCGGTATGCCTGAGCTCGGTGGCGTTGGTTGTGGCGTGGCTACTGCGGCGGTGTATTGG
GTCATGT

PE-3

AAGCGTTGGCGGCAGCACTGGGCCAGATTGAGAAACAATTTGGTAAAGGCTCCATCATGCGC
CTGGGTGAAGACCGTTCCATGGATGTGGAACCATCTCTACCGGTTTCGCTTTCACTGGATATCGCG
CTTGGGGCAGGTGGTCTGCCGATGGGCCGTATCGTCGAAATCTACGGACCGGAATCTTCCGGTAAA
ACCACGCTGACGCTGCAGGTGATCGCCGCAGCGCAGCGTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTATCGAT
GCTGAACACGCGCTGGACCCAATCTACGCACGTAAACTGGGCGTCGATATCGACAACCTGCTGTGC
TCCCAGCCGGACACCGGCGAGCAGGCACTGGAAATCTGTGACGCCCTGGCGCGTTCTGGCGCAGTA
GACGTTATCGTCGTTGACTCCGTGGCGGCACTGACGCCGAAAGCGGAAATCGAAGGCGAAATCGG
CGACTCTCACATGGGCCTTGCGGCACGTATGATGAGCCAGGCG

PE-4

TCAGTGAAGCGCGTCTGTTATTAGCATTAGCAATCCCGGTGATTCTCGCGCAAATCGCCCAA
ACTGCGATGGGTTTTGTCGATACCGTGATGGCGGGCGGCTATAGTGCCACCGACATGGCGGCGGTG
GCTATCGGTACTTCTATCTGGCTTCCGGCGATCCTCTTTGGTCACGGAAGTCTGCTGGCATTAAACGC
CGGTTATCGCGCAATTAAATGGTTCCGGTCGACGTGAGCGCATTGCGCATCAGGTGCGACAAGGTT
TCTGGCTGGCAGGTTTTGTTTCCGTTCTCATTATGCTGGTGCTGTGGAATGCAGGTTACATTATCCG
CTCCATGGAAAACATCGATCCGGCTCTGGCGGACAAAGCCGTGGGTTATCTGCGTGCGTTGTTGTG
GGGCGCGCCGGGATATCTGTTCTTCCAGGTTGCCCGTAACCAGTGTGAAGGTCTGGCAAAAACCAA
GCCGGGTATGGTAATGGGCTTTATCGGCCTGCTGGTGAACATCCCGGTGAACTATATCTTTATTTAT
GGTCATTTCCGGTATGCCTGAGCTCGGTGGCGTTGGTTGTGGCGTGGCTACTGCGGCGGTGTATTGG
GTCAT
GT

PE-7

GCTATCGACGAAACAAACAGAAAGCGTTGGCGGCAGCACTGGGCCAGATTGAGAAACAATT
TGGTAAAGGCTCCATCATGCGCCTGGGTGAAGACCGTTCCATGCATGTGGAACCATCTCTACGGTT
CGCTTCACTGGAATATCGCGCGCTTGGGGCAGTGGTCTGCCGATGGGCCGTTATCGTCGAAATCTA
CGGGACCGGAATTTCTCCGGTAAAACCACCGCTGACCGCTGCAAGTGGTACCGCCGCCACCGCAGC
GGTGAGAGGGTAAAACCTGGTGCGGTTTTATCCATGCGTGA

PE-12

AGCGTTGGCGGCAGCACTGGGCCAGATTGAGAAACAATTTGGTAAAGGCTCCATCATGCGCC
TGGGTGAAGACCGTTCCATGGATGTGGAACCATCTCTACCGGTTTCGCTTTCACTGGATATCGCGCT
TGGGGCAGGTGGTCTGCCGATGGGCCGTATCGTCGAAATCTACGGACCGGAATCTTCCGGTAAAAC
CACGCTGACGCTGCAGGTGATCGCCGCAGCGCAGCGTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTATCGATGC
TGAACACGCGCTGGACCCAATCTACGCACGTAAACTGGGCGTCGATATCGACAACCTGCTGTGCTC
CCAGCCGGACACCGGCGAGCAGGCACTGGAAATCTGTGACGCCCTGGCGCGTTCTGGCGCAGTAG
ACGTTATCGTCGTTGACTCCGTGGCGGCACTGACGCCGAAAGCGGAAATCGAAGGCGAAATCGGC

GACTCTCACATGGGCCTTGCGGCACGTATGATGAGCCAGGCGATGCGTAAGCTGGCGGGTAACCTG
AAGCAGTCCAACACGCTGCTGATCTTCATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGTGTGATGTTCCGT
AACCCGGAAC

PE-21

AGAAACAATTTGGTAAAGGCTCCATCATGCGCCTGGGTGAAGACCGTTCCATGGATGTGGAA
ACCATCTCTACCGGTTTCGCTTTCACTGGATATCGCGCTTGGGGCAGGTGGTCTGCCGATGGGCCGTA
TCGTGCAAATCTACGGACCGGAATCTTCCGGTAAAACCACGCTGACGCTGCAGGTGATCGCCGCAG
CGCAGCGTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTATCGATGCTGAACACGCGCTGGACCCAATCTACGCAC
GTAAACTGGGCGTCGATATCGACAACCTGCTGTGCTCCCAGCCGGACACCGGCGAGCAGGCACTG
GAAATCTGTGACGCCCTGGCGCGTTCTGGCGCAGTAGACGTTATCGTCGTTGACTCCGTGGCGGCA
CTGACGCCGAAAGCGGAAATCGAAGGCGAAATCGGCGACTCTCACATGGGCCTTGCGGCACGTAT
GATGAGCCAGGCGATGCGTAAGCTGGCGGGTAACCTGAAGCAG

PE-22

GCGTTGGCGGCAGCACTGGGCCAGATTGAGAAACAATTTGGTAAAGGCTCCATCATGCGCCT
GGGTGAAGACCGTTCCATGGATGTGGAAACCATCTCTACCGGTTTCGCTTTCACTGGATATCGCGCTT
GGGGCAGGTGGTCTGCCGATGGGCCGTATCGTCGAAATCTACGGACCGGAATCTTCCGGTAAAACC
ACGCTGACGCTGCAGGTGATCGCCGACGCGACGCTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTATCGATGCT
GAACACGCGCTGGACCCAATCTACGCCACGTAAACTGGG

PE-29

AGCGTTGGCGGCAGCACTGGGCCAGATTGAGAAACAATTTGGTAAAGGCTCCATCATGCGCC
TGGGTGAAGACCGTTCCATGGATGTGGAAACCATCTCTACCGGTTTCGCTTTCACTGGATATCGCGCT
TGGGGCAGGTGGTCTGCCGATGGGCCGTATCGTCGAAATCTACGGACCGGAATCTTCCGGTAAAAC
CACGCTGACGCTGCAGGTGATCGCCGACGCGACGCTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTATCGATGC
TGAACACGCGCTGGACCCAATCTACGCACGTAAACTGGGCGTCGATATCGACAACCTGCTGTGCTC
CCAGCCGGACACCGGCGAGCAGGCACTGGAAATCTGTGACGCCCTGGCGCGTTCTGGCGCAGTAG
ACGTTATCGTCGTTGACTCCGTGGCGGCACTGACGCCGAAAGCGGAAATCGAAGGCGAAATCGGC
GACTCTCACATGGGCCTTGCGGCACGTATGATGAGCCAGGCGATGCGTAAGCTGGCGGGTAACCTG
AAGCAGTCCAACACGCTGCTGATCTTCATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGTGTGATGTTCCGT
AACCCGGAAC

PE-30

AAGCGTTGGCGGCAGCACTGGGCCAGATTGAGAAACAATTTGGTAAAGGCTCCATCATGCGC
CTGGGTGAAGACCGTTCCATGGATGTGGAAACCATCTCTACCGGTTTCGCTTTCACTGGATATCGCG
CTTGGGGCAGGTGGTCTGCCGATGGGCCGTATCGTCGAAATCTACGGACCGGAATCTTCCGGTAAA
ACCACGCTGACGCTGCAGGTGATCGCCGACGCGACGCTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTATCGAT
GCTGAACACGCGCTGGACCCAATCTACGCACGTAAACTGGGCGTCGATATCGACAACCTGCTGTGC
TCCCAGCCGGACACCGGCGAGCAGGCACTGGAAATCTGTGACGCCCTGGCGCGTTCTGGCGCAGTA
GACGTTATCGTCGTTGACTCCGTGGCGGCACTGACGCCGAAAGCGGAAATCGAAGGCGAAATCGG
CGACTCTCACATGGGCCTTGCGGCACGTATGATGAGCCAGGCGATGCGTAAGCTGGCGGGTAACCT
GAAGCAGTCCAACACGCTGCTGATCTTCATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGTGTGATGTTCCG
TAACCCGGAAC

PE-31

AAAGCGTTGGCGGCAGCACTGGGCCAGATTGAGAAACAATTTGGTAAAGGCTCCATCATGC
GCCTGGGTGAAGACCGTTCCATGGATGTGGAAACCATCTCTACCGGTTTCGCTTTCACTGGATATCG
CGCTTGGGGCAGGTGGTCTGCCGATGGGCCGTATCGTCGAAATCTACGGACCGGAATCTTCCGGTA
AAACCACGCTGACGCTGCAGGTGATCGCCGACGCGACGCTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTATCG
ATGCTGAACACGCGCTGGACCCAATCTACGCACGTAAACTGGGCGTCGATATCGACAACCTGCTGT
GCTCCCAGCCGGACACCGGCGAGCAGGCACTGGAAATCTGTGACGCCCTGGCGCGTTCTGGCGCA
GTAGACGTTATCGTCGTTGACTCCGTGGCGGCACTGACGCCGAAAGCGGAAATCGAAGGCGAAAT

CGGCGACTCTCACATGGGCCTTGCGGCACGTATGATGAGCCAGGCGATGCGTAAGCTGGCGGGTA
ACCTGAAGCAGTCCAACACGCTGCTGATCTTCATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGTGTGATGT
TCGTAACCCGGAA

PE-35

GGGCCAGATTGAGAAACAATTTGGTAAAGGCTCCATCATGCGCCTGGGTGAAGACCGTTCCA
TGGATGTGGAAACCATCTCTACCGGTTTCGCTTTCACTGGATATCGCGCTTGGGGCAGGTGGTCTGCC
GATGGGCCGTATCGTCGAAATCTACGGACCGGAATCTTCCGGTAAAACCACGCTGACGCTGCAGGT
GATCGCCGACGCGCAGCGTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTATCGATGCTGAACACGCGCTGGACCC
AATCTACGCACGTAAACTGGGCGTCGATATCGACAACCTGCTGTGCTCCAGCCGGACACCGGCGA
GCAGGCACTGGAAATCTGTGACGCCCTGGCGCGTTCTGGCGCAGTAGACGTTATCGTCGTTGACTC
CGTGGCGGCACTGACGCCGAAAGCGGAAATCGAAGGCGAAATCGGCGACTCTCACATGGGCCTTG
CGGCACGTATGATGAGCCAGGCGATGCGTAAGCTGGCGGGTA

PE-40

AAGCGTTGGCGGCAGCACTGGGCCAGATTGAGAAACAATTTGGTAAAGGCTCCATCATGCGC
CTGGGTGAAGACCGTTCCATGGATGTGGAAACCATCTCTACCGGTTTCGCTTTCACTGGATATCGCG
CTTGGGGCAGGTGGTCTGCCGATGGGCCGTATCGTCGAAATCTACGGACCGGAATCTTCCGGTAAA
ACCACGCTGACGCTGCAGGTGATCGCCGACGCGCAGCGTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTATCGAT
GCTGAACACGCGCTGGACCCAATCTACGCACGTAAACTGGGCGTCGATATCGACAACCTGCTGTGC
TCCCAGCCGGACACCGGCGAGCAGGCACTGGAAATCTGTGACGCCCTGGCGCGTTCTGGCGCAGTA
GACGTTATCGTCGTTGACTCCGTGGCGGCACTGACGCCGAAAGCGGAAATCGAAGGCGAAATCGG
CGACTCTCACATGGGCCTTGCGGCACGTATGATGAGCCAGGCGATGCGTAAGCTGGCGGGTAACCT
GAAGCAGTCCAACACGCTGCTGATCTTCATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGTGTGATGTTCCG
TAACCCGGAAA

PE-41

AAGCGTTGGCGGCAGCACTGGGCCAGATTGAGAAACAATTTGGTAAAGGCTCCATCATGCGC
CTGGGTGAAGACCGTTCCATGGATGTGGAAACCATCTCTACCGGTTTCGCTTTCACTGGATATCGCG
CTTGGGGCAGGTGGTCTGCCGATGGGCCGTATCGTCGAAATCTACGGACCGGAATCTTCCGGTAAA
ACCACGCTGACGCTGCAGGTGATCGCCGACGCGCAGCGTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTATCGAT
GCTGAACACGCGCTGGACCCAATCTACGCACGTAAACTGGGCGTCGATATCGACAACCTGCTGTGC
TCCCAGCCGGACACCGGCGAGCAGGCACTGGAAATCTGTGACGCCCTGGCGCGTTCTGGCGCAGTA
GACGTTATCGTCGTTGACTCCGTGGCGGCACTGACGCCGAAAGCGGAAATCGAAGGCGAAATCGG
CGACTCTCACATGGGCCTTGCGGCACGTATGATGAGCCAGGCGATGCGTAAGCTGGCGGGTAACCT
GAAGCAGTCCAACACGCTGCTGATCTTCATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGTGTGATGTTCCG
TAACCCGGAAA

PE-42

AAGCGTTGGCGGCAGCACTGGGCCAGATTGAGAAACAATTTGGTAAAGGCTCCATCATGCGC
CTGGGTGAAGACCGTTCCATGGATGTGGAAACCATCTCTACCGGTTTCGCTTTCACTGGATATCGCG
CTTGGGGCAGGTGGTCTGCCGATGGGCCGTATCGTCGAAATCTACGGACCGGAATCTTCCGGTAAA
ACCACGCTGACGCTGCAGGTGATCGCCGACGCGCAGCGTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTATCGAT
GCTGAACACGCGCTGGACCCAATCTACGCACGTAAACTGGGCGTCGATATCGACAACCTGCTGTGC
TCCCAGCCGGACACCGGCGAGCAGGCACTGGAAATCTGTGACGCCCTGGCGCGTTCTGGCGCAGTA
GACGTTATCGTCGTTGACTCCGTGGCGGCACTGACGCCGAAAGCGGAAATCGAAGGCGAAATCGG
CGACTCTCACATGGGCCTTGCGGCACGTATGATGAGCCAGGCGATGCGTAAGCTGGCGGGTAACCT
GAAGCAGTCCAACACGCTGCTGATCTTCATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGTGTGATGTTCCG
TAACCCGGAAA

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Anı Altuğ CURNA
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Muğla 21.01.1992
Telefon : 0 (531) 391 36 33
E-mail : anialtug1992@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı	2017- Devam ediyor
Lisans	Ankara Üniversitesi- Fen Fakültesi- Biyoloji Bölümü	2015

PROJELER

Proje Adı	Kurum	Bütçe	Yılı	Görev	Proje Türü
KEMOTERAPİ AJANI DOKSORUBİSİN'İN ESCHERİCHİA COLİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ VE DİRENÇLE İLGİLİ GENLERİN GENOM BOYU KÜTÜPHANE VE TARAMA ÇALIŞMALARI İLE ARAŞTIRILMASI	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	10.000 TL	2019	Araştırmacı	Kurumsal