

***Tetrahymena thermophila*'da AFİNİTİK TAKILI İNSAN BÜYÜME
HORMONU'NUN TETRAHYMENA YAPAY KROMOZOM VEKTÖR
ALTYAPISI İLE REKOMBİNANT ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

Mehmet ÇALISEKİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İleri Teknolojiler Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Bilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU**

**Eskişehir
Eskişehir Teknik Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Mayıs 2019**

Bu tez çalışması BAP Komisyonu tarafından kabul edilen 1803F062 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Mehmet ÇALISEKİ'nin “*Tetrahymena thermophila*'da Afinitik Takılı İnsan Büyüme Hormonu'nun Tetrahymena Yapay Kromozom Vektör Altyapısı ile Rekombinant Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” Başlıklı tezi 14/05/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, İleri Teknolojiler Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Unvanı/Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı)

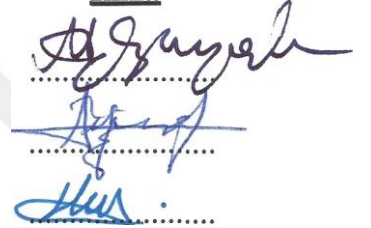
: Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU

Üye

: Doç. Dr. Berrin ERDAĞ

Üye

: Doç. Dr. Hülya ALTUNTAŞ



Prof. Dr. Murat TANIŞLI

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Tetrahymena thermophila'da AFİNİTİK TAKILI İNSAN BÜYÜME HORMONU'NUN TETRAHYMENA YAPAY KOROMOZOM VEKTÖR ALTYAPISI İLE REKOMBİNANT ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Mehmet ÇALISEKİ

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı-Biyoteknoloji Bilim Dalı
Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Mayıs 2019
Danışman: Doç. Dr. Muhittin Arslanyolu

Ülkemizin 2023 hedefi, sağlık alanında ilaç üretim altyapısının yetişmiş insan ve şirketleşme ile oluşturulmasıdır. Bu tez kapsamında; alternatif protein üretim konakçısı *Tetrahymena thermophila*'da insan terapötik proteinlerinden insan büyüme hormonunun (hGH) üretimi, amaçlanmıştır. hGH üretiminin vektörel altyapısında, İyi İmalat Uygulamalarına (İİU) uygun yüksek kopya sayılı dairesel *T. thermophila* makronükleer yapay kromozom-2 (TtAC2)'nin kullanımı planlanmıştır. TtAC2'nin ısı ile indüklenebilir HSP70.2 ısı şoku promotörünün kontrolü altına kodon uyumlu hGH kodlayıcı DNA dizileri klonlanmıştır. Biyolistik silah ile *T. thermophila* CU428 ırkına vektörler transforme edilmiştir. GFP-hGH füzyon proteini sitoplazmik üretimi 50 kDa monomer-101 kDa dimer, 6xHis-hGH ve takısız hGH proteinlerinin sitoplazmik üretimi ise 17 kDa-22 kDa monomer ve 34 kDa-44 kDa dimer olarak SDS-PAGE ve Western Blot analizleri ile gösterilmiştir. PLA22/23 sinyal peptid dizisi kullanılarak, endoplazmik retikulum üzerinden hücre dışına yönlendiren 6XHis-hGH ve takısız hGH'ın hücre dışına salgılandığı ELİZA ile tespit edilmiştir. Literatür kapsamında hipotezlenen hücre dışına salgılanan hGH'ın *T. thermophila* sekretom proteazları tarafından parçalandığı, in vitro proteolitik enzim aktivite testi sonuçları ile kanıtlanmıştır. Bu tez çalışması ile biyoaktivite analizleri için gerekli hGH proteinlerinin üretimi ve saflaştırılmasının vektörel altyapısı oluşturulmuştur. *T. thermophila*'da hGH üretim miktarının bu organizmanın proteaz genlerinin susturulması ve optimize biyoreaktör üretimiyle artırılabilceği, sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Tetrahymena thermophila*, TtAC2, hGH, terapötik protein üretimi

ABSTRACT

RECOMBINANT PRODUCTION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF AFFINITY-TAGGED HUMAN GROWTH HORMONE WITH TETRAHYMENA ARTIFICIAL CHROMOSOME VECTOR SYSTEM IN *Tetrahymena thermophila*

Mehmet ÇALISEKİ

Biotechnology Programme of Advanced Technologies Department

Graduate School of Eskişehir Technical University, May 2019

Supervisor: Assistant Prof. Muhittin Arslanyolu

2023 National Vision plans to establish the pharmaceutical production substructure in the field of health through trained human resources and corporatization. In this thesis; human growth hormone (hGH), which is one of the human therapeutic proteins, is aimed to be produced in *Tetrahymena thermophila* as an alternative protein production host. The use of high copy number *T. thermophila* macronuclear artificial chromosome-2 (TtAC2) adapted for Good Manufacturing Practices (GMP) is planned as the vector infrastructure in hGH production. Codon-optimized hGH encoding DNA sequences were cloned into the TtAC2 vector, which is under the kontrol of the heat-inducible HSP70.2 heat shock promoter for protein expression. The vectors were transformed to the *T. thermophila* CU428 strain by the biolistic gun. The cytoplasmic production of the GFP-hGH fusion protein as 50 kDa monomer-101 kDa dimer, 6xHis-hGH and untagged-hGH cytoplasmic proteins as 17 kDa-22 kDa monomers and 34 kDa-44 kDa dimers were demonstrated by SDS-PAGE and Western Blot analysis. Secreted hGH was extracellularly detected by ELISA analysis when 6XHis-hGH and untagged-hGH was produced by PLA22/23 signal peptide sequence directing the extracellular environment through endoplasmic reticulum. The literature based hypothesis about the degradation of secreted hGH by secretomic proteases has been confirmed by the results of in vitro proteolytic enzyme activity assay. In this thesis, the vector infrastructure developed for the production and purification of hGH could be used in the bioactivity characterization. As a result; the production amounts of hGH in *T. thermophila* can be increased by silencing protease genes of the organism and optimized bioreactor culturing.

Keywords: *Tetrahymena thermophila*, TtAC2, hGH, therapeutic protein production

TEŞEKKÜR

Lisans ve lisansüstü eğitimim boyunca akademik, maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve bu tez çalışmasını gerçekleştirebilmemi sağlayan sayın danışmanım Dr. Muhittin ARSLANYOLU'na,

Lisans eğitimim olmak üzere yüksek lisans boyunca da tüm bilgi ve birikimini yardımlarıyla esirgemeyen, manevi desteğiyle bana ışık tutan, gelecekte de yollarımızın kesişmesini dilediğim, değerli ve çok iyi bir Dr. adayı olan hocam Ayça Fulya ÜSTÜNTANIR DEDE'ye,

Laboratuvar ekibimizde, bana gerek akademik gerekse manevi desteklerde bulunan Murat KAYA, Nurçin KÜÇÜKOĞLU, Erhan ASLAN, Handan Açelya KAPKAÇ hocalarıma,

Hayatım boyunca desteklerini hissettiğim ve bugünlere ulaşmamda büyük emekleri olan tüm aileme,

Yüksek lisans eğitimimin son yılında, TÜBİTAK 2211 Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı kapsamında 2210-C Yüksek Lisans Öncelikli Alanlar Bursu Programı (Sağlık/İlaç) desteğiyle çalışmalarımda büyük bir motivasyon sağlamama olanak veren TÜBİTAK BİDEB kurumuna,

Bilimin gelişmesi adına emek veren tüm bilim insanlarına, içtenlikle sevgimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Mehmet ÇALISEKİ

14 Mayıs 2019

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmamın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.



Mehmet ÇALISEKİ

14/05/2019

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar/ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. MATERYAL VE YÖNTEM	12
2.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Irklar ve Kültürizasyon Yöntemleri	12
2.2. İnsan Büyüme Hormonu Üretimi İçin Kullanılan Vektör Sistemi	12
2.3. İnsan Büyüme Hormonunun Gen Dizisinin Hazırlanması ve Vektörlerin Oluşturulması	14
2.4. Rekombinant Vektörlerin <i>T. thermophila</i> Hücrelerine Transformasyonu ve Pozitif Transformantların Seçilimi ile Tek Klon Eldesi	16
2.5. Transformant Hücrelerin Makroçekirdeğinde hGH Gen Dizilerinin Varlık Analizi	17
2.6. Transformant Hücrelerin İndüklenme Aşamaları	18
2.7. Pozitif Tek Hücre Klonu Transformantlarında Protein Analizleri	18

3. BULGULAR	20
3.1. Takılı ve takısız hGH gen dizilerinin TtAC2 Vektörüne Klonlanması.....	20
3.2. TtAC2 Vektörünün <i>T. thermophila</i> Vejetatif Hücrelerine Transformasyonu	23
3.3. <i>T. thermophila</i> Transformant Hücrelerinin Makroçekirdeğinde hGH Gen Dizilerinin PZR ile Tespiti	24
3.4. Pozitif Transformantların Protein Seviyesinde Gen İfade Analizleri	25
3.4.1. <i>T. thermophila</i> pTtAC2-6xHis-GFP-EK.-hGH tek hücre klonlarının protein ifade analizi	25
3.4.2. <i>T. thermophila</i> pTtAC2-6xHis-hGH tek hücre klonlarının protein ifade analizi	27
3.4.3. <i>T. thermophila</i> pTtAC2-hGH tek hücre klonlarının protein ifade analizi	29
3.4.4. <i>T. thermophila</i> pTtAC2-PLA23-6xHis-hGH tek hücre klonlarının protein ifade analizi	32
3.4.5. <i>T. thermophila</i> PLA22-hGH tek hücre klonlarının protein ifade analizi	34
3.4.6. <i>T. thermophila</i> 'da hGH üretim verimini azaltan unsurların belirlenmesi	36
3.4.7. hGH üretimlerinin ELİZA ile varlık ve miktarsal analizi	39
4. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER	42
4.1. Sonuç	42
4.2. Tartışma	45
4.3. Öneriler	57
KAYNAKÇA	58
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR/ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1. hGH üretimi gerçekleştirilen organizmalar ve üretim miktarları	6
Tablo 1.2. <i>T. thermophila</i> 'da heterolog protein üretim koşulları ve miktarları ...	9
Tablo 2.3. Seleksiyonda zamana bağlı olarak paramomisin ve CdCl ₂ kullanım miktarları	16



ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. İnsan Büyüme Hormonu Reseptörü ve İnsan Büyüme Hormonunun Etki Mekanizmaları	2
Şekil 1.2. İnsan Büyüme Hormonu Kodlayıcı Genlerin İnsan Kromozomunda Lokasyonu, Özellikleri ve Moleküler Yapısı	4
Şekil 1.3. İnsan Büyüme Hormonu Moleküler Yapısı	5
Şekil 1.4. <i>Tetrahymena thermophila</i> mikroskopik görüntüsü ve çekirdek dimorfizmi	8
Şekil 2.1. TtAC2 dairesel vektörü yapısı	14
Şekil 3.1. Takılı ve takısız hGH kodlayıcı gen dizilerinin yapısı	21
Şekil 3.2. hGH gen dizileri içeren TtAC2 vektörlerinin restriksiyon enzimleriyle kesim analizi	22
Şekil 3.3. Takılı ve takısız hGH gen dizileri içeren TtAC2 vektörü bulunduran pozitif transformant hücrelerinin makroçekirdeğinde hGH gen dizilerinin PZR ile tespiti	24
Şekil 3.4. pTtAC2-6xHis-sfGFP-EK.-hGH vektörü taşıyan <i>T. thermophila</i> D1, F1, H1 tek hücre klonlarının 38°C’de 6 saat ısı şoku indüklemesi ve sitoplazmik protein üretim analizi	26
Şekil 3.5. pTtAC2-6xHis-hGH vektörü taşıyan <i>T. thermophila</i> B11 tek hücre klonlarının 38°C’de 6 saat ısı şoku indüklemesi ve sitoplazmik toplam çözümler proteinlerinin Western Blot ve SDS-PAGE analizi ...	28
Şekil 3.6. pTtAC2-hGH vektörü taşıyan <i>T. thermophila</i> A4 tek hücre klonlarının 38°C’de 6 saat ısı şoku indüklemesi ve sitoplazmik toplam çözümler proteinlerinin Western Blot ve SDS-PAGE analizi	30

Şekil 3.7. pTtAC2-hGH veya pTtAC2-6xHis-hGH vektörü taşıyan <i>T. thermophila</i> A4 ve B11 tek hücre klonlarının 38°C’de 6 saat ısı şoku indüklemesi ve sitoplazmik toplam çözünür proteinlerinin Western Blot ve SDS-PAGE analizi	31
Şekil 3.8. pTtAC2-PLA23-6xHis-hGH vektörlü 3 saat 38°C’de ısı şoku, 30°C’de 3 saat toparlanma, 38°C’de 3 saat ısı şoku ve 30°C’de 3 saat toparlanma periyodlarında indüklemesi yapılmış D5 tek klonları içeren <i>T. thermophila</i> hücre hatlarının dış ortam protein analizi	33
Şekil 3.9. pTtAC2-PLA22-hGH (takısız) vektörlü 38°C’de 3 saat ısı şoku, 30°C’de 3 saat toparlanma, 38°C’de 3 saat ısı şoku ve 30°C’de 3 saat toparlanma periyodlarında indüklemesi yapılmış C6 tek klonları içeren <i>T. thermophila</i> hücre hatlarının dış ortam protein analizi	35
Şekil 3.10. <i>Tetrahymena thermophila</i> CU428 hücrelerinin sekretomda salgılanan protezların insan büyüme hormonunu kesme analizi	37
Şekil 3.11. hGH kodlayıcı gen dizileri bulunan TtAC2 vektörlerini taşıyan <i>T. thermophila</i> tek hücre klonlarının 38°C 6 saat açlık tamponunda (Tris-HCL) ile ısı şoku indüklemesi ile protein üretiminin Western Blot Analizi	38
Şekil 3.12. hGH gen kaseti içeren TtAC2 taşıyan NEFF besiyerindeki <i>T. thermophila</i> tek hücre klonlarından ısı şoku indüklemesi ile elde edilen protein örneklerinin ELİZA ile analizi	40
Şekil 3.13. hGH gen kaseti içeren TtAC2 taşıyan açlık tamponundaki <i>T. thermophila</i> tek hücre klonlarından ısı şoku indüklemesi ile elde edilen protein örneklerinin ELİZA ile analizi	41
Şekil 4.1. HSP70.2 promotor versiyonları ile bu tez kapsamında üretilen hipotetik mutant IRES elementini içeren versiyonun karşılaştırması	46

Şekil 4.2. PLA1 sinyal peptid dizileri ile bu tez kapsamında geliştirilen PLA22/23'ün dizisel karşılaştırılması	51
Şekil 4.3. Biyoinformatik PROSPER programına göre insan büyüme hormonunun proteaz enzimleri ile kesime uğrayabilecek aminoasit pozisyonları	53
Şekil 4.4. <i>T. thermophila</i> CU438 hattı flask ve biyoreaktör kültür çalışmasında proteaz aktiviteleri ve proteaz aktivitesinin azaltılması için kullanılan moleküller	54
Şekil 4.5. <i>T. thermophila</i> ırklarının sekterom proteinleri analizi	56

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

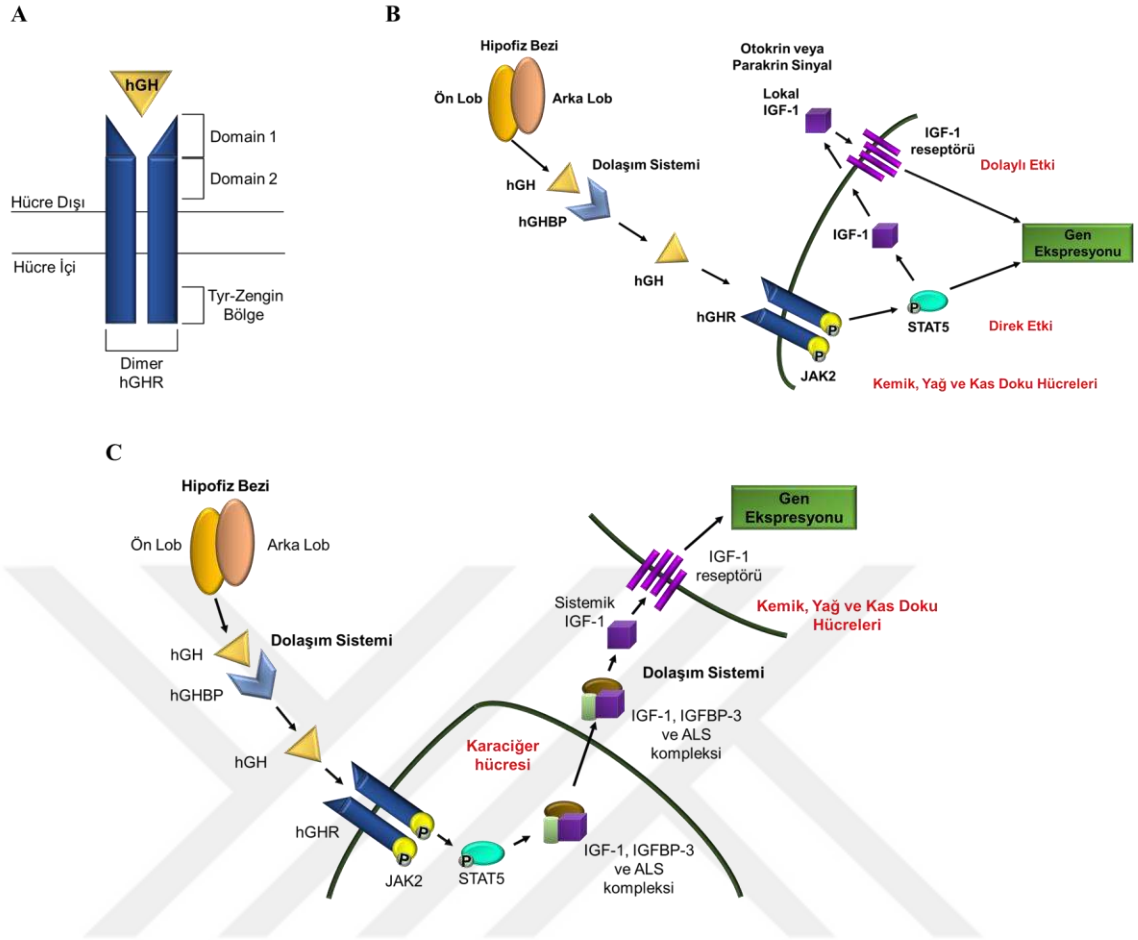
İİU	: İyi İmalat Uygulamaları (Good Manufacturing Practices, GMP)
AR-GE	: Araştırma ve Geliştirme çalışmaları
Terapötik protein	: Tedavi amaçlı kullanılan protein
<i>T. thermophila</i>	: <i>Tetrahymena thermophila</i>
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>P. pastoris</i>	: <i>Pichia pastoris</i>
hGH	: İnsan Büyüme Hormonu (Human Growth Hormone)
hGH-N (GH1)	: Hipofizden salgılanan insan büyüme hormonu
hGH-V (GH2)	: Plasentadan salgılan insan büyüme hormonu
hGHBP	: İnsan Büyüme Hormonu Bağlayıcı Protein
IGF-1	: İnsulin Benzer Büyüme Faktörü-1
IGFBP-3	: İnsulin Benzer Büyüme Faktörü-1 Bağlayıcı Protein 3
ALS	: Asit Değişken Altünite (Acid Labile Subunit)
JAK2	: Janus kinaz
STAT5	: Sinyal dönüştürü ve transkripsiyon aktivatörü 5
kDa	: Kilodalton
TtAC1	: <i>T. thermophila</i> makronükleer yapay kromozom-1
TtAC2	: <i>T. thermophila</i> makronükleer yapay kromozom-2
HSP70.2	: <i>T. thermophila</i> 70 kDa Isı Şoku Proteini-II geni
E.R.	: Endoplazmik Retikulum
PLA1	: <i>T. thermophila</i> Fosfolipaz A1 Proteini
PLA36	: <i>T. thermophila</i> Fosfolipaz A1 Proteininin dışarı salgılatma sinyal dizisinin ilk 36 amino asit kısmı veya kısmını kodlayan DNA dizisi
PLA22	: <i>T. thermophila</i> Fosfolipaz A1 Proteininin dışarı salgılatma sinyal dizisinin ilk 22 amino asit kısmı veya kısmını kodlayan DNA dizisi
PLA23	: <i>T. thermophila</i> Fosfolipaz A1 Proteininin dışarı salgılatma sinyal dizisinin ilk 23 amino asit kısmı veya kısmını kodlayan DNA dizisi
bç	: Baz Çifti (Base Pair-bp)
rDNA	: Ribozomal DNA
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
T.P.	: Toplam Protein (Çözünür)

Kons.	: Konsantre edilmiş
EK.	: Enterokinaz Enzimi Kesim Bölgesi
Bulk Transformant	: Seleksiyon Sonrası Toplam Transformant Havuzu
Ni-NTA	: Nikel-Nitrilotriasetik asit
a.a.	: amino asit
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
DH5α	: Doug Hanahan 5 α <i>E. coli</i> kompetent hücre
LB	: Lysogeny broth
PmeI	: <i>Pseudomonas mendocina</i> I restriksiyon enzimi
AscI	: <i>Arthrobacter species</i> I restriksiyon enzimi
MAC	: Makroçekirdek
MIC	: Mikroçekirdek
6xHis	: 6 adet histidin aminoasit takısı
N-glikozilasyon	: Asparajinin amino grubuna glikan eklenmesi
O-glikozilasyon	: Serin veya treoninin hidroksil grubuna glikan eklenmesi
N-ucu	: Proteinin amino grubu (NH ₂) terminali
C-ucu	: Proteinin karboksil grubu (COOH) terminali
ELİZA	: Enzimle Bağlanmış İmmünosorbent Deneyi
PİK	: Proteaz İnhibitör Kokteyli

1. GİRİŞ

İyi İmalat Uygulamaları (İİU, Good Manufacturing Practices, GMP) piyasaya sürülecek ürünlerin üretim, depolama ve tedarik aşamalarını kapsayan yönerge olup ulusal ve uluslararası kurumlar tarafından denetlenebilmektedir (Gouveia BG, 2015). Denetimi; ülkemizde T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Cihaz ve Tıbbi Cihaz Kurumu (Beşerî Tıbbi Ürünler İmalathaneleri İyi İmalat Uygulamaları Kılavuzu, versiyon 2018/02), Avrupa’da Avrupa Komisyonu (AB Mevzuatı Eudralex), Amerika’da U.S. Food and Drug Administration (FDA, cGMP) olup dünya çapında ise Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) kurumu gerçekleştirmektedir. Özellikle insan kullanımına sunulacak bir medikal ürünün tüm üretim aşamalarının İİU’ye uyumluluğu aranmaktadır. Üretim sırasında kullanılan tüm uygulamaların tüm talimatlara uygunluğu kayıt altına alınmalı, hedef ürünün yeterlilik-doğrulama tespitleri yapılmış olmalı ve uygun depolama-dağıtım şartları ile insan hayatını tehlikeye atabilecek tüm riskler giderilmiş olmalıdır. Bu tez çalışmasında; akademik AR-GE kapsamında rekombinant terapötik protein üretim aşamalarını kapsayan tüm moleküler biyomühendislik tasarımların İİU’ya uyumluluğu amaçlanmıştır. Üretilcek medikal ürün olan insan büyüme hormonunun (hGH) üretimi esnasında; gen bütünlüğü, ısı şoku ile indüklemesiyle toksik indükleyicilerin kullanılmaması, antibiyotik baskısına üretim aşamasında gerek duymayan genom entegrasyon stratejisiyle üretim veya ekstrakromozomal olarak kararlı yapay kromozom temelinde üretim, hücre dışına salgılatma ile daha az kontaminant varlığında saflaştırma ile affinitik bir takı eklemeksizin saflaştırma gibi İİU esaslarına uyumlu şartların geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Tez kapsamında, İİU uyumlu olarak üretimi amaçlanan terapötik protein insan büyüme hormonu (hGH, Somatotropin), insanda hipofiz bezinin ön lobunda bulunan Somatotrop hücreleri tarafından sentezlenerek, depolanır veya salgınır (Strobl ve Thomas, 1994; Cazares-Delgadillo vd., 2011). İnsan GH’ı direk ve dolaylı iki farklı etki mekanizmasına sahiptir. Direk etki; hipofiz bezinden salgılanan büyüme hormonunun kıkırdak dokudan hedef dokulara (kemik, yağ dokusu ve kas dokusu) ulaşmasıyla bu hücrelerde büyüme hormonu reseptörlerine (homomerik sitokin reseptörü) bağlanmasıyla başlar, JAK2/STAT5 sinyal yolağını aktiveştirerek büyüme ve gelişim için hücre metabolizmasını uyarmasıyla sonuçlanır (Şekil 1.1.B.).



Şekil 1.1. İnsan Büyüme Hormonu Reseptörü ve İnsan Büyüme Hormonunun Etki Mekanizmaları.

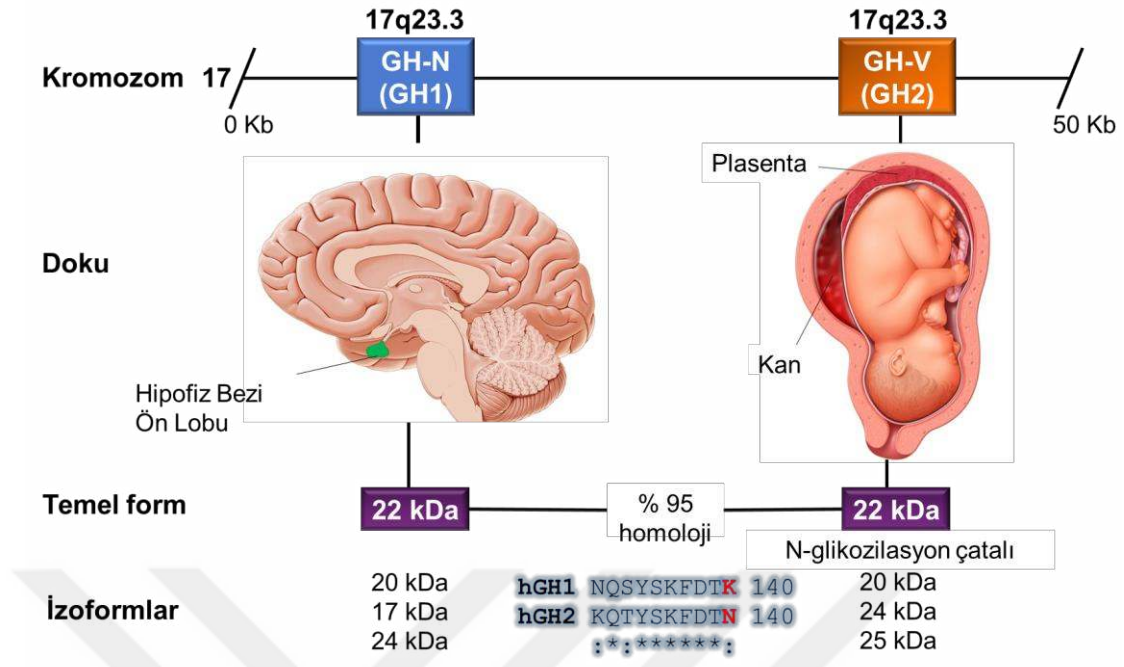
A. İnsan Büyüme Hormonu Reseptörü. Sitokin reseptörü ailesine ait bir homodimer reseptördür. hGH'ın reseptörün domain 1 bölgesine bağlanması ile domain 2 bölgesinde reseptörün dimerizasyonu gerçekleşir ve Tirozin (Tyr) zengin bölgesinden JAK2 fosforile edilerek JAK2/STAT5 sinyal yolağı aktifleşir (Bergan-Roller ve Sheridan, 2017, şekil referans alınarak tekrar çizilmiştir).

B. İnsan Büyüme Hormonunun Hedef Dokularda Direk ve Dolaylı Etkisi. Hipofiz bezinden salgılanan insan büyüme hormonu insanda dolaşım sisteminde büyüme hormonu bağlayıcı protein (hGHBP) ile taşınır. Bu birliktelik hGH'ın dolaşımında yarı ömrünü uzatmaktadır ve hGH aktivitesini de korumaktadır. Kemik, yağ ve kas doku hücrelerine ulaştığında hGH, reseptörüne bağlanır. JAK2 ve STAT5 fosforilasyonu ile sinyal yolağı etkinleşerek gen ekspresyonları ile sonuçlanır. Bu etki mekanizması direk etki olarak adlandırılır. Hücrelerde ayrıca otokrin veya parakrin etki olarak hGH'ın etkinleştirdiği JAK2/STAT5 sinyal yolağı ile lokal IGF-1 üretilir ve IGF-1 salınarak aynı hücrede veya komşu doku hücrelerindeki reseptörüne bağlanır. Burada farklı bir sinyal yolağı etkinleştirilir ve gen ekspresyonunu sağlanır (Reh ve Geffner, 2010 referans alınarak çizim gerçekleştirilmiştir.).

C. İnsan Büyüme Hormonunun Karaciğer Dokusu Üzerinden Dolaylı Etkisi. Hipofiz bezinden salgılanan insan büyüme hormonu insanda dolaşım sisteminde büyüme hormonu bağlayıcı protein (hGHBP) ile taşınır. Karaciğer dokusu hücrelerine ulaştığında burada reseptörüne bağlanarak JAK2/STAT5 sinyal yolağını etkinleştirir. Bunun sonucunda, hücrede IGF-1, IGF bağlayıcı protein-3 (IGFBP-3) ve asit değişken alt ünite (ALS) proteinleri sentezlenir. Bu proteinler hücrede kompleks oluşturularak salgılanır ve bu kompleks dolaşımında IGF-1'in yarı ömrünü uzatmaktadır. Sistemik IGF-1 kemik, yağ ve kas doku hücrelerine ulaşır. Burada IGF-1, reseptörüne bağlanarak sinyal yolağını aktifleştirir ve gen ekspresyonu gerçekleşir (Reh ve Geffner, 2010 referans alınarak çizim gerçekleştirilmiştir.).

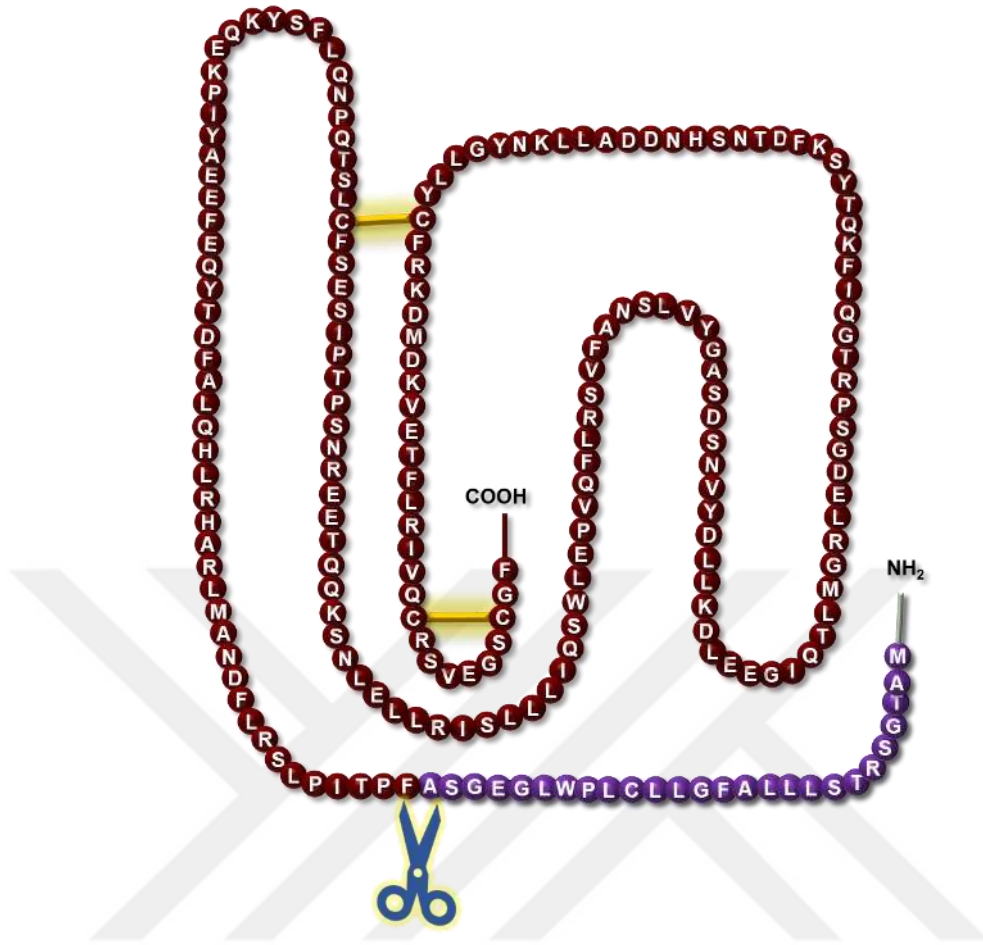
Dolaylı etki ise salgılanan büyüme hormonunun karaciğer hücrelerine ulaşması, büyüme hormonu reseptörlerine bağlanmasıyla, insülin benzer büyüme faktörü-1 (IGF-1) üretimini hedefleyen JAK2/STAT5b yolağını etkinleştirmesiyle başlar. Üretilen IGF-1 ise hedef dokulardaki hücrelere ulaşarak büyüme ve gelişimi tetikler ve hücrel metabolizmayı uyarır (Şekil 1.1.C.). hGH aracılığıyla hücre sinyal yollarının etkinleştirilmesiyle gerçekleşen gen ekspresyonları sonucunda **tüm hücrelerde;** makromolekül (k.h., lipid), aminoasit, nitrojen, mineral metabolizması hızlanması, **kemik dokuda;** ilkil kondrosit farklılaşması ve osteoblast genişlemesi ile doğrusal büyüme ve kütle artışı, **yağ dokuda;** hormon-duyarlı lipaz sentezi ile lipolizin (yağ yıkımı) artışı, glukoz taşınımı ve lipogenezin azalması, **kas dokusunda;** amino asit taşınımı hızlanması ve kas lifi dağılımı gerçekleşir (Reh ve Geffner., 2010). Literatürde, farelerin büyüme gelişiminde, büyüme hormonunun %14, IGF-1'in %35 etkisi olduğu bildirilmiştir (Lupu vd., 2001).

İnsan büyüme hormonunun varyantları ve izoformlarının bulunması sebebiyle moleküler biyolojisi ve fizyolojisinde farklılıklar görülmektedir. İnsanda 17. kromozomun uzun kolunda q23.3 lokasyonunda bulunan insan büyüme hormonu geni (GH-N, GH-1), komşu genler olan human chorinoic somatommatropin (HCS) ve insan büyüme hormonu varyantlarıyla (GH-V, GH-2) birlikte bulunmaktadır (D.C. Pérez-Ibave vd., 2014). Özellikle GH-V, plasentada salgılanmaktadır ve fetüs büyüme gelişiminde önemli role sahiptir. Hipofiz bezinin ön lobunda üretilen 191 aminoasitlik 22 kDa hGH'a (hGH-N) karşılık plasentada üretilen 22 kDa hGH (hGH-V) varyantı arasında bazı aminoasit farklılıkları bulunur. Ayrıca plasental hGH'ın 140. aminoasidine N-glikozilasyon çatalı eklenirken, hipofizden salgılanan hGH'da N-glikozilasyon çatalı bulunmamaktadır. Ancak başka bir aminoasit pozisyonunda O-glikozilasyon çatalı bulunduğu bildirilmiştir (Bustamante vd., 2009).



Şekil 1.2. İnsan Büyüme Hormonu Kodlayıcı Genlerin İnsan Kromozomunda Lokasyonu, Özellikleri ve Moleküler Yapısı. İnsanda 17. kromozomun q23.3 lokasyonunda hipofiz bezinin ön lobundan salgılanan hGH'ı kodlayan GH-N (GH-1) geni bulunmaktadır, bu genden 22 kDa hGH transle edilir ancak alternatif-splicing ve post-translasyonel mekanizmalar nedeniyle 20, 17, 24 kDa gibi birçok isoformlar da oluşmaktadır. İnsanda hGH ayrıca plasenta da sentezlenir ve varyant hGH olarak adlandırılır. 17. kromozomda lokalize GH-V (GH2) geninden 22 kDa ve 20, 24, 25 kDa hGH formları transle edilmektedir. Hipofiz 22 kDa hGH'ı ve plasental 22 kDa hGH'ı arasında %95 homoloji görülmektedir. 140. aminoasit konumunda plasental 22 kDa hGH'in asparajin (N) aminoasitinde N-glikozilasyon çatalı bulunurken, hipofiz 22 kDa hGH'in aynı pozisyonda lizin aminoasiti (K) olduğundan N-glikozilasyon çatalı bulunmamaktadır. GH-V geni ayrıca immünsistem, ovaryum ve testis hücrelerinden de eksprese edildiği literatürde belirtilmektedir (D.C. Pérez-Ibave vd., 2014, şekil referans alınarak çizim gerçekleştirilmiştir).

Varyantlardan farklı olarak, 22 kDa hGH'ın birçok izoformları da bulunmaktadır ve bu proteinler alternatif-splicing ve post-translasyonel mekanizmalar ile ortaya çıkmaktadır (EK-1). Örneğin 20 kDa hGH varyantı; hGH geninin 3. ekzonunda alternatif splicing nedeniyle kayıptan oluşur. 3. ekzonun kodladığı 32-46 aminoasitten oluşan ara dizi 20 kDa varyantta bu nedenle bulunmamaktadır. İkinci örnek ise 5 kDa ve 17 kDa hGH izoformları olup hGH proteinin 43-44. aminoasit pozisyonları arası bir proteolitik kesim ile oluşurlar. 5 kDa isoform 1-43 aminoasit arasını ve 17 kDa hGH izoformu ise 44-191 aminoasit arasını içermektedir (Warner vd., 1993; Lewis vd., 1994; Sinha ve Jacobsen 1994; Lopez-Guajardo vd., 1998). Ayrıca 22 kDa protein dimerleşerek 44 kDa'luk homodimer yapı oluşmaktadır (Grigorian vd., 2004).



Şekil 1.3. İnsan Büyüme Hormonu Moleküler Yapısı. hGH'nin N-ucunda yer alan 26 amino asitlik E.R'ye yönlendirici sinyal peptid dizisi, E.R'de kesilerek uzaklaştırılır. 22 kDa büyüklüğünde 191 aminoasitten oluşan hGH, 4 alfa heliks yapısı ve 2 disülfid köprüsü bulunduran bir polipeptittir (Graham vd., 2008'den değiştirilerek çizilmiştir).

1956 yılında ilk olarak insan hipofiz bezinden hGH izolasyonu ile başlayan ve rekombinant insan büyüme hormonu üretimleri ile devam eden süreçte, insan büyüme hormonu birçok farklı hastalıklar için temel ilaç veya takviye ilaç olarak kullanılmış ve kullanımı devam etmektedir. Günümüzde, insan büyüme hormonunun eksikliği veya işlevsizliğine dayanan hastalıkların tedavisinde, hipofiz bezinden salgılanan 22 kDa'luk form, rekombinant ilaç yapı olarak kullanılmaktadır. Büyüme hormonu eksikliği tedavisi, kronik böbrek yetmezliği, Turner sendromu, Prader-Willi sendromu, idiyopatik kısa boyluluk, Noonan sendromu ve AIDS ile ilişkili kaşeksi hastalıklarının tedavisinde, insan büyüme hormonu ilaçları FDA onaylı olarak kullanılmaktadır (Laurence vd., 1992; Dattani ve Preece 2004; Ayyar, 2011; Polgreen vd., 2014). Ayrıca literatürde, büyüme hormonunun sinir hücreleri koruyucusu olarak etki gösterdiği ve bu sebeple ALS hastalığı tedavisinde kullanılabileceğine dair araştırmalar bildirilmiştir (Jin-Young Chung

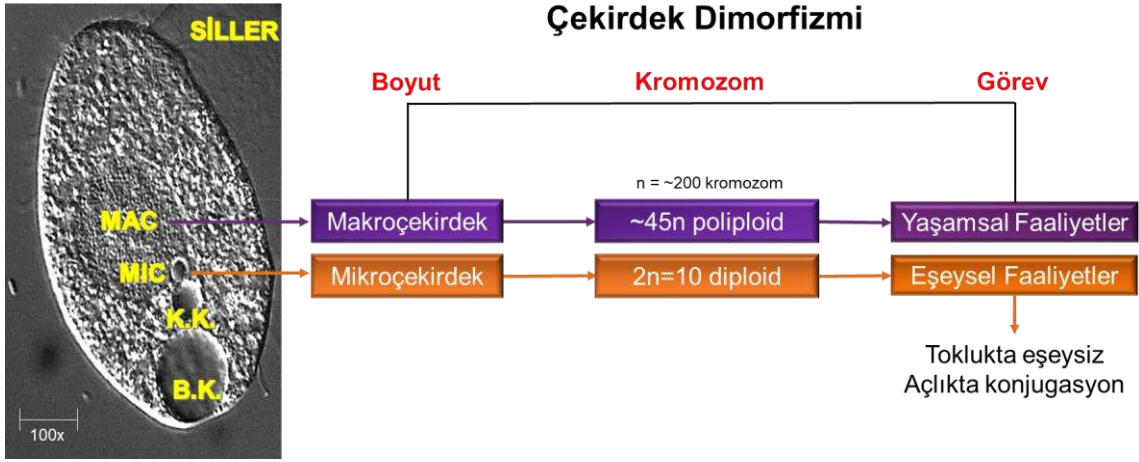
vd.,2015). Dünya çapında “rekombinant insan büyüme hormonu üretimi” en fazla *E. coli*’de ve memeli hücre hatlarında, sonrasında ise maya hücrelerinde yapılmaktadır. FDA onaylı hGH ilaçlarının çoğunluğu *E. coli* kaynaklıdır (Genotropin, Humatrope, Omnitrope). *Mus musculus* meme bezi C127 hücre hattından üretilen hGH kaynaklı ilaçlar (Serostim, Zorbtive) spesifik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. *Saccharomyces cerevisiae* kaynaklı hGH ilacı olan Valtropin ise pazardan detayı açıklanmayan bir kurumsal gerekçe ile geri çekilmiştir (EK-2). Bunların dışında birçok farklı organizmada rekombinant insan büyüme hormonu üretimleri gerçekleştirilmiştir ancak ilaç olarak pazara sunulmamıştır. Ülkemizde ise tüm büyüme hormonu ilaçları ithal olarak elde edilmektedir. Literatürde protein üretim konakçılarında hGH üretim miktarlarına bakıldığında; biyoreaktör ile *E. coli* sitoplazmasında üretim en fazla 628,8 mg/L aktif hGH seviyesindeyken flask kültürde yaklaşık 18 kat düşerek 34 mg/L seviyesinde gerçekleşmektedir. Biyoreaktör sisteminde; hGH üretimi sitoplazmik üretim yerine *E. coli* periplasmik boşluğa yönlendirildiğinde, yaklaşık 3,5 kat düşüş olmakla birlikte 177 mg/L saf hGH elde edilebilmektedir. Bir diğer üretim konakçısı olan *Saccharomyces cerevisiae* maya hücresinin dış ortamından ancak 65 mg/L saf hGH eldesi sağlanmış olup, *E. coli* periplasmik boşluktan elde edilen protein miktarına göre bu miktar 2,5 kat daha azdır (Tablo 1.1). Bu değerlendirmeye göre sitoplazmik üretim, miktarsal olarak dış ortam üretimine göre çok daha verimlidir fakat ökaryotik organizmaların dış ortamda üretim verimliliği, bakteriyel sistemlere göre daha da düşmektedir.

Tablo 1.1. hGH üretimi gerçekleştirilen organizmalar ve üretim miktarları

Organizma (Referans)	Kültürizasyon ve İndükleme	Üretilen Protein	Üretilen Protein Ortamı	Toplam hGH Miktarı	Saf hGH Miktarı	hGH Saflığı
<i>E. coli</i> K-12 W3310 (Song vd., 2017)	Bioreaktör, 20 L Fed-batch	hGH	Sitoplazmik	678 mg/L, DO (%20-30)	623,8 mg/L aktif	% 92
				584 mg/L, DO (%0-10)	157.7 mg/L aktif	% 27
<i>E. coli</i> RV308ai (Levanski vd., 2014)	Bioreaktör, 1 L Fed-batch	Thioredoxin-6xHis-EK-hGH	Sitoplazmik	1045.5 mg/L (651 mg/L, %100)	511,2 mg/L aktif	>%99
<i>E. coli</i> BI21 (DE3) (Kim vd., 2013)	250 ml Flask kültürü	hGH	Sitoplazmik	83,6 mg/L	34 mg/L	% 98.7
		6xHis-hGH		92,8 mg/L	40 mg/L	%97.6
<i>E.coli</i> K12, RRI (Oliverira vd., 1999)	Bioreaktör, 20L Fed-Batch,	hGH	Periplasmik sıvı	412 mg/L	177 mg/L	-
<i>Pichia pastoris</i> (Çalik vd., 2008)	50 ml Flask kültürü	6xHis-FactorXa-hGH	Dış Ortam	115 mg/L	65 mg/L	% 88

İnsan büyüme hormonu gibi diğer rekombinant insan proteinlerinin üretim ve saflaştırma aşamalarında, proteinlerin *E. coli* periplasmik membranına yönlendirilmesinden dolayı üretim veriminin düşmesi ve saflaştırmada peripheral membran proteinlerinin kalıntılarının bulunması, maya konakçılarında ise çok sayıda glikozilasyon çatalının oluşması ile immünolojik problemlerin ortaya çıkması, alternatif üretim konakçılarında olan gereksinimi ortaya çıkarmıştır (Singh vd., 2012). Bu nedenle tez çalışmada, alternatif bir üretim konakçısı olan *Tetrahymena thermophila*'da rekombinant insan büyüme hormonu çalışmalarının yapılmasına karar verilmiştir.

Taksonomik olarak Alveolata süperfilumu, Ciliophora filumu ve Oligohymenophorea sınıfının üyesi olan *Tetrahymena thermophila*, doğal ortamında tatlı sularda serbest yaşayan, 30-50 µm boyutlarında, silleriyle hareketini ve besin alımını sağlayan tek hücreli bir türdür. Biyoreaktörde (~1,5 saat bölünme süresi) ve flaskta (~3 saat bölünme süresi) kolay kültüre edilebilme, geniş sıcaklık aralarında yaşayabilme (18-41°C) ve insan patojenitesi içermemesi gibi özellikleri laboratuvar model organizması olarak kullanımını yaygınlaştırmıştır. Genom yapısı birçok türden farklı olarak mikroçekirdek ve makroçekirdek şeklinde nükleer dimorfizm (aynı sitoplazmada bulunan çekirdeklerin yapı-görev farklılaşması) göstermektedir. Eşeyssel aktivitelere sorumlu olarak 2n=10 kromozom içeren mikroçekirdeğin DNA genetik materyali, yaklaşık 200 Mb toplam büyüklüklüktedir. İkinci çekirdek olan makroçekirdek ya PİKa daha büyük olup somatik metabolizmaların kontrolünden sorumludur. Makroçekirdekte her minikromozomdan 45 kopya bulunmaktadır, yani 45n poliploid yapıda olup n= 200 minikromozom içermektedir. Makroçekirdeğin genetik DNA materyalinin toplam büyüklüğü yaklaşık 105 Mb olup mikroçekirdeğin toplam büyüklüğünün yarısı kadardır (Şekil 1.4., Ruehle vd., 2016). Makroçekirdek ayrıca 45 kopyalı somatik minikromozomların dışında ribozomal genleri kodlayan, organizmada yaklaşık 9000 kopya olarak bulunan 21 kb büyüklüğünde bir minikromozom grubu daha içermektedir. Bu organizmada, makroçekirdek (Eisen vd. 2006) ve mikroçekirdek (Hamilton vd. 2016) genom analizleri tamamlanmış olup Tetrahymena Genom Database (TGD) ve NCBI üzerinden tüm biyoinformatik verilere ulaşılabilir.



Şekil 1.4. *Tetrahymena thermophila* mikroskopik görüntüsü ve çekirdek dimorfizmi. 1000x büyütmede bir *T. thermophila* hücresi görülmektedir, yüzeyinde silleri bulunan bu organizmanın sitoplazmasında kontraktıl koful (K.K.) ve besin kofulu (B.K.) görülmektedir. Ayrıca sitoplazmada büyük bir alanı kaplayan makroçekirdek (MAC) ve çok daha küçük olan mikroçekirdek (MIC) bulunmaktadır. Bu iki çekirdek; boyut, kromozom yapısı ve görevleri bakımından farklılaşarak organizmada çekirdek dimorfizmi gösterirler. Makroçekirdek, büyük boyutta, 45n poliploid ve organizmanın yaşamsal faaliyetlerinden sorumludur. Mikroçekirdek ise küçük boyutta, 2n=10 kromozoma sahiptir ve organizmada eşeyssel faaliyetlerden sorumludur, bu faaliyetler ise toklukta eşeysiz bölünme ve açlık durumunda ise iki hücrenin ağız ağıza birleşmesiyle genetik materyalin değiştirildiği konjugasyondur (Ruehle vd., 2016).

Günümüzde *T. thermophila*'nın alternatif protein konakçısı olarak kullanımının temelini, vektörler, gen kasetleri, dışarı salgılatma dizileri ile promotorların geliştirildiği ve çeşitli proteinlerin rekombinant olarak üretildiği araştırmalar, oluşturmaktadır. Bu organizmada heterolog protein üretiminin ilklerinden olan *I. multifiliis* yüzey i-antijen proteininin aşı antijeni olarak üretilmesi örnek olarak verilebilir (Gaertig vd. 1999). *P. falciparum* GPI-çapalı CS proteinin üretiminde ise ilk defa heterolog bir proteinin endoplazmik retikulum sinyal peptid dizisinin *T. thermophila* tarafından tanınarak işlenebildiği gösterildiği ve antijen üretimi için organizmanın uygun olduğunu bildiren bir çalışmadır (Peterson vd., 2002). İlk aktif rekombinant insan proteini olarak insan DNaz I proteini üretilmiştir (Weide vd., 2006). Bu çalışmada E.R.'ye yönlendiren *T. thermophila* fosfolipaz A1 proteinin PLA36, PLA110 ve PLA115 sinyal peptid dizileri ile DNaz I proteini hücre dışına salgılatılmış ve doğru disülfid bağları da bu organizma tarafından oluşturulmuştur. İnsana benzer N-glikozilasyon profilinin bu organizma tarafından eklenebildiği yine bu çalışma ile gösterilmiştir. Aldag ve ark.'nın (2011) bildirdiği bir çalışmada ise *T. thermophila*'nın insan alkalın fosfataz proteinin E.R. sinyal dizisini tanıyarak, E.R.'a yönlendirme yapabildiği ve hücre dışına insan alkalın fosfataz enzimi salgılayarak üretebildiği gösterilmiştir (Aldag vd., 2011). Malaria parazitiine karşı

elde edilmesi hedeflenen bir aşı için, bu organizmada ilgili antijen proteini doğru katlanma ve disülfid bağları ile üretilerek hücre dışına salgılandığı bildirilmiştir (Cowan vd., 2014). Anti-kanser monoklonal antikoru (Rituximab ilacı) üretiminde *T. thermophila*'nın farklı yapılarda N-glikozilasyon motifleri oluşturabildiği belirlenmiş olup, oldukça kompleks dördüncül yapı içeren monoklonal antikor üretiminde de bu organizmanın kullanılabilineceği raporlanmıştır (Callow vd., 2016). Tüm bu araştırmaları özetleyecek olursak, *T. thermophila* diğer ökaryotik hücreler gibi post-translasyon modifikasyonları (glikozilasyon, disülfid bağlarının oluşumu, protelolitik kesim) yapabilmektedir. Ayrıca genom (Eisen vd. 2006; Hamilton vd. 2016), transkriptom (Xiong vd., 2012), proteom (Jacobs vd., 2006; Xanthopoulou vd., 2010; Saettone vd., 2019) ve sekretom (Madinger, vd., 2010) analizlerinin tamamlanmış olması, “***T. thermophila* endüstriyel rekombinant protein üretim platformlarının geliştirilmesinde**” biyoinformatik kolaylık sağlayacaktır. Bu organizmada yapılan flask ve biyoreaktör çalışmalarında protein üretimi; 0,1 mg/L ve 20 mg/L arasında gerçekleşmektedir (Tablo 1.2). Gelecekte ise *T. thermophila*'nın platform kapsamında protein üretimine daha uygun mutantlarının geliştirilmesi ile üretilen protein miktarlarının artırılması hedeflenmektedir. Genelleyecek olursak, bu organizma, literatürde var olan *E. coli*, *P. pastoris* ve memeli hücre kültürü gibi sistemlere alternatif bir seçenek olarak ortaya çıkmaktadır.

Tablo 1.2. *T. thermophila*'da heterolog protein üretim koşulları ve miktarları

Üretilen Protein	Besi Ortamı	Protein Mik.	Referans
I. multifiliis yüzey i-antijen	Flask	50 pg/mg	Gaertig vd. 1999
<i>P. falciparum</i> GPI-çapalı CS	Flask	0.3 mg/L	Peterson vd. 2002
İnsan DNase I	Karıştırmalı Biyoreaktör	0.1 mg/L	Weide vd. 2006
İnsan Alkalın Fosfataz	Karıştırmalı Biyoreaktör	14000 U/L	Aldag vd. 2011
Malaria MSP-1 antijeni	Karıştırmalı Biyoreaktör	0.5 mg	Cowan vd. 2014
Anti-kanser monoklonal antikoru (Rituximab ilacı)	Karıştırmalı Biyoreaktör	20 mg/L	Callow vd. 2016

T. thermophila'da ilk büyüme hormonu üretim denemesi yine Doç Dr. Muhittin Arslanyolu ve araştırma ekibinin 1502F092 no'lu Anadolu Üniversitesi Genel BAP Proje kapsamında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada iki farklı genom aktarım yöntemi kullanılmıştır. İlk denenen yöntem; ısı şoku ile indüklenebilen HSP70 promotoruna sahip bir kodon uyumlu hGH gen kasetinin makroçekirdek MTT1 lokusuna genom entegrasyon

ile yerleştirilmesiyle, 45 kopyalı bir sistem ile gerçekleştirilmiştir. İkinci denenen yöntem ise *T. thermophila* makroçekirdek genomunda ekstrakromozomal olarak 8000 kopyaya kadar çıkabilen pVGF vektöründe, MTT1 promotor kontrolünde hGH gen kaseti oluşturulması ile gerçekleştirilmiştir. Protein düzeyindeki gerçekleştirilen analiz verilerine göre, pVGF-PLA-hGH vektör sistemiyle, hücre içi ve hücre dışı hGH üretiminin 22 kDa monomer, 34 kDa dimer ve 44 kDa dimer olarak üretilebileceği raporlanmıştır. Yüksek Biyoteknolog Serkan Dereli'nin gerçekleştirdiği pVGF-PLA-hGH vektör çalışmaları Mehmet ÇALISEKİ tarafından devam ettirilmiş ve Western Blot yöntemiyle net bir şekilde işlenmiş 22 kDa ve işlenmemiş 24 kDa monomerlerin hücre içi çözünür proteinlerde bulunduğu fakat hücre dışı 6. saat, 12. saat ve 24. saat örneklerinde bulunmadığı tespit edilmiştir (EK-3). Bu çalışma bulguları *T. thermophila*'da rekombinant insan büyüme hormonu üretilebileceği öngörüsünü desteklemiştir. Ancak, konjugatif transformasyon ile kullanılan dairesel pVGF vektörünün makroçekirdek gelişimi esnasında doğrusal forma dönüştürüldüğü, zamana (2 aya kadar) bağlı olarak vektörün makroçekirdek içerisinde kopya sayısının düşmesi ile protein ekspresyon veriminin de düştüğü belirlenmiştir. Bu doğrultuda, makroçekirdek genomu içerisinde muhafazası uzun süre sağlanabilen, etkili bir ekspresyon vektörü ihtiyacı ortaya çıkmıştır. Tez çalışmasında bu nedenle kullanılması amaçlanan vektör sistemi, TtAC2 kısaltmalı *Tetrahymena thermophila* yapay kromozomu 2'dir. TtAC2 vektörü, ilk versiyon olan TtAC1'in problemlerinden biyomimikri (biyotaklit) kullanılmasıyla arındırılmış ve ileri seviyede geliştirilmiş bir formudur (Arslanyolu, M. ve Üstüntanır, A. F., Türk Patent ve Marka Kurumu Başvuru No: 2018/13880). *Tetrahymena thermophila* yapay kromozomu 2 olarak adlandırılan vektör, transforme edilmesi ve seleksiyonu sonrasında paromomisin baskılı ve baskısız *T. thermophila* makroçekirdeğinde 24 aya kadar muhafaza edilebilmektedir (Arslanyolu, M., Üstüntanır, A. F., ve Çalıseki, M., 2019. Türk Patent ve Marka Kurumu Başvuru No: 2019/04291). TtAC2'nin makroçekirdek içerisinde uzun süreli muhafazası ve protein ekspresyonunda kullanılabilirliği, ana vektör sistemi olarak bu tez çalışmasında kullanılmasının gerekçesini oluşturmaktadır.

T. thermophila hücrelerinde rekombinant olarak üretilbildiği kısmen tespit edilen insan büyüme hormonunun, makroçekirdekte muhafaza edilen TtAC2 vektör sistemiyle, İİU uyumlu bir promotor kullanılarak hem sitoplazmik hem de hücre dışına PLA22/23 sinyal peptidleri aracılığıyla salgılatılarak üretilbileceği, bu tezin hipotezini oluşturmaktadır. Ülkemize ithal edilen hGH'ın *T. thermophila*'da üretilbilmesi ile yerli insan büyüme hormonu ilaç üretiminin altyapısının geliştirilmesi ise çalışmanın amacını oluşturmaktadır.



2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Irklar ve Kültürizasyon Yöntemleri

T. thermophila'da rekombinant insan büyüme hormonu üretilmesi aşamasında vektör sistemi olarak TtAC2 vektörünün kullanılması sebebiyle vejetatif transformasyona ve protein ekspresyonuna uygun *T. thermophila* CU428 ırkı Cornell Üniversitesi Tetrahymena Stok merkezinden temin edilmiştir (EK-4). Tetrahymena hücre kültürizasyonu için penisilin/streptomisin ve amfoterisin B eklemesi yapılan NEFF ve SPP besiyerleri kullanılmıştır. Flask veya petri kültüründe hücre yoğunlukları göz önünde bulundurularak yaklaşık 24-48 saat süre aralığında logaritmik faza ulaşıncaya kadar 30°C sıcaklıkta inkübasyonları gerçekleştirilmiştir. Uzun süreli hücre kültürü saklamak amacıyla oda sıcaklığında cam tüpte kültürizasyon sağlanmıştır ve belirli aralıklarla pasajlar yapılmıştır (EK-5).

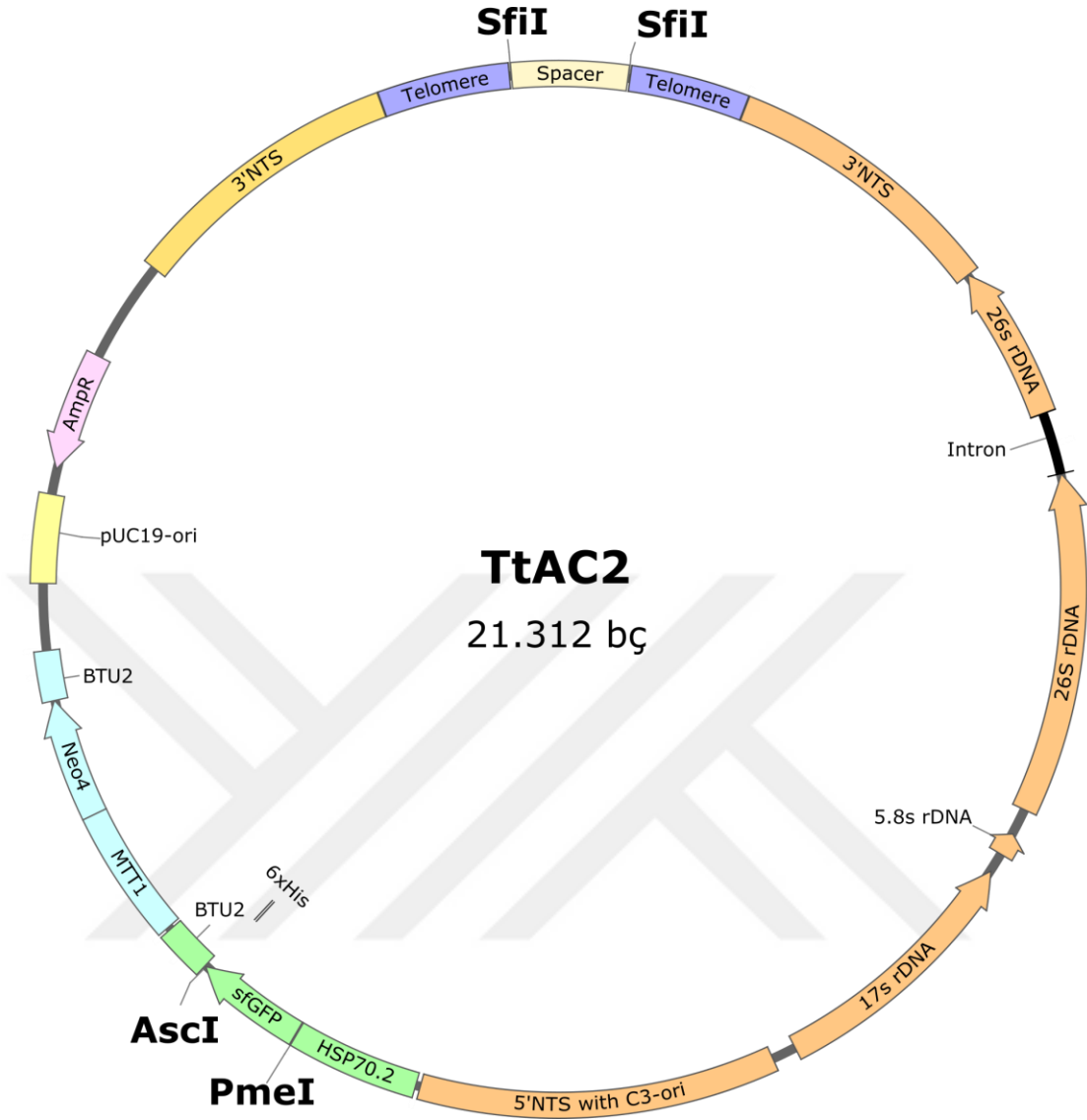
İnsan büyüme hormonu gen kasetlerinin TtAC2 vektörüne rekombinant DNA teknolojisi teknikleriyle klonlanmasından sonra transformant vektörün çoğaltılması amacıyla *E. coli* DH5 α kompetent ırkı kullanılmıştır (EK-6). Bakteriyel transformasyon 42°C'de ısı şoku yöntemi ile gerçekleştirilmiş olup 1X Amfisilinli LB Agar içeren Petri tabaklarında 37 °C sıcaklıkta 16 saat boyunca inkübasyon uygulanmıştır. Pozitif transformantlar seçilerek 1X Amfisilinli LB Broth besiyerinde çalkalamalı olarak 37°C sıcaklıkta 16 saat boyunca büyütülmüşlerdir (EK-7).

2.2. İnsan Büyüme Hormonu Üretimi İçin Kullanılan Vektör Sistemi

T. thermophila'da protein ekspresyon vektörleri temel olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. İlki, homolog rekombinasyon için kullanılan genom entegrasyon vektörleridir. *T. thermophila* genomunda esansiyel olmayan bir genin (literatürde MTT1 ve BTU2 genleri), genom entegrasyon vektörüne yerleştirilen rekombinant gen ve 5' UTR ve 3' UTR homoloji kolları ile homolog rekombinasyonu gerçekleştirilir ve genellikle 45 kopyalı mikroçekirdek hedef alınır (Shang vd. 2002; Iwamoto vd., 2014). İkinci olarak, ekstrakromozomal vektörler bulunmaktadır ve bu vektörler organizmanın kromozom yapısına katılmayarak serbest olarak makroçekirdekte bulunurlar. Bu tip vektörlerde iki gruba ayrılmaktadırlar. Yalnızca hücrelerin konjugasyon safhasında transforme edilen vektörlere konjugatif ekstrakromozal vektörler adı verilir ve ekibimizde pVGF vektörü bu şekilde kullanılmaktadır (Yılmaz ve Arslanyolu, 2015). Ancak bu vektör paramomisin

baskısında dahi hücre makroçekirdeğinde 2 ay içerisinde kopya sayısını kaybetmektedir ve kadmiyum ile indüklenebilen MTT1 promoturuna sahip olduğundan endüstriyel üretimlerde ağır metal kontaminasyonuna sebep olduğundan İİU uyumlu olarak görülmemektedir.

Bir diğer ekstrakromozomal vektör olan patent başvurusu yapılmış ve başarılı bir şekilde hem stabilizasyonu hem de protein ekspresyonu gösterilmiş *T. thermophila* yapay kromozomu 2 (TtAC2), Tetrahymena hücrelerine hem vejetatif hem de konjugatif olarak transforme edilmektedir (Türk Patent ve Marka Kurumu Başvuru No: 2019/04291). Yapısında telomer bulunmasından ve telomer uçlarının restriksiyon enzimleriyle serbest bırakılmasından dolayı hem dairesel hem de doğrusal formda bir mekik vektör şeklinde kullanılabilir. Ekstrakromozomal yapay kromozom vektörü olarak sınıflandırdığımız bu vektör, hücre genomunda paramomisin baskısında ve baskısında olmadan 24 ay ve daha fazla sürede muhafaza edilmiştir. Ayrıca marker protein olan GFP proteinin üretimi de sağlanarak vektörün ekspresyon kabiliyeti gösterilmiştir. Temel olarak TtAC2, *T. thermophila* genomunda yaklaşık 9000 kopya sayısında bulunan makronükleer minikromozomların (21 kb) biyotaklit edilmesiyle tasarlanmıştır. Doğal kromozomun boyutu gibi yaklaşık 21 kb büyüklüğünde olan TtAC2'nin doğrusal formunda bir kolunda Tetrahymena C3 orijini, rDNA genleri, 3'NTS dizisi ve telomer bulunurken, diğer kolunda ise HSP70.2 promotörüne sahip GFP geni, MTT1 promotörüne sahip Neo4 geni, pUC19 iskeleti ile amfisilin direnç geni, 3'NTS ve telomer bulunmaktadır. Bu vektörde, hedef rekombinant genler PmeI-AscI enzimleri kullanılarak sfGFP geninin çıkarılmasıyla eklenebilmektedir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. TtAC2 dairesel vektörü yapısı. PmeI ve AscI restriksiyon enzimleri ile sfGFP geni çıkarılarak hedef gen klonlanabilir (Arslanyolu, M., Üstüntanır, A. F., ve Çalıseki, M., 2019. Türk Patent ve Marka Kurumu Başvuru No: 2019/04291).

2.3. İnsan Büyüme Hormonunun Gen Dizisinin Hazırlanması ve Vektörlerin Oluşturulması

T. thermophila'da, insan büyüme hormonu geninin (Erişim numarası: CAA23779.1, Uniprot: P01241) doğru ve kesintisiz bir şekilde eksprese edilmesi için öncelikle *T. thermophila* kodon sözlüğüne göre insan büyüme hormonu geninde kodon değişiklikleri yapılmıştır (Salim vd., 2008). Ekibimizin önceki çalışmasında kodon optimizasyonu değişiklikleri yapılarak insan büyüme hormonu geni sentetik olarak bir Çin firmasına ürettirilmiştir ve sentetik genin kontrolleri yapılmıştır (EK-8). Kodon

optimize sentetik hGH geninde bulunan hGH E.R. sinyali bu tez çalışmasında kullanılmamıştır. Sadece sitoplazmik protein kodlayan gen bölgesi üzerinden tasarımlar gerçekleştirilmiştir.

hGH içeren **ilk** gen dizisi tasarımı, hGH protein üretimi için ön verilerin hızlıca elde edilmesi, mikroskopik incelemelerde ve SDS-PAGE analizlerinde kolaylık sağlanması amacıyla 6xHis-GFP-EK.-hGH füzyonu şeklinde gerçekleştirilmiştir. GFP füzyonu olması sebebiyle analizlerde sitoplazmik füzyon proteinin yeşil ışığa vermesi beklenmiştir ve ayrıca enterokinaz enzimi kesimi ile hGH'ın takısız olarak saflaştırılabilmesi öngörülmüştür. Bu gen dizisi sırasıyla 5' PmeI kesim bölgesi, 6x histidin takısı, GFP (yeşil floresan proteini), enterokinaz enzimi kesim bölgesi (EK.) ve hGH AscI kesim bölgesi 3' olarak spesifik primerler ile PZR ve örtüşen PZR yöntemleriyle oluşturulmuştur. TtAC2 vektörü ve üretilen gen dizisi PmeI-AscI çiftli kesim reaksiyonuna alınmıştır ve ligasyon sonrasında pozitif transformantlardan pTtAC2-6xHis-GFP-Ent-hGH vektörü elde edilmiştir (EK-6, EK-9).

İkinci tasarımda, hGH proteininin N terminaline 6x Histidin takısı eklenmiştir ve böylelikle gen dizisi 5' PmeI, 6xHis, hGH, AscI 3' olarak tasarlanmıştır. **Üçüncü** tasarımda, *T. thermophila* hücrelerinde sitoplazmik takısız büyüme hormonunun üretimi amaçlanmıştır. Gen dizisi sırasıyla 5' PmeI, hGH, AscI 3' olarak tasarlanmıştır. (EK-6, EK-10).

Dördüncü ve beşinci tasarımlarda, hGH proteininin dışarı salgılatılması amaçlanmıştır. Böylelikle hücre sitoplazmasından daha az protein bulunan dış ortamdan etkili ve oldukça saf bir şekilde hGH saflaştırılması ayrıca proteinin düzgün katlanması ve disülfid bağlarının oluşturulabilmesi hedeflenmiştir. Bu sebeple literatürde daha önce başarılı bir şekilde salgılatma sinyal peptid dizisinin işlendiği belirtilen Fosfolipaz A1 (PLA1) proteinin sinyal dizisi kullanılmıştır (Weide vd., 2006). Literatürde 36 aminoasitlik (**PLA36**) protein kodlayan PLA gen dizisi kullanmıştır ancak biyoinformatik Signal IP-5.0 sinyal kesim tahmin programına göre 22-23. aminoasit arasında sinyal kesimi görülmüştür ve kesim sonrası kalan 14 baz ek peptid olarak üretilen hedef proteinde takı olarak kalmaktadır. İİU uyumlu olacak şekilde tasarım gerçekleştirilmek istenildiğinden, kalıntısız bir sinyal kesimi olması amacıyla 22 aminoasit PLA sinyal peptidi kodlayan gen dizisinin (**PLA22**) kullanılmasına karar verilmiştir. **Dördüncü tasarımda** 6xHis takılı hGH üretimi planlandığı için 23 aminoasit sinyal dizisi kodlayan PLA gen dizisi (**PLA23**) kullanılmıştır ve 5' PmeI, 23 a.a. kodlayan PLA sinyal dizisi,

6xHis, hGH, AscI 3' olarak, **beşinci tasarımı**da ise takısız PLA22'li hGH gen dizisi 5' PmeI, 22 a.a. kodlayan PLA sinyal dizisi, hGH, AscI 3' olarak spesifik primerler kullanılarak PZR yöntemi ile elde edilmiştir (EK-6, EK-11).

Hem TtAC2 vektörü hem de takılı ve takısız hGH gen dizileri Pme-AscI enzimleri ile kesilerek yapışkan uçlu hale getirilmişlerdir. Ligasyon işlemi sonrasında ısı şoku ile bakteriyel transformasyon gerçekleştirilmiş olup pozitif kolonilerden plasmid izolasyonu ile rekombinant TtAC2 vektörleri elde edilmiştir. Tasarımlardaki hGH gen dizilerini içeren TtAC2 vektörlerinin restriksiyon enzimleri ile analizleri yapılmıştır. Ayrıca Sanger DNA dizi analizi ile de klonlanan gen dizilerinin doğrulukları teyit edilmiştir (EK-6, EK-12). Hazırlanan vektörleri içeren *E. coli* stokları -86 °C'de saklanmıştır (EK-26).

2.4. Rekombinant Vektörlerin *T. thermophila* Hücrelerine Transformasyonu ve Pozitif Transformantların Seçilimi ile Tek Klon Eldesi

Beş farklı tasarım olarak hazırlanan insan büyüme hormonu içeren TtAC2 vektörlerinin dairesel formda *T. thermophila* hücrelerine transformasyonu hedeflenmiştir. Temel olarak, hazırlanan 2 µg vektör, on milyon vejetatif CU428 hücresine biyolistik silah kullanılarak transforme edilmiştir (Cassidy-Hanley vd., 1997). Bulk kültürü olarak elde edilen transformantların seleksiyon işlemi, zamana bağlı olarak paramomisin miktarı artırılırken eklenen kadmiyum klorür miktarı azaltılmıştır. Böylelikle pozitif transformantlarda, vektörün yüksek kopya sayısına ulaşması hedeflenmiştir (Zhang vd., 2017, EK-14). Seleksiyon 15. günde tamamlanmış olup aylık olarak tüp pasajlamalarında hücre kültürüne 100 µg paramomisin ve 0.00375 µg CdCl₂ eklemesi yapılmıştır.

Tablo 2.3. Seleksiyonda zamana bağlı olarak paramomisin ve CdCl₂ kullanım miktarları.

Gün	Paramomisin konsantrasyonu (µg)	CdCl ₂ konsantrasyonu (µg)
0.	100	0.5
2.	300	0.5
4.	600	0.25
6.	1000	0.125
8.	2000	0.0075
11.	3000	0.00375

Bulk kültürler, birçok farklı varyasyonda transformant içerdiğinden genom ve protein analizlerinde net sonuçlar vermemektedir. Bu sebeple, seleksiyon sonrasında vektör kopya sayısı en çok olduğu düşünülen veya protein ekspresyonu en fazla olduğu görülebilen tek klonların seçimi amaçlanmıştır. Tek klon seçilirken, seri dilüsyon yöntemi ile hücre konsantrasyonları oldukça azaltılır ve hassas cam pipetler ile dikkatlice sadece tek bir Tetrahymena hücresi alınarak 96 kuyulu tabaklara aktarılırlar. Bu işlem mümkün olduğunca fazla tek klon seçilmesi ile gerçekleştirilir. 96 kuyulu tabaklarda hücre büyüme hızlarına bakılır ve daha önce yoğun konsantrasyona ulaşan tek klon kültürü cam tüplere alınarak ve sıvı azot stoğuna alınarak stoklanır. Bu yöntem, GFP-hGH füzyon proteini için farklı şekilde yapılmıştır, mikroskopik analizlerde en fazla GFP ışması görülen hücreler tek hücre klonu şeklinde seçilmiştir ve kalan işlemler aynı şekilde devam ettirilmiştir.

GFP-hGH füzyonu içermeyen pozitif transformantlarda 12'şer adet tek klon seçimi yapılmıştır ve bunlardan 6'şar tek hücre klonu seçilerek protein analizlerine alınmıştır ve bu analiz sonuçlarına göre en verimli tek hücre klon kültürü seçilmeye çalışılmıştır.

2.5. Transformant Hücrelerin Makroçekirdeğinde hGH Gen Dizilerinin Varlık Analizi

Takılı ve takısız hGH gen dizileri içeren TtAC2 vektörünün transforme edildiği ve seleksiyonu sonrası elde edilen pozitif transformantların genomik DNA analizleri yapılarak hGH gen dizilerinin makroçekirdek içerisinde varlıkları PZR ile tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda pozitif transformantların tüp stoklarından 250 µl hücre kültürü alınarak paramomisin, kadmiyum, pen/strep ve amfoterisin içeren 20 ml NEFF besiyerine aktarılmıştır ve 30 °C'de iki gün boyunca inkübe edilmiştir. Santrifuj ile besiyerinin uzaklaştırılması ve Tris-HCL (pH 7.5) hücrelerin yıkanması sonrası hücre pelleti elde edilmiştir. Genomik DNA izolasyon kiti (Wizard A1120 kit, Promega) kullanılarak hücre pelletlerinden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen genomik DNA'lar kaynak olarak kullanılarak hGH gen dizilerinin dış primerleri ile PZR kurulmuştur ve sonuçlar analiz edilmiştir (EK-15).

2.6. Transformant Hücrelerin İndüklenme Aşamaları

Tez çalışmasında kullanılan TtAC2 vektörü HSP70.2 promotoruna sahip olması sebebiyle tüm hücre indüklenme aşamaları ısı şoku yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. 30 °C’de logaritmik faza kadar (yaklaşık 2 gün) kültüre edilen pozitif transformant hücrelerden 1100xg’de santrifujleme ile hücre pelleti elde edilmiştir. Üzerine daha öncesinde 38 °C’de ısıtılmış NEFF besiyeri (alternatif olarak açlık tamponu, Tris-HCL pH: 7.8) eklenerek indüklenme başlatılmıştır. Sonrasında ise 3, 6 veya deney grubuna göre farklı saatlerde 38 °C su banyosunda indüklenme devam ettirilmiştir. Dış ortama salgılatılması için PLA sinyal dizisi içeren vektöre sahip pozitif transformantlarda indüklenme sonrasında veya aralarında hücrelerin E.R. mekanizmasının sıkışmaması için 30 °C’de 3 veya 6 saatlik toparlanma/iyileşme işlemi gerçekleştirilmiştir. Negatif kontrol olarak, CU428 ırkı hücreleri için deney grupları ile aynı şartlarda ısı şoku işlemleri uygulanmıştır. Ayrıca deney gruplarının indüklenmemiş hücreleri de analizlerde kullanılmıştır (EK-16).

2.7. Pozitif Tek Hücre Klonu Transformantlarında Protein Analizleri

Rekombinant takılı ve takısız hGH gen dizilerini içeren TtAC2 vektörlerinin transformasyonu sonrası elde edilen tek hücre klonlarından ısı şoku ile indüklemeleri ile hücrelerde hGH üretiminin sınılanması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, indüklenmiş hücrelerden protein izolasyonları yapılarak SDS-PAGE ve Western Blot analizleri gerçekleştirilmiştir. Deney gruplarına ait tek klonlar arasından hGH ekspresyonu açısından en verimli olan klonların seçimi için öncelikle 50 ml kültür hacminde yaklaşık 25 milyon hücreden protein analizi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. En verimli klonların seçilmesiyle indüklenme için 500 ml hücre kültürü hacmi ile çalışılmıştır.

Isı şoku ile indüklenme aşamalarından sonra elde edilen hücre pelletleri lizis tamponu ile kimyasal parçalanmaya ve 0.2 µm çelik bilyeler ile fiziksel parçalamaya maruz bırakılmıştır. Sonrasında santrifüj işlemi ile elde edilen süpernatant toplam çözünür protein olarak elde edilmiştir. Hücre dış ortam çalışmalarında hem konsantre olmayan dış ortam protein örnekleriyle hem de 10 kDa alt sınırı bulunan santrifüj filtreleri (Millipore Amicon Ultra-15, UFC901024) kullanılarak konsantre edilmiş dış ortam protein örnekleriyle çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Deneylerin amacına göre, elde edilen çözünür proteinler ya merkaptotanol içeren 5x SDS-PAGE boyası eklenerek 95°C’de 5 dakika

kaynatılmıştır ya da proteinlerin doğal yapısına müdahale etmemek için (GFP-hGH füzyon proteinlerinde) merkaptotanol içermeyen 5x SDS-PAGE boyası ile kaynatmaksızın muamele gerçekleştirilmiştir (EK-18-21).

Proteinlerin SDS-PAGE analizinde, bisakrilamid oranı ayrıştırma için %12 (v/v), paketleme için %5 (v/v) olan poliakrilamid jeller hazırlanmıştır. Ayrıca %10 oranında akrilamid içeren jel hazırlama solüsyonu kitleri (Biorad TGX Stain-Free Fast Cast Acrylamide Kit 10%, 161-0183) de kullanılmıştır. Coomassie mavisi ile boyama ve Western Blot işlemleri için iki jel hazırlanmıştır. Konsantrasyonları Bradford metodu ile öğrenilen protein örnekleri jel kuyularına eşit miktarda yüklenmiştir. Protein örneklerinin koşturulması paketleme jelinde 60 V, ayrıştırma jelinde ise 80 V olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Coomassie Blue solüsyonu ile 1 saat boyama gerçekleştirildikten sonra jeller distile su ile boyadan arındırılarak Gel Doc™ EZ Gel Documentation System (Biorad, 1708270) ile görüntülenmiştir.

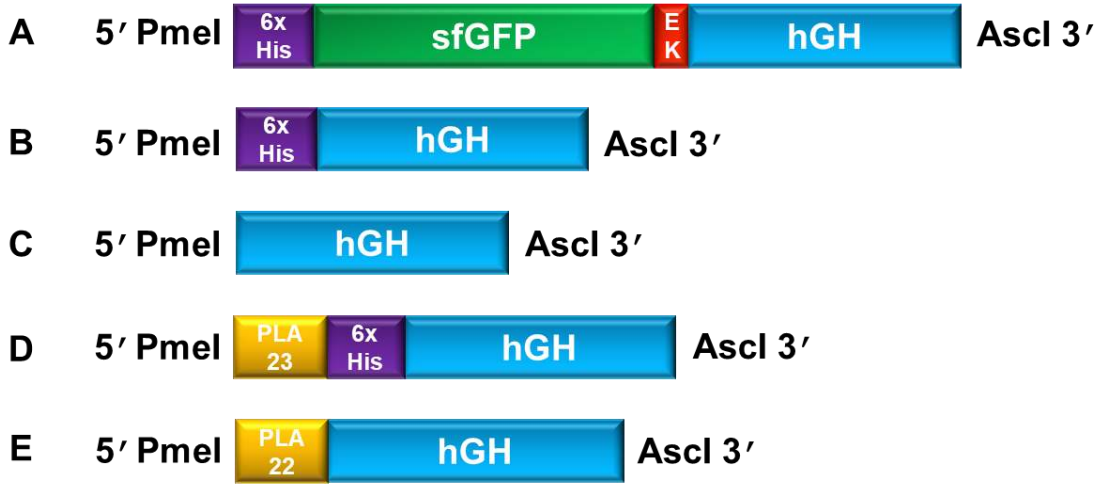
Western Blot analizlerinde blotlama aşaması için protein örneklerinin koşturulduğu jel ve jel boyutlarına göre kesilerek metanol ile aktiveleştirilen PVDF membran (Millipore Immobilon-PSQ 0,2 µm, ISEQ00010) Towbin tamponu ile muamele edilmiştir. Whatman kağıtları ile membran ve jel sandviç şeklinde hazırlanarak ve protein transfer cihazı (Biometra Fastblot B64, 015-600) kullanılarak 25V, 0.1A ayarında 45 dakika boyunca blotlama gerçekleştirilmiştir. Transfer sonrasında membran üzerine %5 (w/v) yağsız süt tozu (CST-Nonfat Dry Milk #9999) ve %0.05 Tween-20 (AppliChem, A4974) içeren TBS-T tamponu eklenerek 1 saat oda sıcaklığında bloklama uygulanmıştır. Birincil antikör muamelesi, 1:200 veya 1:1000 oranında anti-hGH (GH-1/2 Rabbit Poliklonal Antikoru Santa Cruz-36787 kullanılarak gece boyu +4°C’de çalkalamalı olarak gerçekleştirilmiştir. Birincil antikora bağlı olarak ikincil antikör, 1:10.000 oranında Goat Anti-Rabbit HRP Conjugated (Genescript, A00098) oda sıcaklığında 1-2 saat arasında uygulanmıştır. Her ara aşamada membran, TBS-T tamponu ile 3 kez 5’er dakika olacak şekilde yıkanmıştır. Antikör uygulamaları sonunda membranın, 2 kez TBS-T ve ardından 2 kez TBS ile yıkanmasından sonra TMB solüsyonu (ThermoScientific, N301) ile 15 dakika süreyle inkübe edilerek kolorimetrik görüntüsü analiz edilmiştir (EK-22).

3. BULGULAR

3.1. Takılı ve takısız hGH gen dizilerinin TtAC2 Vektörüne Klonlanması

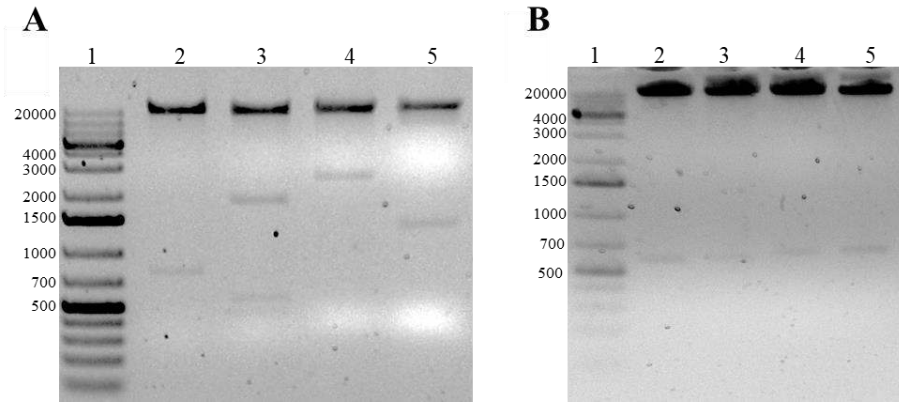
Takılı ve takısız hGH gen dizilerinin üretimi, *T. thermophila* kodon sözlüğüne göre kodon uyumlu hGH genine farklı protein takılarının gen dizileri ve restriksiyon enzimi tanıma dizilerinin eklenmesiyle gerçekleştirilmiştir. İlk olarak **6xHis-sfGFP-EK.-hGH gen dizisi (1342 bç)** tasarımı gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada, FhisGFP ileri (5' PmeI-6xHis) ve RentrGFP (3' EK.) primerleri ile PmeI-6xHis-sfGFP-EK. dizisi (771 bç) ve FenthGH (5' Enterokinaz) ileri ile HGH geri primerleriyle EK.-hGH dizisi-AscI (612 bç) PZR ile üretilmiştir. Bu diziler daha sonra FhisGFP ileri ve HGH (3' AscI) geri primeri kullanılarak EK. bölgelerinden örtüşen PZR yöntemiyle birleştirilerek hedef gen dizisi elde edilmiştir (Şekil 3.1.A.). **İkinci tasarım** olarak 6xHis-hGH (613 bç) gen dizisi; FhisHGH ileri (5' PmeI ve 6xHis) ve hGH geri primerleri kullanılarak PZR ile elde edilmiştir (Şekil 3.1.B). **Üçüncü** olarak takısız hGH gen dizisi (595 bç) üretimi, Fhgtakısız ileri (5' PmeI) ve HGH (3' AscI) geri primerleri kullanılarak PZR ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1.C).

FkoPLA ileri (5' PmeI) ve RkoPLA geri (3' 6xHis) primerleri kullanılarak 23 a.a. PLA sinyal bölgesi kodlayan gen dizisi (120 bç) ve Förthishgh (5' 6xHis) ileri ve RhGH geri (3' AscI) primerleri kullanılarak 6xHis-hGH gen dizisi (602 bç) üretilmiştir. Bu diziler 6xHis bölgelerinde örtüşen PZR ile birleştirilerek PLA23-6xHis-hGH dizisi (679 bç) **dördüncü** tasarım olarak oluşturulmuştur (Şekil 3.1.D) FkoPLA ileri (5' PmeI) ve HGHpla geri (3' 20 bç hGH geni) primerleri kullanılarak 22 a.a. PLA sinyal bölgesi kodlayan gen dizisi (99 bç) ve Fplahgh ileri ve RhGH geri (3' AscI) primerleri kullanılarak ise hGH gen dizisi (584 bç) üretilmiştir. Bu diziler 20 bç'lik hGH dizisi bölgelerinden örtüşen PZR ile birleştirilerek PLA22-hGH dizisi (658 bç) **beşinci** tasarım hazırlanmıştır (Şekil 3.1.E) (EK-10 ve 11).



Şekil 3.1. Takılı ve takısız hGH kodlayıcı gen dizilerinin yapısı. Her gen dizisinde 5' PmeI ve 3'AscI restriksiyon enzimi tanıma bölgesi bulunmaktadır. **A.** 6xHis-sfGFP-Enterokinaz tanıma dizisi-hGH gen dizisi (1342 bç). **B.** 6xHis-hGH gen dizisi (613 bç). **C.** Takısız hGH gen dizisi (595 bç). **D.** PLA23-6xHis-hGH dizisi (679 bç). **E.** PLA22-hGH gen dizisi (658 bç). **EK:** Enterokinaz proteolitik kesim bölgesi dizisi, **6XHis:** Ni-NTA afinitik saflaştırma takısını kodlayıcı dizi, **sfGFP:** Süper katlanan yeşil floresan proteinini kodlayıcı dizi, **PLA22** ve **PLA23:** *Tetrahymena thermophila* Fosfolipaz A1 proteinin ilk 22 ve ilk 23 amino asitini ve E.R.'ye yönlendirici sinyal görevi yapan bölgeyi kodlayan dizi.

PZR ile Şekil 3.1'de genel yapısı verilen tüm hGH gen dizileri ile TtAC2 vektörü, PmeI ve AscI enzimleri kullanılarak çiftli restriksiyon enzimi kesimine alınarak 5' ve 3' uçları yapışkan uca dönüştürülmüştür. Bu protein kodlayıcı gen dizileri ve TtAC2 vektörü ligasyon reaksiyonuna alınmış ve ısı şoku ile *E.coli* DH5alfa kompetent hücrelerine bakteriyel transformasyon gerçekleştirilmiştir. Pozitif kolonilerin seleksiyonu sonrasında takılı ve takısız hGH gen dizilerini içeren TtAC2 vektörleri saflaştırılmış ve vektörlerin hem restriksiyon enzim kesimi hemde dizi analizi ile teyiti gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1) (EK-12).



Şekil 3.2. hGH gen dizileri içeren TtAC2 vektörlerinin restriksiyon enzimleriyle kesim analizi. A. pTtAC2-6xHis-sfGFP-Entr-hGH restriksiyon enzimi kesim analizleri. **1:** Generuler 1kb plus (SM1331), **2:** SfiI kesimi. **3:** XbaI kesimi, **4:** XmaI-SfaAI kesimi, **5:** PmeI-AscI kesimi, **B.** hGH gen tasarımlarını içeren diğer TtAC2 vektörlerinin Pme-AscI restriksiyon enzimi kesim analizi. **1:** Generuler 1kb plus (SM1331), **2:** pTtAC2-hGH, **3:** pTtAC2-6xHis-hGH, **4:** pTtAC2-PLA22-hGH, **5:** pTtAC2-PLA23-6xHis-hGH.

pTtAC2-6xHis-sfGFP-EK.-hGH, farklı restriksiyon enzimleri ile kesilerek hem klonlanan gen dizisinin hem de TtAC2 vektörünün tüm dizi yapısının kontrolünün sağlanması amaçlanmıştır. Biyoinformatik beklentiler doğrultusunda, Şekil 3.2.A'nın ikinci kuyusunda SfiI kesimi ile iki telomer arasında bulunan 794 bp ara dizinin salındığı, üçüncü kuyuda XbaI kesimi ile vektörün 19077 bp, 1848 bp, 534 bp ve 431 bp olarak 4 parçaya bölündüğü, dördüncü kuyuda XmaI-SfaAI çiftli kesimi ile 2528 bp tüm gen kasetinin çıkarıldığı ve beşinci kuyuda PmeI-AscI çiftli kesimi ile de 1342 bp büyüklüğündeki vektöre eklenen 6xHis-sfGFP-EK.-hGH dizisinin salındığı görülmüştür. Böylece yeni tasarlanan bu vektör teyit edilmiştir. Diğer tasarlanan takılı ve takısız hGH gen dizileri içeren vektörlerin kesim kontrolü PmeI-AscI çiftli restriksiyon kesimi ile gerçekleşmiştir. Şekil 3.4.B'nin 2. kuyusunda pTtAC2-hGH vektöründen 595 bp hGH dizisinin, 3. kuyuda pTtAC2-6xHis-hGH vektöründen 613 bp 6xHis-hGH dizisinin, 4. kuyuda pTtAC2-PLA22-hGH vektöründen 658 bp PLA22-hGH dizisinin, 5. kuyuda ise pTtAC2-PLA23-6xHis-hGH vektöründen 679 bp PLA23-6xHis-hGH dizisinin salındığı görülmüş ve vektörlerin restriksiyon kesim analizi ile teyiti sağlanmıştır.

3.2. TtAC2 Vektörünün *T. thermophila* Vejetatif Hücrelerine Transformasyonu

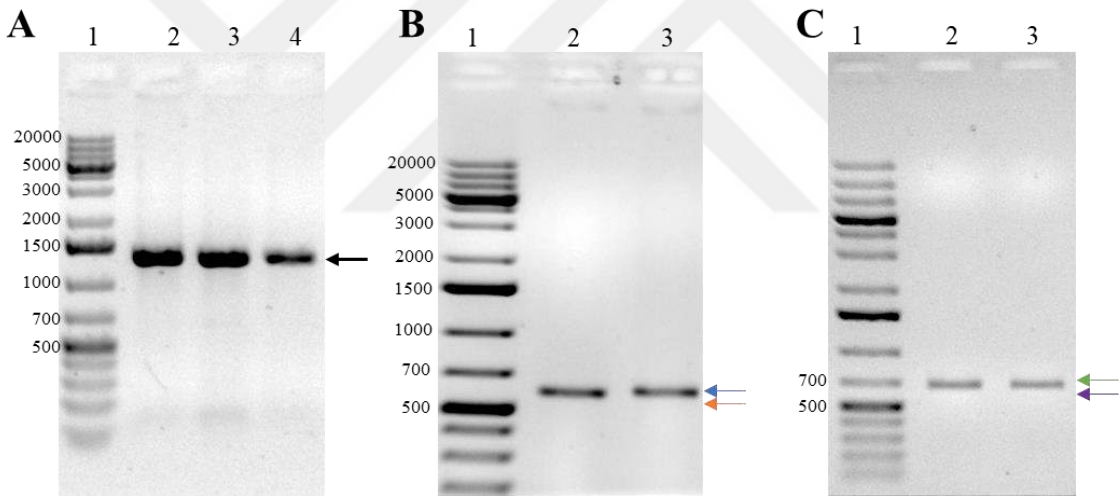
T. thermophila CU428 ırkı hücrelerine biyolistik silah transformasyonu protokolü ile ilk olarak pTtAC2-6xHis sfGFP-Enterokinaz-hGH vektörü transforme edilmiştir (EK-13). Pozitif transformant hücrelerin seleksiyonu kadmiyum klorür indüksiyonu yapılarak vektördeki MTT1 promoturuna sahip Neo4 geninin ekspresyonu ile hücre kültürüne eklenen paramomisin parçalanmasıyla gerçekleşmiştir. Bu aşamada kodon uyumu maksimize edilmiş Neo4 kullanıldığından kadmiyum konsantrasyonu azaltılırken, paramomisin konsantrasyonu artırılmış (Zhang vd., 2017) ve seleksiyon 2 hafta boyunca sürmüştür. Tezin ilerleyen safhalarında tasarlanan pTtAC2-hGH, pTtAC2-6xHis-hGH, pTtAC2-PLA22-hGH ve pTtAC2-PLA23-6xHis-hGH vektörleri de eş zamanlı olarak *T. thermophila* CU428 ırkı hücrelerine transforme edilerek aynı şekilde pozitif transformant seleksiyonu işlemine alınmıştır. Tüm biyolistik silah sonrası kültür işlemleri bulk kültürlerle gerçekleştirilmiştir. Genomik DNA analizleri ve protein analizleri ise bulk kültürlerden tek hücre klonları seçilmesiyle gerçekleştirilmiştir.

pTtAC2-6xHis-sfGFP-EK.-hGH vektörü içeren pozitif transformant bulk kültürü 15 şoku ile indüklenmiş ve indüklemesi sonrası mikroskop altında GFP ışması görülen hücreler, tek tek mikro uçlu pastör pipeti yardımıyla 96 kuyulu plakaların bir kuyusuna aktararak, “**tek hücre klonu**” elde edilmiştir. Aralarında en hızlı bölünme ve büyüme ile düzgün morfoloji gösterenler seçilerek; D1, F1 ve H1 olarak adlandırılmıştır. Bu tek hücre klonları cam tüp stoklarına alınmış ve sıvı azotta dondurma protokolü kullanılarak, sıvı azot tankında uzun vadeli saklamaya alınmıştır (EK-26).

GFP takısı içermeyen diğer hGH gen dizisi tasarımlarında mikroskopik analiz ile tek klon eldesi sağlanamayacağından 12’şer adet rastgele tek hücre seçilerek 96 kuyulu plakalara aktarılmış ve tek hücre klonu eldesi böylece sağlanmıştır. Bu hücreler arasında en hızlı büyüme ve gelişim gösteren 6’şar tek hücre klonu cam tüplere aktarılmış ve protein analizlerine alınmıştır. **pTtAC2-6xHis-hGH** vektörü içeren transformantlardan B11.2, B11.3, B11.5, B11.7, B11.9, B11.12 tek hücre klonları, **pTtAC2-hGH** vektörü içeren transformantlardan A4.1, A4.3, A4.8, A4.9, A4.10, A4.11 tek hücre klonları, **pTtAC2-PLA23-6xHis-hGH** vektörü içeren transformantlardan D5.1, D5.3, D5.4, D5.5, D5.8, D5.10 tek hücre klonları, **pTtAC2-PLA22-hGH** vektörü içeren transformantlardan C6.2, C6.4, C6.8, C6.9, C6.11, C6.12 tek hücre klonları ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Protein analizleri sonucunda ise hGH ekspresyonu için en verimli olan tek hücre klon seçilerek, sıvı azotta dondurulmuş (EK-26) ve çalışmalara bu hatlar ile devam edilmiştir.

3.3. *T. thermophila* Transformant Hücrelerinin Makroçekirdeğinde hGH Gen Dizilerinin PZR ile Tespiti

Takılı ve takısız hGH gen dizilerini içeren pTtAC2 vektörünün *T. thermophila* CU428 hücrelerine transformasyonundan sonra seleksiyonu tamamlanmış pozitif transformant hücrelerden genomik DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen genomik DNA'lar, **pTtAC2-6xHis-sfGFP-EK.-hGH** vektörü için FhisGFP ileri ve RhGH geri, **pTtAC2-6xHis-hGH** vektörü için FhisHGH ileri ve RhGH geri, **pTtAC2-hGH** vektörü için Fhghtakısız ileri ve RhGH geri, pTtAC2-PLA23-6xHis-hGH ve pTtAC2-PLA22-hGH vektörleri için ise FkoPLA ileri ve RhGH geri primerleri kullanılarak PZR reaksiyonu kurulmuştur. PZR ürünleri agaroz jelde koşturularak beklenen DNA bantların varlığı (Şekil 3.3), makroçekirdek içinde bu vektörlerin muhafaza edildiğini göstermiştir.



Şekil 3.3. Takılı ve takısız hGH gen dizileri içeren TtAC2 vektörü bulunduran pozitif transformant hücrelerinin makroçekirdeğinde hGH gen dizilerinin PZR ile tespiti. A. pTtAC2-6xHis-sfGFP-Entr-hGH vektörü içeren tek hücre klonlarının Genomik DNA analizi. **1:** Generuler 1kb plus (SM1331), **2:** D1 tek klon hücre hattı, **3:** F1 tek klon hücre hattı, **4:** H1 tek klon hücre hattı. **B.** pTtAC2-hGH ve pTtAC2-6xHis-hGH tek hücre klonlarından genomik DNA analizi. **1:** Generuler 1kb plus (SM1331), **2:** pTtAC2-hGH A4.3 tek klonu, **3:** pTtAC2-6xHis-hGH B11.2 tek klonu. **C.** pTtAC2-PLA22-hGH ve pTtAC2-PLA23-6xHis-hGH tek hücre klonlarından genomik DNA analizi. **1:** Generuler 1kb plus (SM1331), **2:** pTtAC2-PLA22-hGH C6.4 tek klonu, **3:** pTtAC2-PLA23-6xHis-hGH B11.2 D5.4 tek klonu.

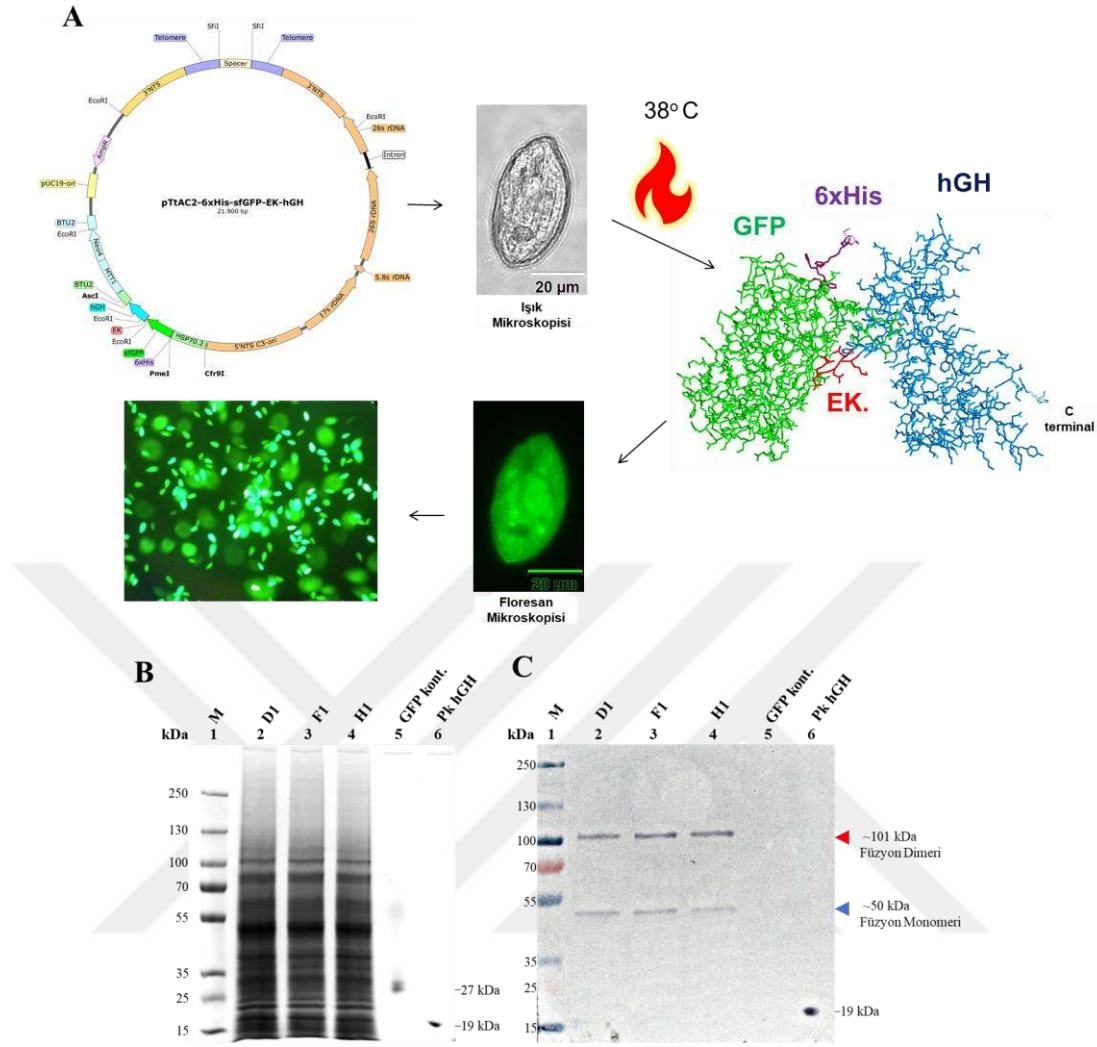
pTtAC2-6xHis-sfGFP-Entr-hGH vektörü içeren D1, F1 ve H1 tek hücre klonlarının genomik DNA analizlerinde, hGH kodlayıcı gen dizisinin dış primerleriyle kurulan PZR sonucunda agaroz jelde hedeflenen 1342 bp büyüklüğünde bantlar görülmüştür (Şekil 3.3.A. siyah ok). Aynı şekilde pTtAC2-hGH vektörü içeren A4.3 tek hücre klonunun analizinde 595 bp büyüklüğünde (Şekil 3.3.B- kuyu 2, turuncu ok) ve pTtAC2-6xHis-hGH vektörü içeren B11.2 tek klonunun analizinde ise 613 bp büyüklüğünde (Şekil 3.3.B- kuyu 3, mavi ok) beklenen bantlar saptanmıştır. Son olarak pTtAC2-PLA22-hGH vektörü içeren C6.4 (Şekil 3.3.C- kuyu 2) ve pTtAC2-PLA23-6xHis-hGH vektörü içeren D5.4 (Şekil 3.3.C- kuyu 3) tek hücre klonlarının genomik DNA analizlerinde ise sırasıyla hedeflenen 658 bp (mor ok) ve 679 bp (yeşil ok) büyüklüğündeki DNA bantları görülmüş (Şekil 3.3.C.) ve tüm deney gruplarının tek hücre klonlarının makroçekirdeklerinde ilgili vektör ile vektöre klonlanan hGH gen dizilerinin varlığı tespit edilmiştir.

3.4. Pozitif Transformantların Protein Seviyesinde Gen İfade Analizleri

3.4.1. *T. thermophila* pTtAC2-6xHis-GFP-EK.-hGH tek hücre klonlarının protein ifade analizi

HSP70.2 promotorlu pTtAC2-6xHis-GFP-Enterokinaz-hGH vektörü içeren D1, F1 ve H1 tek hücre klonları, iki gün boyunca hücreler logaritmik faza ulaşmaya kadar büyütülmüşler ve sonrasında hücrelere 6 saat boyunca 38°C de ısı şoku indüklemesi uygulanmıştır. İndükleme süresi boyunca hücrelerdeki GFP ekspresyonunun varlığı ve artışı mikroskopik analizler ile kontrol edilmiştir.

Protein izolasyonu ile toplam çözünür protein eldesinden sonra SDS-PAGE ve Western Blot analizleri, sitoplazmada 6xHis-sfGFP-EK.-hGH füzyon proteininin üretildiğini göstermiştir. Western Blot analizi yaklaşık 50 kDa (22 kDa hGH +27 kDa sfGFP + 1 kDa 6xHis ve EK.) büyüklüğünde beklenen bu füzyon proteininin tüm tek hücre klonlarından saflaştırılan toplam çözünür protein içinde bulunduğu göstermiştir (Şekil 3.4.C, mavi ok). 50 kDa'luk bu band coomassie boyamasında net kalın bir bant olarak gözükmemektedir (Şekil 3.4.B). Ayrıca bu bandların dimeri olarak düşünülen 101 kDa büyüklüğüne yakın kalın protein bandları hem coomassie hem de Western Blot analizinde görülmektedir (Şekil 3.4.C, kırmızı ok).



Şekil 3.4. pTtAC2-6xHis-sfGFP-EK.-hGH vektörü taşıyan *T. thermophila* D1, F1, H1 tek hücre klonlarının 38°C'de 6 saat ısı şoku indüklemesi ve sitoplazmik protein üretim analizi.

A. *T. thermophila* hücrelerinde şematik olarak 6xHis-sfGFP-EK.-hGH füzyon proteinin üretilmesi ve hücrelerin mikroskopik görüntüleri. Işık mikroskopisinde görülen *T. thermophila* D1 tek klon hücresi RaptorX ile yapılan temsili protein modellemesinde görüldüğü gibi sitoplazmik füzyon proteinini, hGH'nin (mavi) N-ucunda sırasıyla Enterokinaz tanıma dizisi (kırmızı), sfGFP (yeşil) ve 6x takısı (mor) olarak transle edilmektedir. Isı şoku indüklemesi boyunca sitoplazmada biriken füzyon proteinini floresans mikroskopisinde görüldüğü gibi floresans ışıkta hücrelerin GFP'den dolayı yeşil renkli ışığa vermesine neden olmaktadır (hücre örneği ısı şoku indüklemesinin 3. saatinde, 40x büyültmede floresans ataçmanlı IX51 Olympus Inverted Mikroskop ile görüntülenmiştir). **EK.:** Enterokinaz enzimi kesim bölgesi

B. pTtAC2-6xHis-sfGFP-EK.-hGH vektörü taşıyan *T. thermophila* D1, F1, H1 tek hücre klonlarına 38°C'de 6 saat ısı şoku indüklemesi yapılmış hatlarının sitoplazmik toplam çözünür proteinlerinin coomassie boyaması yapılmış SDS-PAGE analizi.

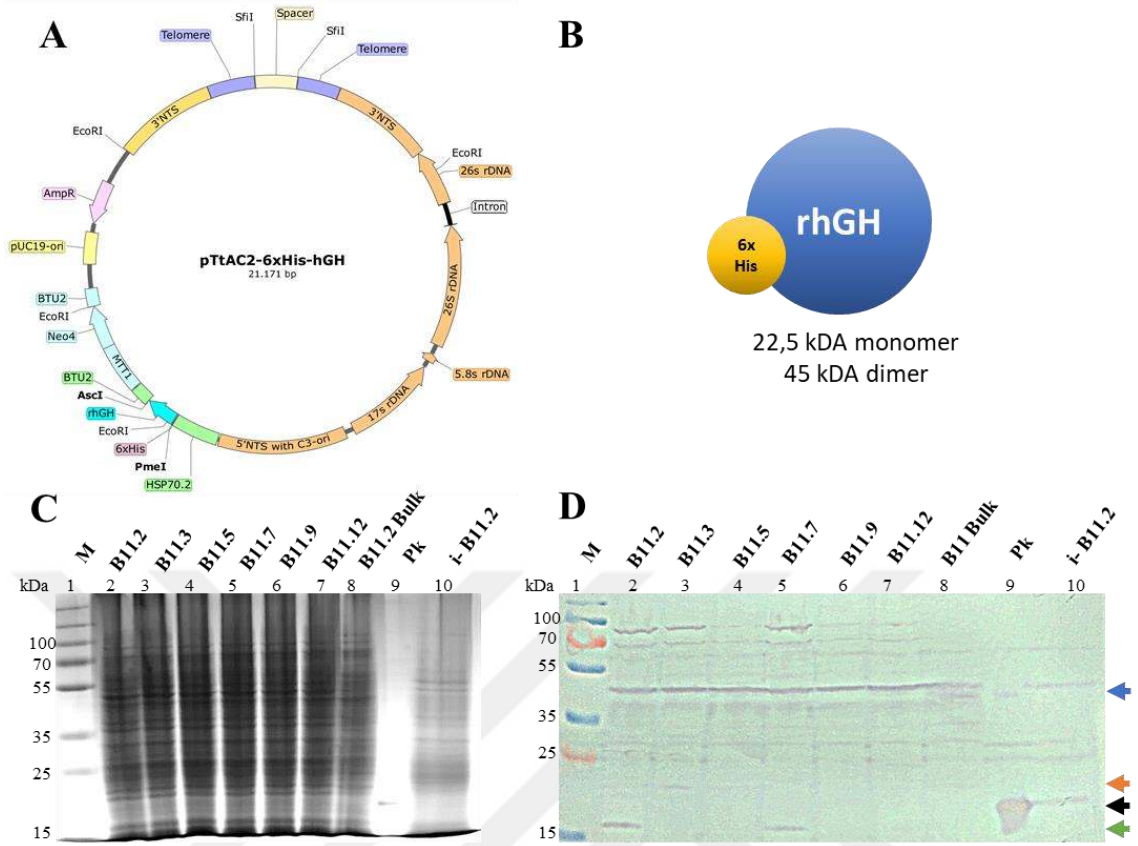
C. pTtAC2-6xHis-sfGFP-EK.-hGH vektörü taşıyan *T. thermophila* D1, F1, H1 tek hücre klonlarına 38°C'de 6 saat ısı şoku indüklemesi yapılmış hatlarının sitoplazmik toplam çözünür proteinlerinin Western Blot analizi. **B** ve **C** şekilleri için kuyular aynıdır; **1:** PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoScientific, #26619), **2:** D1 tek klon hücre hattı toplam çözünür protein, **3:** F1 tek klon hücre hattı toplam çözünür protein, **4:** H1 tek klon hücre hattı toplam çözünür protein, **5:** sfGFP pozitif kontrolü, **6:** Pozitif kontrol; Ticari ürün 22 kDa hGH pozitif kontrol proteinini (Humatrope 8 mg, Eli Lilly). Coomassie boyama ve Western Blot için iki farklı jel aynı şartlarda BioRAD TGX™ FastCast™ Acrylamide Solutions kiti (% 10 ayırıştırma jeli) ile hazırlanmıştır, 180V'da 45 dakika koşturulmuştur. Blotlama için 0.2µm PVDF membran kullanılmıştır, Towbin tamponu % 0,1 SDS içermektedir ve blotlama 100mA sabit 250 V'da 45

dakika olarak gerçekleştirilmiştir. % 5'lik süt tozu içeren TBS-T ile 1 saat oda sıcaklığında membrana bloklama uygulanmıştır. Birincil anti-GH-1/2 poliklonal antikoru (Santacruz, sc-36787) 1:200 oranında % 5'lik süt tozu içeren TBS-T ile kullanılarak +4 derece gece boyu, ikincil antikor olarak 1:10000 Anti-Rabbit antikor-HRP (GeneScript, A00098) TBS, TBS-T ile kullanılarak oda sıcaklığında 1 buçuk saat inkübe edilmiştir. Görüntüleme TMB substratı (ThermoScientific, N301) ile 15 dakika inkübasyon sonucu gerçekleştirilmiştir.

Sitoplazmik GFP-hGH füzyon proteininin *T. thermophila* organizmasında başarılı bir şekilde üretilebileceği bulgusuna varılmıştır. Tez çalışmasında hedeflenen diğer takılı ve takısız hGH proteinlerinin üretim çalışmalarına geçilmiştir.

3.4.2. *T. thermophila* pTtAC2-6xHis-hGH tek hücre klonlarının protein ifade analizi

Sitoplazmik 6xHis-hGH üretimi çalışmasında, 6 saat boyunca 38°C'de indüklenen pTtAC2-6x-hGH vektörü içeren *T. thermophila* B11 tek hücre klonlarının protein analizleri, hücre lizisi sonrasında elde edilen çözünür protein örnekleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bradford metodu ile konsantrasyonları belirlenen protein örnekleri SDS-PAGE jel kuyularına eşit miktarda yüklenmiştir. Bu çalışmada; hem 22 kDa monomer hem de 45 kDa dimer büyüklüklerinde 6xHis-hGH protein bantları beklenmektedir. Protein örneklerinin filtreden geçirilmemiş 5x SDS-PAGE yükleme boyaması ile muamele edilmesinden dolayı SDS-PAGE jelinde yatay geçişlerin olduğu bu deneyde belirlenmiş ancak sonuçları yanıltacak düzeyde olmadığı düşünülmüştür (Şekil 3.5.C). Western blot analizinde ticari pozitif kontrol (22 kDa hGH bu jel yüzdesinde yaklaşık 20 kDa büyüklükte koşmuştur.) net bir şekilde saptanmıştır (Şekil 3.5.D, siyah ok). Deney gruplarında 2. ve 5. kuyuda antikorun bağlandığı 17 kDa civarında hGH ile ilişkili protein bantları bulunmaktadır (Şekil 3.5.D, yeşil ok). Ayrıca 2. kuyuda kısmen görülen ve 3. kuyuda ise biraz daha net olarak gözükmekte olan hedef 22 kDa hGH büyüklüğünde protein bantları saptanmıştır (Şekil 3.5.D, turuncu ok). Büyüme hormonunun dimeri olarak düşünülen 44 kDa büyüklüğünde protein bantları, bu Western Blot çalışmasında da tüm deney gruplarında bulunmaktadır (Şekil 3.5.D, mavi ok). Isı şoku ile indüklenmemiş tek hücre klonundan saflaştırılan çözünür toplam çözünür protein izolatu, negatif kontrol olarak kullanılmıştır (Şekil 3.5.D, 10.kuyu). Western blot analizinin deney gruplarında bulunan 17 kDa ve 22 kDa hGH protein bantları negatif kontrolde bulunmamaktadır. Beklenilmeyen 17 kDa ve beklenen 22 kDa büyüklüğünde 6xHis-hGH proteinlerinin Western blot analizlerinde tespit edilmesi, hGH'ın sitoplazmik olarak *T. thermophila*'da üretiminin mümkün olduğunu gösterilmiştir.

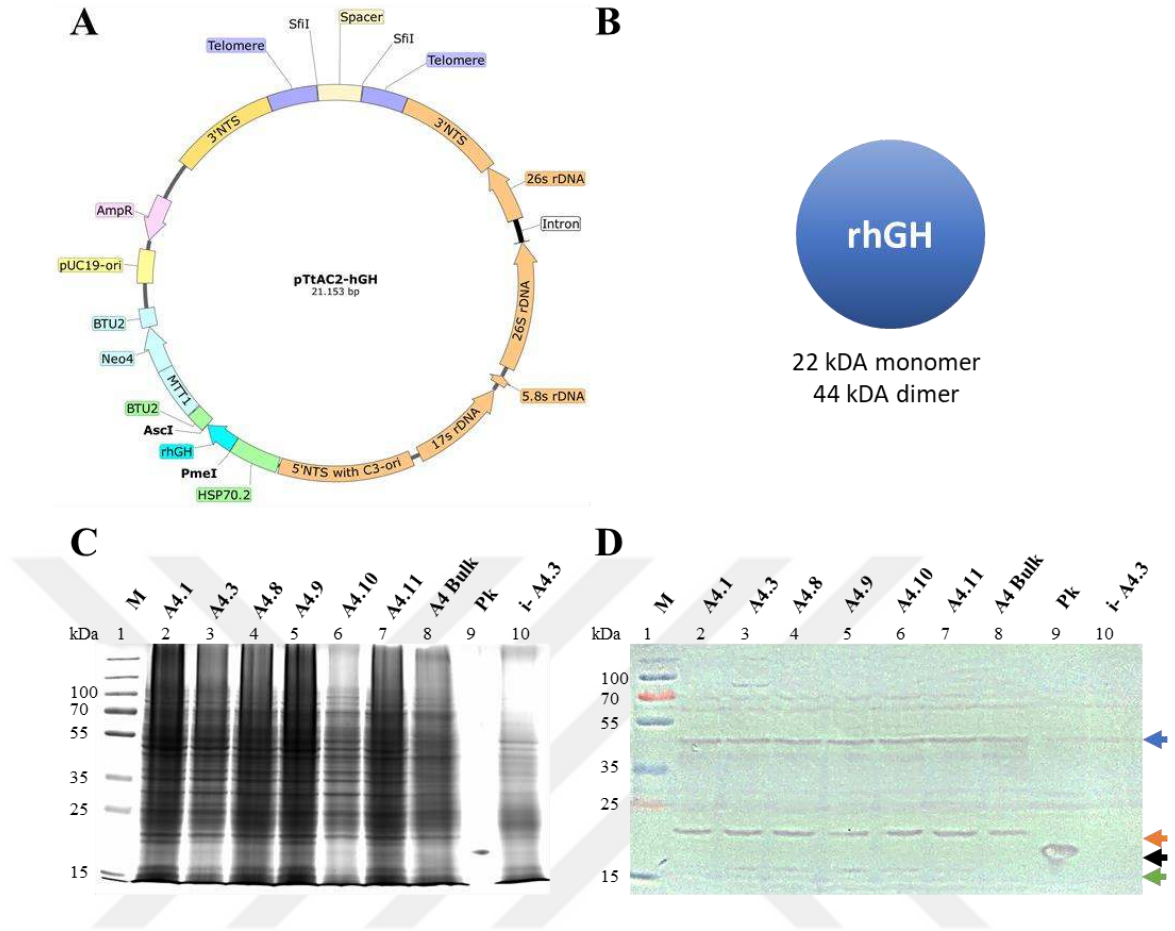


Şekil 3.5. pTtAC2-6xHis-hGH vektörü taşıyan *T. thermophila* B11 tek hücre klonlarının 38°C’de 6 saat ısı şoku indüklemesi ve sitoplazmik toplam çözünür proteinlerinin Western Blot ve SDS-PAGE analizi. **A.** Dairesel pTtAC2-6xHis-hGH vektörü, **B.** 6xHis-hGH yapısı ve beklenen monomer ve dimer büyüklükleri. **C.** B11 tek hücre klonlarınınin çözünür protein örneklerinin coomassie ile boyanmış SDS-PAGE görüntüsü. **D.** B11 tek hücre klonlarınınin toplam çözünür protein örneklerinin Western Blot analiz görüntüsü. Çözünür proteinlerin Bradford metodu ile miktar analizleri yapılmıştır. 5X SDS-PAGE yükleme tamponu ile protein örnekleri karıştırılmış, 95°C’de 5 dk denaturasyondan sonra kuyulara ortalama 10 µl örnek yüklenmiştir. Western Blot ve Coomassie jelleri ayrı olarak hazırlanmıştır. % 12’lik ayırıştırma jeli ve %5’lik paketleme jeli ile SDS-PAGE hazırlanmıştır. Protein örnekleri ayırıştırma jeline gelesiyeye kadar 60 V’da daha sonra 80 V’da jel koşuturulmuştur. Blotlama için 0.2 µm PVDF membran kullanılmıştır. Towbin tamponu % 0,1 SDS içermektedir ve blotlama 100 mA sabit 250 V’da 45 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir. Membran bloklaması, % 5’lik süt tozu içeren TBS-T ile 1 saat oda sıcaklığında yapılmıştır. Birincil anti-GH-1/2 poliklonal antikoru (SantaCruz, Santacruz, sc-367878) 1:200 oranında % 5’lik süt tozu içeren TBS-T ile +4 derecede gece boyu uygulanmıştır. İkincil antikor TBS-T’de 1:10000 Anti-Rabbit antikoru-HRP (GeneScript, A00098) TBS ile oda sıcaklığında 1 buçuk saat inkübasyonla uygulanmıştır. Görüntüleme TMB substratı (ThermoScientific, N301) ile 15 dakika inkübasyon sonucu gerçekleştirilmiştir. **Kuyu 1:** PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoScientific, #26619), **2:** B11.2 tek hücre klon hattı toplam çözünür proteini, **3:** B11.3 tek hücre klon hattı toplam çözünür proteini, **4:** B11.5 tek hücre klon hattı toplam çözünür proteini, **5:** B11.7 tek hücre klon hattı toplam çözünür proteini, **6:** B11.9 tek hücre klon hattı toplam çözünür proteini, **7:** B11.12 tek hücre klon hattı toplam çözünür proteini, **8:** pTtAC2-6xHis-hGH vektörlü *T. thermophila* bulk hücre hattı toplam çözünür proteini, **9: Pozitif kontrol;** Ticari ürün 22 kDa hGH pozitif kontrol proteini (Humatrope 8 mg, Eli Lilly), **10: Negatif kontrol;** Isı şoku ile indüklenmemiş B11.2 tek hücre klon hattı çözünür proteini.

SDS-PAGE ve Western Blot analizlerinde görüldüğü üzere hedeflenen 6xHis-hGH üretiminin tespit edildiği pTtAC2-6xHis-hGH vektörü içeren tek hücre klonlarından B11.2 (2. kuyu), B11.3 (3. kuyu) ve B11.7 (5. kuyu) klonları seçilerek tüplenmiş ve periyodik pasajlamaya alınmıştır (Şekil 3.5.D). 6xHis-hGH proteininin yüksek kültür hacminde çok miktarda üretilip saflaştırılması için son olarak B11.2 tek hücre klonu seçilmiş ve 500 ml hacimde kültürizasyonu yapılmıştır. Hücrelerden protein izolasyonu, 38°C’de 6 saat indüklenerek gerçekleştirilmiş ve bu proteinlerden Ni-NTA saflaştırılması gerçekleştirilmiştir.

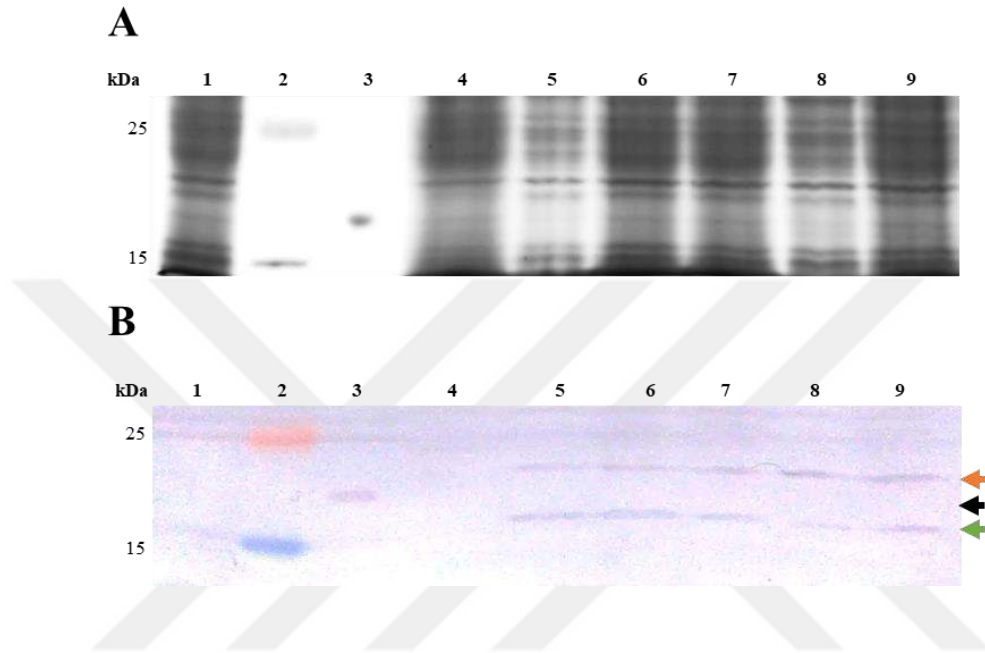
3.4.3. *T. thermophila* pTtAC2-hGH tek hücre klonlarının protein ifade analizi

Sitoplazmik hGH üretimi, 6 saat boyunca 38°C’de indüklenen pTtAC2-hGH vektörü içeren *T. thermophila* A4 tek hücre klonlarından elde edilen çözünür protein örnekleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bradford metodu ile konsantrasyonları belirlenen protein örnekleri SDS-PAGE jel kuyularına eşit miktarda yüklenmiştir (EK-18). Analizlerde, insan büyüme hormonunun dimerizasyonu yaygın olarak görüldüğü için bu çalışmada hem 22 kDa monomer hem de 44 kDa dimer büyüklüklerinde protein bandları beklenmiştir. Protein örnekleri, filtreden geçirilmemiş 5x SDS-PAGE yükleme boyaması ile muamele edildiğinden dolayı SDS-PAGE jelinde yatay geçişlerin görülmektedir ancak sonuçları saptıracak düzeyde değildir (Şekil 3.6.C). Western blot analizinin 9. Kuyusunda, ticari pozitif kontrol (22 kDa yerini bu jel yüzdesinde yaklaşık 20 kDa büyüklükte koşmuş) net bir şekilde saptanmıştır (Şekil 3.6.D, siyah ok). Deney gruplarının hepsinde yaklaşık 22 kDa hedef proteine denk büyüklükte büyüme hormonu antikorunun bağlandığı protein bandları bulunmuştur (Şekil 3.6.D, turuncu ok). Ayrıca yine tüm deney gruplarında büyüme hormonunun dimeri olarak düşünülen 44 kDa büyüklüğünde protein bandları belirlenmiştir (Şekil 3.6.D, mavi ok). Western blot analizinde kullanılan antikorun bağlandığı yaklaşık 17 kDa büyüklüğünde ince protein bandları 3., 4., 5., 6. ve 7. kuyularda görülmektedir (Şekil 3.6.D, yeşil ok). Negatif kontrol olarak ısı şoku ile indüklenmemiş A4 tek hücre klonundan saflaştırılan çözünür proteinler 10. kuyuya yüklenmiştir. Western blot analizi, negatif kontrol kuyusunda, deney gruplarında görülen 17 kDa ve 22 kDa protein bantları, beklenildiği gibi bulunmamaktadır. Western blot analiziyle, *T. thermophila*’da sitoplazmik 6xHis-hGH üretiminde görülen 17 kDa ve 22 kDa protein bantlarına eş bantlar sitoplazmik takısız hGH üretiminde de görülmüştür.



Şekil 3.6. pTtAC2-hGH vektörü taşıyan *T. thermophila* A4 tek hücre klonlarının 38°C’de 6 saat ısı şoku indüklemesi ve sitoplazmik toplam çözünür proteinlerinin Western Blot ve SDS-PAGE analizi. A. Dairesel pTtAC2-hGH vektörü. **B.** Temsili hGH yapısı, monomer ve dimer büyüklükleri. **C.** A4 tek klonlarının çözünür protein örneklerinin Coomassie boyama görüntüsü. **D.** A4 tek klonlarının çözünür protein örneklerinin Western blot analizi. Çözünür proteinlerin Bradford methodu ile miktar analizleri yapılmıştır. 5X SDS-PAGE yükleme tamponu ile protein örnekleri karıştırılmıştır, 95°C’de 5 dk inkübasyon sonrası kuyulara protein örneklerinin miktarlarına göre ortalama 10 µl örnek yüklenmiştir. Western Blot ve Coomassie jelleri ayrı olarak hazırlanmıştır ve % 12’lik ayırıştırma jeli ve % 5’lik paketleme ile SDS-PAGE jeli hazırlanmıştır. Protein örnekleri ayırıştırma jeline gelesiye kadar 60 V’da daha sonra 80 V’da jel koşurulmuştur. Blotlama için 0.2 µm PVDF membran kullanılmıştır, Towbin tamponu % 0,1 SDS içermektedir ve blotlama 100mA sabit 250 V ‘da 45 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. %5’lik süt tozu içeren TBS-T ile 1 saat oda sıcaklığında membrana blokama uygulanmıştır. Birincil anti-GH-1/2 poliklonal antikor (Santacruz, sc-367878) 1:200 oranında % 5’lik süt tozu içeren TBS-T ile kullanılmış +4 derece gece boyu, ikincil antikor olarak 1:10000 HRP Konjuge Anti-Rabbit antikor (GeneScript, A00098) TBS-T ile kullanılmış oda sıcaklığında 1 buçuk saat inkübe edilmiştir. Görüntüleme TMB substratı ile 15 dakika inkübasyon sonucu gerçekleştirilmiştir (ThermoScientific, N301), Kuyu 1: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoScientific, #26619), 2: A4.1 tek klon hücre hattı toplam çözünür protein, 3: A4.3 tek hücre klon hattı toplam çözünür protein, 4: A4.8 tek hücre klon hattı toplam çözünür protein, 5: A4.9 tek hücre klon hattı toplam çözünür protein, 6: A4.10 tek hücre klon hattı toplam çözünür protein, 7: A4.11 tek hücre klon hattı toplam çözünür protein, 8: pTtAC2-hGH vektörlü *T. thermophila* bulk hücre hattı toplam çözünür protein, 9: Pozitif kontrol; Ticari ürün 22 kDa hGH pozitif kontrol proteini (Humatrope 8 mg, Eli Lilly), 10: Negatif kontrol; İndüklenmemiş A4.3 tek hücre klon hattı çözünür protein.

SDS-PAGE ve Western Blot analizleri, pTtAC2-hGH vektörü içeren tek hücre klonlarının A4.3 (3. kuyu) ve A4.9 (5. kuyu) hedeflenen 22 kDa hGH'ı ürettiğini göstermiş ve bu iki tek hücre klonu seçilerek tüplenmiş, pasajlamaya alınmıştır (Şekil 3.6.D).



Şekil 3.7. pTtAC2-hGH veya pTtAC2-6xHis-hGH vektörü taşıyan *T. thermophila* A4 ve B11 tek hücre klonlarının 38°C’de 6 saat ısı şoku indüklemesi ve sitoplazmik toplam çözünür proteinlerinin Western Blot ve SDS-PAGE analizi. A. A4 ve B11 tek klonlarının çözünür protein örneklerinin coomassie boyama görüntüsü. B. A4 ve B11 tek klonlarının çözünür protein örneklerinin Western Blot görüntüsü. 5X SDS-PAGE yükleme tamponu ile protein örnekleri karıştırılmıştır, 95°C’de 5 dk inkübasyon sonrası kuyulara protein örneklerinin miktarlarına göre ortalama 15 µl örnek yüklenmiştir. Western Blot ve Coomassie jelleri ayrı olarak hazırlanmıştır ve % 12’lik ayrıştırma jeli ve % 5’lik paketleme ile SDS-PAGE jeli hazırlanmıştır. Protein örnekleri ayrıştırma jeline gelesiyeye kadar 60 V’da daha sonra 80 V’da jel koşturulmuştur. Blotlama için 0.2 µm PVDF membran kullanılmıştır, Towbin tamponu % 0,1 SDS içermektedir ve blotlama 100mA sabit 250 V’da 45 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. % 5’lik süt tozu içeren TBS-T ile 1 saat oda sıcaklığında membrana blokama uygulanmıştır. Birincil anti-GH-1/2 poliklonal antikor (Santacruz, sc-367878) 1:1000 oranında % 5’lik süt tozu içeren TBS-T ile kullanılmış +4 derece gece boyu, ikincil antikor olarak 1:10000 HRP Konjuge Anti-Rabbit antikor (GeneScript, A00098) TBS-T ile kullanılmış oda sıcaklığında 1 buçuk saat inkübe edilmiştir. Görüntüleme TMB substratı ile 15 dakika inkübasyon sonucu gerçekleştirilmiştir (ThermoScientific, N301). **1: Negatif kontrol;** vektör içermeyen *T. thermophila* CU428 toplam çöz protein, **2: Marker** ThermoFischer PageRuler, **3: Pozitif kontrol;** Ticari ürün 22 kDa hGH pozitif kontrol proteini (Humatrope 8 mg, Eli Lilly) **4: Negatif kontrol;** pTtAC2 B11.2 tek hücre klonu indüklenmemiş hücrelerden çözünür protein, **5: pTtAC2 B11.2 Ni-NTA saflaştırma 1. elüsyon proteini,** **6: pTtAC2 B11.2 toplam çözünür protein** (500 ml kültürden saflaştırma), **7: pTtAC2 B11.2 toplam çözünür protein,** **8: pTtAC2 A4.3 toplam çözünür protein** (500 ml kültürden saflaştırma), **9: pTtAC2 A4.3 toplam çözünür protein.** **Siyah ok:** Pozitif kontrol.

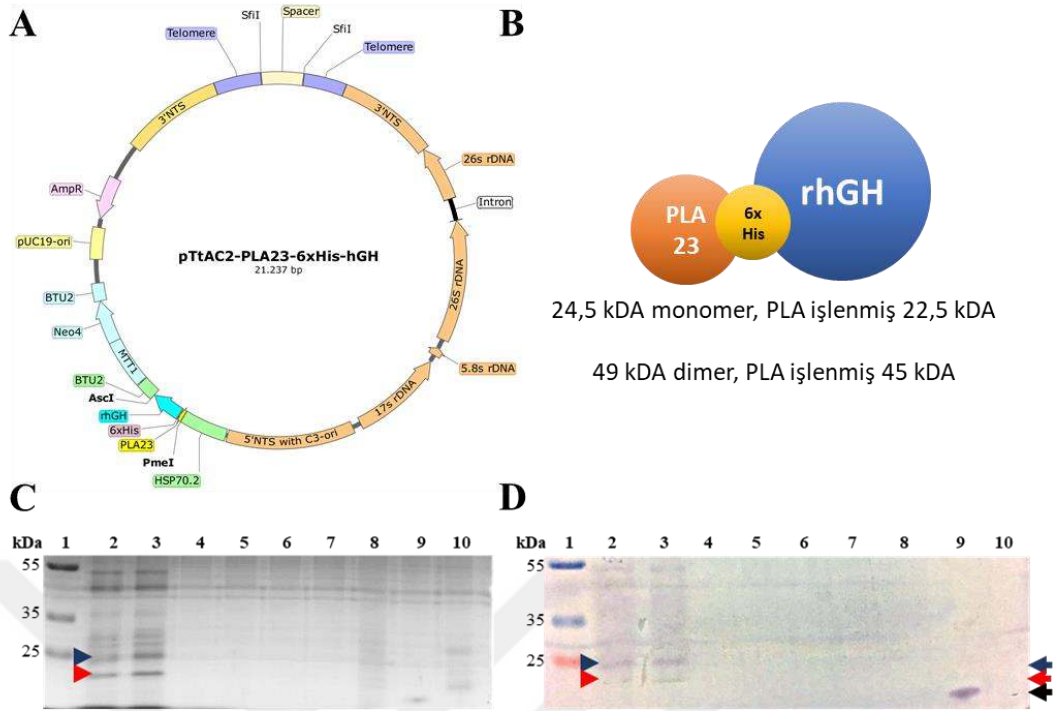
Seçilen pTtAC2-6xHis-hGH ve pTtAC2-hGH vektöru içeren *T. thermophila* tek hücre klon hatlarının toplam çözünür protein örnekleri (10 µl yerine 15 µl), 500 ml hücre kültürünün ısı şoku ile indüklemesinden elde edilen toplam çözünür protein örnekleri ve 6xHis-hGH proteini için Ni-NTA saflaştırmısından gelen birinci elüsyon proteinleri SDS-PAGE ve Western Blot analizlerine alınmıştır (Şekil 3.7).

Western Blot analizi bulguları, beklenen 22 kDa hGH monomerinin, (turuncu ok) ve beklenmeyen 17 kDa (yeşil ok) proteinlerinin üretildiğini göstermiştir ve bu proteinler ise negatif kontroller (kuyu 1 ve 4) de görülmemektedir (Şekil 3.6). Western Blot analizi, özellikle 6xHis-hGH proteininin (22,5 kDa, 5., 6. ve 7. kuyu), hGH proteininden (22 kDa, 8. ve 9. kuyu) 0,5 veya 1 kDa daha büyük olduğunu yanyana durmalarından dolayı net gösterebilmiştir (Şekil 3.7). 6xHis-hGH proteinin Ni-NTA saflaştırılmasında ise yine beklenen protein bandları saptanmıştır ancak bu saflaştırma yöntemi henüz optimize edilemediği için büyüme hormonu yüksek saflıkta elde edilememiştir. Böylelikle, farklı zamanlarda yapılmış bağımsız deney tekrarlarıyla hGH üretiminin gerçekleştiği ispatlanmıştır. Optimize Ni-NTA saflaştırılmasıyla da 6xHis-hGH proteinin yüksek saflıkta elde edilebileceği anlaşılmıştır.

Takısız hGH proteininin başarılı bir şekilde 6xHis-hGH proteini gibi rekombinant üretilmesi, yüksek kültür hacminde üretilip saflaştırılması ve biyoaktivite karakterizasyon analizlerine geçilmesi gerektiğini ortaya koymuştur.

3.4.4. *T. thermophila* pTtAC2-PLA23-6xHis-hGH tek hücre klonlarının protein ifade analizi

Dış ortama salgılatılması hedeflenen PLA23-6xHis-hGH proteini üretimi çalışmasında 3 saat boyunca 38°C’de indükleme, 3 saat 30 °C’de toparlanma, 3 saat 38 °C indüklenme ve 3 saat 30°C’de toparlanma periyodlarına alınan alınan pTtAC2-PLA23-6xHis-hGH vektöru içeren D5 tek klonlarının protein analizleri hem konsantre edilmiş hem de konsantre edilmemiş dış ortam protein örnekleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca sitoplazmik protein analizleri için hücrelerden toplam çözünür proteinler izole edilmiştir.



Şekil 3.8. pTtAC2-PLA23-6xHis-hGH vektörlü 3 saat 38°C’de ısı şoku, 30°C’de 3 saat toparlanma, 38°C’de 3 saat ısı şoku ve son olarak 30°C’de 3 saat toparlanma periyotlarında indüklemesi yapılmış D5 tek klonları içeren *T. thermophila* hücre hatlarının dış ortam protein analizi. **A.** Dairesel pTtAC2-PLA23-6xHis-hGH vektör yapısı **B.** PLA23-6xHis-hGH yapısı, PLA işlenmiş ve işlenmemiş monomer ve dimer büyüklükleri. **C.** D5 tek klonlarının dış ortam protein örneklerinin Coomassie boyama görüntüsü. **D.** D5 tek klonlarının dış ortam protein örneklerinin Western Blot görüntüsü 5X SDS-PAGE yükleme tamponu ile protein örnekleri karıştırılmıştır, 95°C’de 5 dk inkübasyon sonrası kuyulara protein dış ortam örnekleri için 25µl örnek yüklenmiştir. Western Blot ve Coomassie jelleri ayrı olarak hazırlanmıştır ve %12’lik ayırıştırma jeli ve %5’lik paketlenme ile SDS-PAGE jeli hazırlanmıştır. Protein örnekleri ayırıştırma jeline gelesiyeye kadar 60 V’da daha sonra 80 V’da jel koşturulmuştur. Blotlama için 0.2 µm PVDF membran kullanılmıştır, Towbin tamponu %0,1 SDS içermektedir ve blotlama 100mA sabit 250 V ‘da 45 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. %5’lik süt tozu içeren TBS-T ile 1 saat oda sıcaklığında membrana bloklama uygulanmıştır. Birincil anti-GH-1/2 poliklonal antikor (Santacruz, sc-367878) 1:200 oranında %5’lik süt tozu içeren TBS-T ile kullanılmış +4 derece gece boyu, ikincil antikor olarak 1:10000 HRP Konjuge Anti-Rabbit antikor (GeneScript, A00098) TBS-T ile kullanılmış oda sıcaklığında 1 buçuk saat inkübe edilmiştir. Görüntüleme TMB substratı ile 15 dakika inkübasyon sonucu gerçekleştirilmiştir (ThermoScientific, N301).

Şekil 8C ve 8D için kuyu 1: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoScientific, #26619), **2:** D5.1 tek klon hücre hattından 25 ml dış ortam Amicon Ultra-15 santrifuj filtresiyle konsantre edilmiş protein, **3:** D5.3 tek klon hücre hattından 10 ml dış ortam Amicon Ultra-15 santrifuj filtresiyle konsantre edilmiş protein toplam çözünür protein, **4:** D5.4 tek klon hücre dış ortamı konsantre edilmemiş protein, **5:** D5.5 hücre dış ortamı konsantre edilmemiş protein, **6:** D5.8 hücre dış ortamı konsantre edilmemiş protein, **7:** D5.10 hücre dış ortamı konsantre edilmemiş protein, **8:** pTtAC2-PLA23-6xHis-hGH vektörlü *T. thermophila* bulk hücre dış ortamı konsantre edilmemiş protein, **9: Pozitif kontrol;** Ticari ürün 22 kDa hGH pozitif kontrol proteini (Humatrope 8 mg, Eli Lilly), **10: Negatif kontrol;** İndüklenmemiş D5.5 klon hücre 25 ml dış ortam Amicon Ultra-15 santrifuj filtresiyle konsantre edilmiş protein.

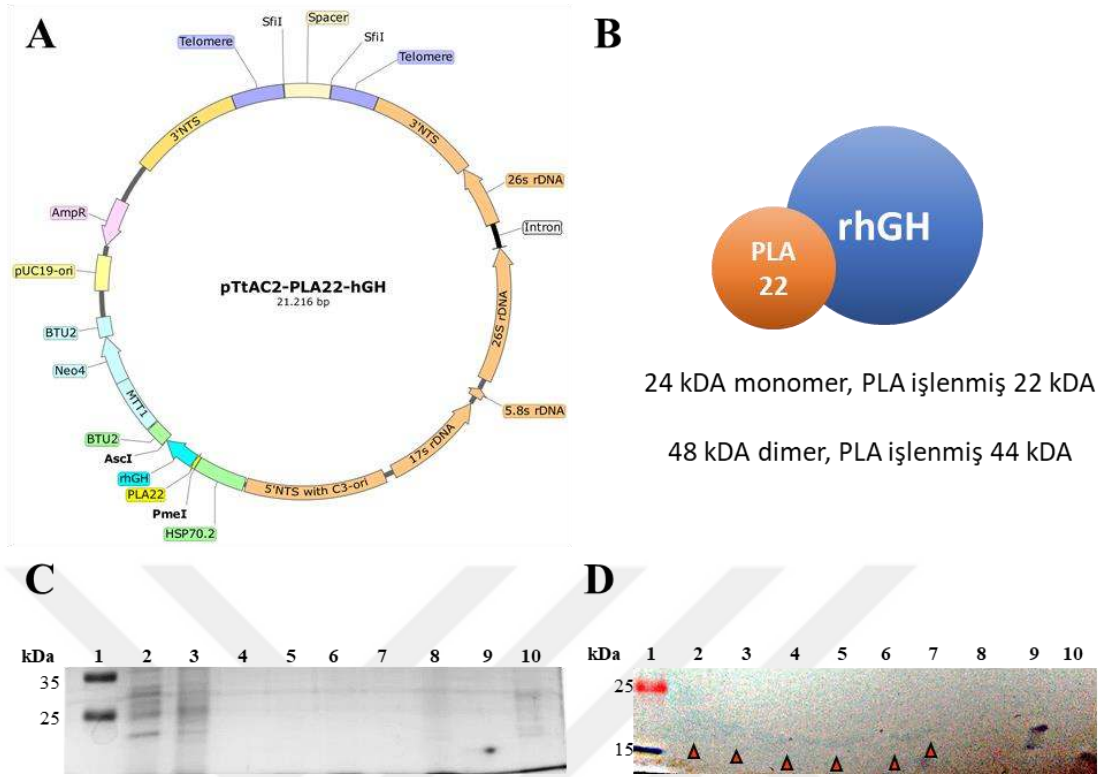
Bu çalışmada dış ortamda PLA sinyali işlenerek kesilmiş hem 22,5 kDa monomer hem de 45 kDa dimer büyüklüklerinde hGH protein bandları beklenmiştir. Western blot

analizinde ticari pozitif kontrol (yaklaşık 19 kDa) saptanmıştır (Şekil 3.8.D. kuyu 9). Deney gruplarında, konsantre edilmiş dış ortam proteinlerinde 2. ve 3. kuyuda 24 kDa (mavi ok) ve 22 kDa (kırmızı ok) büyüklüklerine yakın zayıf protein bandları görülmüştür (Şekil 3.8.D. kuyu 9). Bu protein bantları Coomassie boyama görüntüsünde de görülmektedir (Şekil 3.8.C. kuyu 9). Ancak protein bandlarının zayıflıklarından dolayı dış ortama salgılanan proteinin miktar olarak azlığı üzerinde durulmuştur ve bunun nedeninin *T. thermophila* sekretomunda bulunan proteazların büyüme hormonunu parçalanmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Hücrelerden sitoplazmik çözünür protein elde edilmesi ile yapılan Western Blot analizinde ise yaklaşık 22 kDa protein bantlaşması zayıf olarak görülmekteyken diğer deney gruplarında ve negatif kontrolde görülmemektedir. Bantlaşma görülen proteinin, E.R.'ye yönlendirilerek PLA işlenmiş bir durumda hücre dışına salgılanmadan önce hücre içinde kalan 6xHis-hGH proteinini olduğu düşünülmektedir (EK-24).

3.4.5. *T. thermophila* pTtAC2-PLA22-hGH tek hücre klonlarının protein ifade analizi

Dış ortama salgılanması hedeflenen PLA22-hGH üretimi çalışmasında, 3 saat boyunca 38°C'de indüklenme, 3 saat 30°C'de toparlanma, 3 saat 38°C indüklenme ve 3 saat 30°C'de toparlanma periyodlarına alınan pTtAC2-PLA22-hGH vektörü içeren C6 tek klonlarının protein analizleri hem konsantre edilmiş hem de konsantre edilmemiş dış ortam protein örnekleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca sitoplazmik protein analizleri için hücrelerden toplam çözünür proteinler izole edilmiştir. Bu çalışmada dış ortamda PLA sinyali işlenerek kesilmiş hem 22 kDa monomer hem de 44 kDa dimer büyüklüklerinde hGH protein bandları beklenmiştir. Western blot analizinde ticari pozitif kontrol (yaklaşık 20 kDa) saptanmıştır (Şekil 3.9.D. kuyu 9). Deney gruplarında belirtecin 25 kDa ve 15 kDa arasına denk gelen kuyu 2 ve 3'te biraz daha yoğun olmak üzere 4,5,6 ve 7. kuyularda smear şeklinde net olmayan renklenmeler gözlemlenmiştir (kırmızı oklar) ancak bunlar protein bandları olarak varsayılmamıştır ve dış ortamda hGH olmadığı düşünülmüştür. Hücrelerin sitoplazmik protein analizlerinde ise 44 kDa dimer bantlaşması ve tetramirik hGH (88 kDa) formunun varlığı görülmüştür. Ancak beklenen 22 kDa protein bandı sitoplazmik protein örneklerinde de görülememiştir (EK-24). İncelemeler üzerine, C6.4 (2. kuyu), C6.2 (3. kuyu) ve C6.9 (6. kuyu) tek hücre klonları seçilerek tüp pasajları yapılmıştır (Şekil 3.9.D.).



Şekil 3.9. pTtAC2-PLA22-hGH (takısız) vektörlü 38°C'de 3 saat ısı şoku, 30°C'de 3 saat toparlanma, 38°C'de 3 saat ısı şoku ve son olarak 30°C'de 3 saat toparlanma periyodlarında indüklemesi yapılmış C6 tek klonları içeren *T. thermophila* hücre hatlarının dış ortam protein analizleri. **A.** Dairesel pTtAC2-PLA22-hGH yapısı. **B.** PLA22-hGH yapısı, sitoplazmik ve dış ortam monomer ve dimer büyüklükleri. **C.** C6 tek klonlarının dış ortam protein örneklerinin Coomassie boyama görüntüsü. **D.** C6 tek klonlarının dış ortam protein örneklerinin Western Blot görüntüsü. 5X SDS-PAGE yükleme tamponu ile protein örnekleri karıştırılmıştır, 95°C'de 5 dk inkübasyon sonrası kuyulara dış ortam örnekleri için 25µl örnek yüklenmiştir. Western Blot ve Coomassie jelleri ayrı olarak hazırlanmıştır ve %12'lik ayrıştırma jeli ve %5'lik paketleme ile SDS-PAGE jeli hazırlanmıştır. Protein örnekleri ayrıştırma jeline gelesiyeye kadar 60 V'da daha sonra 80 V'da jel koşturulmuştur. Blotlama için 0.2µm PVDF membran kullanılmıştır, Towbin tamponu %0,1 SDS içermektedir ve blotlama 100mA sabit 250 V 'da 45 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. %5'lik süt tozu içeren TBS-T ile 1 saat oda sıcaklığında membrana blokama uygulanmıştır. Birincil anti-GH-1/2 poliklonal antikoru (Santacruz, sc-367878) 1:200 oranında %5'lik süt tozu içeren TBS-T ile kullanılmış +4 derece gece boyu ikincil antikor olarak 1:10000 HRP Konjuge Anti-Rabbit antikoru (GeneScript, A00098) TBS-T ile kullanılmış oda sıcaklığında 1 buçuk saat inkübe edilmiştir. Görüntüleme TMB substratı ile 15 dakika inkübasyon sonucu gerçekleştirilmiştir (ThermoScientific, N301).

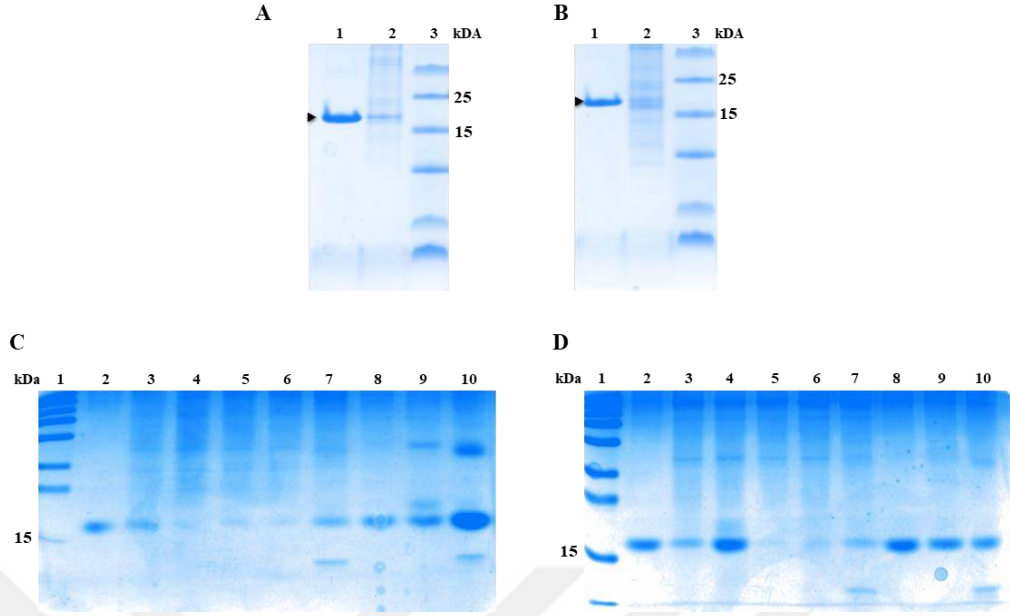
Şekil 9C ve 9D için kuyu 1: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoScientific, #26619), **2:** C6.4 tek klon hücre hattından 25 ml dış ortam Amicon Ultra-15 santrifuj filtresiyle konsantre edilmiş protein, **3:** C6.12 tek klon hücre hattından 10 ml dış ortam Amicon Ultra-15 santrifuj filtresiyle konsantre edilmiş protein toplam çözünür protein, **4:** C6.2 tek klon hücre dış ortamı konsantre edilmemiş protein, **5:** C6.8 hücre dış ortamı konsantre edilmemiş protein, **6:** C6.9 hücre dış ortamı konsantre edilmemiş protein, **7:** C6.11 hücre dış ortamı konsantre edilmemiş protein, **8:** pTtAC2-PLA22-hGH vektörlü *T. thermophila* bulk hücre dış ortamı konsantre edilmemiş protein, **9: Pozitif kontrol;** Ticari ürün 22 kDa hGH pozitif kontrol proteini (Humatrope 8 mg, Eli Lilly), **10: Negatif kontrol;** İndüklenmemiş C6.4 klon hücre dış ortamı 25 ml dış ortam Amicon Ultra-15 santrifuj filtresiyle konsantre edilmiş protein.

Sonuçta, PLA22-hGH dış ortam örneklerinden net olarak hGH bandı görülmemiştir, nedenleri deneysel veri eldesiyle ve literatür taramasıyla araştırılmıştır.

3.4.6. *T. thermophila*'da hGH üretim verimini azaltan unsurların belirlenmesi

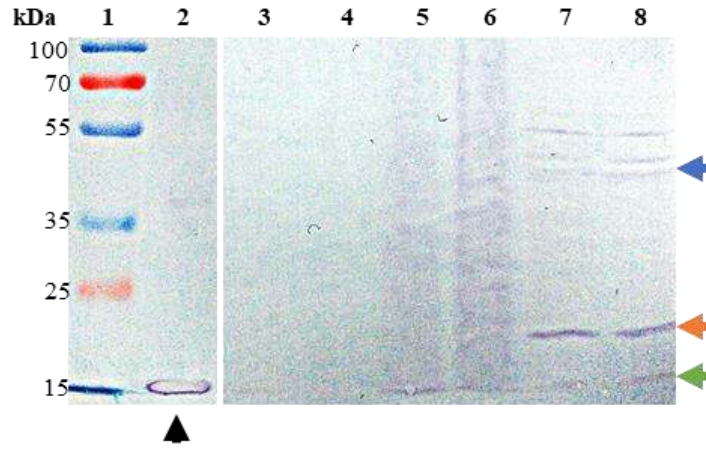
Dış ortamda protein eldesinde verim düşüklüğünün nedenlerinin bulunması için öncelikle tez çalışmasında kullanılan *T. thermophila* CU428 ırkı hücreleri NEFF besiyeri kullanılarak logaritmik faza ve durağan faza kadar kültüre edilmiştir ve dış ortamı konsantre edilerek pozitif kontrol ticari büyüme hormonu ile (Humatrope, 8 mg) muamele edilmiştir (Şekil 3.10.A ve B). Deney sonuçlarına göre hem logaritmik fazda hem de durağan fazda sekteromda bulunan proteazların insan büyüme hormonunu dramatik derecede fazla parçaladığı görülmüştür. Özellikle durağan fazda bu parçalama miktarının arttığı anlaşılmaktadır (Şekil 3.10.B).

6 saat NEFF besiyerinde indüklenmiş CU428 konsantre sekretomu ile hGH inkübasyonuna bakıldığında ise 1. saatten itibaren parçalanmanın çok olduğu görülürken, aynı şartlarda açlık tamponunda ise 3. saatten itibaren hGH parçalanması çok fazla olarak görülmüştür (Şekil 3.10.C kuyu 4 ve Şekil 3.10.D. kuyu 5). Ortama ayrıca proteaz inhibitör karışımı (PIK) eklendiğinde ise hGH parçalanmasının kısmen azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 3.10.C, Şekil 3.10.D. kuyu 6 ve 7). Dış ortam çalışmalarında ortama proteaz inhibitör karışımının eklenmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır. Konsantre olmayan sekretom örneklerinde ise ciddi hGH parçalanması görülmemiştir ancak burada proteazlar daha düşük yoğunlukta olduğu için aktivite etkisi net olarak bilinmemektedir. Bu deney tasarımıyla dış ortamda protein veriminin düşük olmasının bir nedeninin, *T. thermophila* sekretomunda hGH proteinini kesen proteazların bulunmasından dolayı olduğu ortaya çıkarılmıştır.



Şekil 3.10. *Tetrahymena thermophila* CU428 hücrelerinin sekretomda salgılanan proteazların insan büyüme hormonunu kesme analizi.

- A.** Logaritmik fazda salgılanan sekretom ile proteaz reaksiyonu. **B.** Durağan fazında salgılanan sekretom ile proteaz reaksiyonu. **1:** Büyüme Hormonu kontrolü (Humatrope 8 mg, Eli Lilly), **2:** Büyüme Hormonu + sekretom karışımı, **3:** Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder (ThermoScientific, #26628), **Siyah ok;** sekretom ile reaksiyona alınmamış, proteaz ile muamele edilmemiş kontrol protein büyüklük ve miktarlarını göstermektedir.
- C.** NEFF besiyerinde 6 saat ısı şoku ile indüklenmiş CU428 sekteromunun hGH (Humatrope 8 mg, Eli Lilly) ile inkübasyonu. **1:** PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoScientific, #26619), **2:** 1 saat 5µg hGH ve 50x. kons. **indüklenmemiş** NEFF besiyeri, **3:** 30 dakika 5µg hGH ve 50x. kons. **indüklenmiş** hücre NEFF dış ortamı, **4:** 1 saat 5µg hGH ve 50x kons. **indüklenmiş** hücre NEFF dış ortamı, **5:** 3 saat 5µg hGH ve 50x kons. **indüklenmiş** hücre NEFF dış ortamı, **6:** 12 saat 5µg hGH ve 50x kons. **indüklenmiş** hücre NEFF dış ortamı, **7:** 12 saat 5µg hGH ve 50x kons. **indüklenmiş** hücre NEFF dış ortamı + PİK, **8:** 1 saat 5µg hGH ve kons. **edilmemiş** NEFF dış ortamı, **9:** 12 saat 5µg hGH ve kons. **edilmemiş** NEFF dış ortamı, **10:** 12 saat 5µg hGH ve kons. **edilmemiş** NEFF dış ortamı + PİK.
- D.** Açlık tamponunda (Tris-HCL pH: 7.5) 6 saat ısı şoku ile indüklenmiş CU428 sekteromunun hGH (Humatrope 8 mg, Eli Lilly) ile inkübasyonu. **1:** PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoScientific, #26619), **2:** 1 saat 5µg hGH ve 50x. kons. **indüklenmemiş** açlık tamponu besiyeri, **3:** 30 dakika 5µg hGH ve 50x. kons. **indüklenmiş** hücre A.T. dış ortamı, **4:** 1 saat 5µg hGH ve 50x kons. **indüklenmiş** hücre A.T. dış ortamı, **5:** 3 saat 5µg hGH ve 50x kons. **indüklenmiş** hücre A.T. dış ortamı, **6:** 12 saat 5µg hGH ve 50x kons. **indüklenmiş** hücre A.T. dış ortamı, **7:** 12 saat 5µg hGH ve 50x kons. **indüklenmiş** hücre A.T. dış ortamı + PİK, **8:** 1 saat 5µg hGH ve kons. **edilmemiş** A.T. dış ortamı, **9:** 12 saat 5µg hGH ve kons. **edilmemiş** A.T. dış ortamı, **10:** 12 saat 5µg hGH ve kons. **edilmemiş** A.T. dış ortamı + PİK.



Şekil 3.11. hGH kodlayıcı gen dizileri bulunan TtAC2 vektörlerini taşıyan *T. thermophila* tek hücre klonlarının 38 °C 6 saat açlık tamponunda (Tris-HCL) ile ısı şoku indüklemesi ile protein üretiminin Western Blot Analizi. 50 ml hücre kültürü Tris-HCL pH:7.5'ta indüklenmiştir ve pelletlerde toplam protein izolasyonları yapılmıştır, dış ortamlar ise 100x konsantre edilerek kullanılmıştır. Protein örnekleri merkaptopetanol-süz 5x SDS-PAGE boyası ile muamele edilerek kaynatmaksızın kuyulara yüklenmiştir. Western Blot için % 12'lik ayrıştırma jeli ve % 5'lik paketleme ile SDS-PAGE jeli hazırlanmıştır. Protein örnekleri ayrıştırma jeline gelesiye kadar 60 V'da daha sonra 80 V'da jel koşturulmuştur. Blotlama için 0.2 µm PVDF membran kullanılmıştır, Towbin tamponu % 0,1 SDS içermektedir ve blotlama 100mA sabit 250 V'da 45 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. % 5'lik süt tozu içeren TBS-T ile 1 saat oda sıcaklığında membrana blokama uygulanmıştır. Birincil anti-GH-1/2 poliklonal antikor (Santacruz, sc-367878) 1:1000 oranında % 5'lik süt tozu içeren TBS-T ile kullanılmış +4 derece gece boyu, ikincil antikor olarak 1:10000 HRP Konjuge Anti-Rabbit antikor (GeneScript, A00098) TBS-T ile kullanılmış oda sıcaklığında 1 buçuk saat inkübe edilmiştir. Görüntüleme TMB substratı ile 15 dakika inkübasyon sonucu gerçekleştirilmiştir.

Kuyu 1: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoScientific, #26619), **2:** Ticari ürün 22 kDa hGH pozitif kontrol proteini (Humatrope 8 mg, Eli Lilly). **3: Negatif kontrol;** vektör içermeyen indüklenmiş *T. thermophila* CU428 konsantre dış ortam, **4: Negatif kontrol;** vektör içermeyen indüklenmiş *T. thermophila* CU428 toplam çözünür proteinini, **5: pTtAC2-PLA-6xHis-hGH** vektörü taşıyan D5.4 tek klon hattı konsantre dış ortam, **6: pTtAC2-PLA-hGH** vektörü taşıyan C6.4 tek klon hücre hattı konsantre dış ortam, **7: pTtAC2-6x-PLA-hGH** vektörü taşıyan B11.2 tek klon hücre hattı toplam çözünür protein, **8: pTtAC2-hGH** vektörü taşıyan A4.3 tek klon hücre hattı toplam çözünür protein. Siyah ok: Pozitif kontrol (distile su ile karıştırılarak yüklendiğinden jelde koşması farklılaşmıştır.) Bu çalışmada Coomassie Boyama analizi yapılmamıştır.

Şekil 3.10. deney tasarımındaki sonuçlara göre; açlık ortamındaki (Tris-HCL) CU428 ırkı hücrelerin ısı şoku tetiklemesi sonrasında elde edilen sekretomun, aynı şartlarda tokluk besiyerinden (NEFF besiyeri) elde edilen sekretomdan daha geç zamanlı ve kısmen daha az hGH parçalanması görülmesinden dolayı açlık ortamında hGH üretimi amaçlanmıştır. İndükleme sonrasında elde edilen hem toplam çözünür proteinlerinden hem de dış ortam proteinlerinden anti-hGH antikor kullanılarak Western Blot analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.11.'de sitoplazmik hGH (kuyu 8) ve 6xHis-hGH (kuyu 7) üretimlerinde turuncu okla gösterilen hedef 22 kDa hGH kalın bir band olarak görülmektedir. Ayrıca NEFF besiyerindeki indüklemelerdeki Western Blot analizine göre

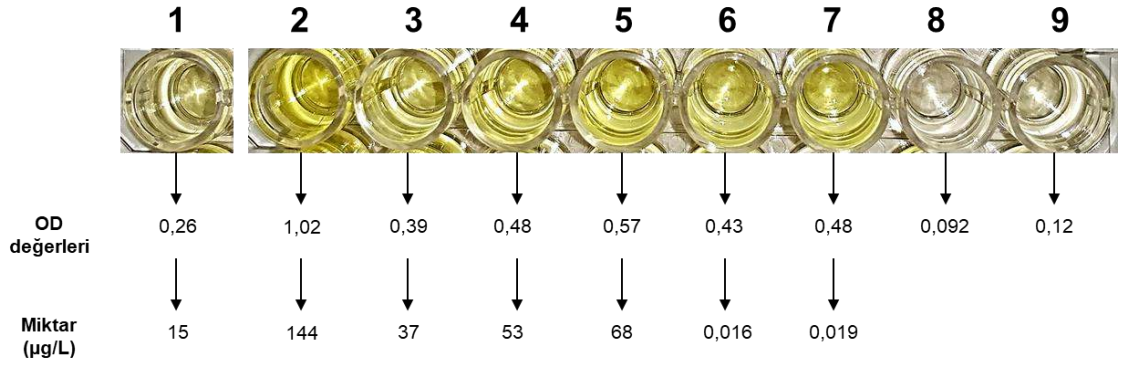
daha net bantlaşma saptanmıştır. Ancak beklenilmeyen 17 kDA hGH varlığı da söz konusudur (yeşil ok). 44 kDA dimer bantlaşması daha zayıf olarak görülmektedir ancak bunun açlık tamponu ile ilişkisi olup olmadığı bilinmemektedir. İndüklenmiş negatif kontrol vektörsüz *T. thermophila* CU428 toplam çözünür protein örneğinde (4. kuyu) herhangi bir band saptanmamıştır ve böylece sitoplazmik üretim hedeflenen deney gruplarında görülen bantların hGH ile ilişkisi bu çalışma ile de netleştirilmiştir.

Dış ortama salgılatılması hedeflenen PLA-hGH (6. Kuyu) ve PLA-6xHis-hGH (5.kuyu) protein örnekleri için konsantre dış ortam örneklerinde net bir bantlaşma görülemezken, kirli bir arkaplan oluşumu görülmektedir. Aynı arkaplan oluşumu indüklenmiş *T. thermophila* CU428 konsantre dış ortam protein örneklerinde görülmezken, benzer durum daha önceki hücre dışına salgılatma çalışmalarında da görülmüştür (Şekil 3.8. ve 3.9).

Yukarıdaki sunulan bulgular, beklenilmeyen sitoplazmik 17 kDA hGH varlığının ve hücre dışına salgılatılan hGH'ın miktarındaki verim düşüklüğünün *T. thermophila*'nın sekretomunda bulunan proteaz enzimlerinden kaynaklandığı, hipotezini desteklemektedir.

3.4.7. hGH üretimlerinin ELİZA ile varlık ve miktarsal analizi

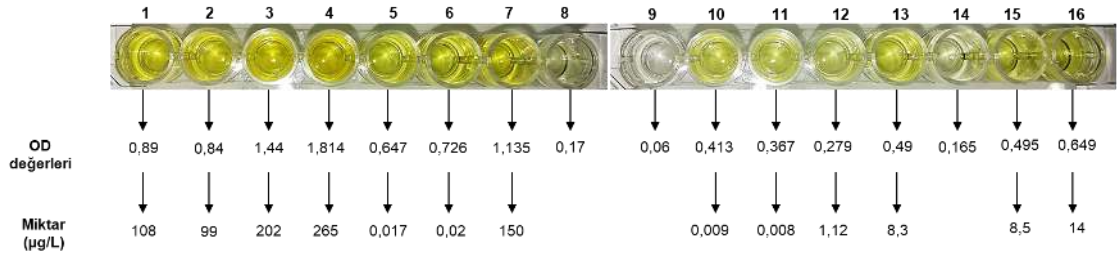
Western Blot yöntemi optimum şartlarda 1 ng/ml'ye kadar protein saptama çözünürlüğüne sahipken ELİZA testi 2.5 pg/ml'lik daha yüksek bir çözünürlüğe sahiptir (Roy vd.,2019). hGH gen kaseti içeren TtAC2 vektörü taşıyan tokluk şartlarındaki (NEFF besiyeri) *T. thermophila* tek hücre klonlarından ısı şoku indüksiyonu üretilen sitoplazmik ve hücre dışı protein örnekleri, hGH'ın varlık ve miktarsal analizi, bu nedenle Enzimle Bağlanmış İmmünosorbent Deneyi (ELİZA) ile gerçekleştirilmiştir. hGH ELİZA kiti (ThermoScientific, #EHGH1) Sandviç ELİZA prensibiyle çalışmakta olup öncelikle kit kullanılarak 2.5-600 pg/mL aralıklarında bir hGH standart grafiği çizilmiştir. Grafikten elde edilen formüle göre protein örneklerindeki hGH miktarları hesaplanmıştır (EK-27). Western Blot analizleri ile gösterilen hücre içi sitoplazmik hGH üretimleri, ELİZA ile de doğrulanmıştır (Şekil 3.12). Sitoplazmik hGH üretim miktarları 15-144 µg/L değerler aralığında bulunmuştur. PLA22/23 sinyal peptid dizilerinin hGH'ı hücre dışına yönlendirdiği tespit edilmiştir (Şekil 3.12 kuyu 6 ve 7). Ancak hücre dışı ortamda hGH miktarı (0,016 ve 0,019 µg/L) oldukça azdır. Western Blot ile hGH bandlarının görülememesinin sebebi böylece anlaşılmıştır.



Şekil 3.12. hGH gen kaseti içeren TtAC2 taşıyan NEFF besiyerindeki *T. thermophila* tek hücre klonlarından ısı şoku indüklemesi ile elde edilen protein örneklerinin ELİZA analizleri. 50 ml hücre kültüründen elde edilen toplam çözünür proteinlerin hepsi aynı konsantrasyonda olacak şekilde (yaklaşık 5µg/ml) ayrı tüplerde hazırlandı ve Elisa Kitinin B dilüsyon tamponu ile **1/50 dilue** edilerek 100 µl olarak kuyulara aktarıldı. **50x konsantre** edilmiş dış ortam örnekleri dilüe edilmeden 100 µl olacak şekilde kuyulara eklendi (ThermoScientific, #EHGH1). 450 nm’de spektrofotometrik ölçümler gerçekleştirildi.

Kuyu 1: pTtAC2-6xHis-GFP-EK.-hGH D1 tek hücre klonu çöz. protein, **2:** pTtAC2-hGH A4.3 tek hücre klonu çöz. protein, **3:** pTtAC2-6xHis-hGH B11.2 tek hücre klonu çöz. protein, **4:** pTtAC2-PLA22-hGH C6.4 tek hücre klonu çöz. protein, **5:** pTtAC2-PLA23-6xHis-hGH D5.4 tek hücre klonu çöz. protein, **6:** pTtAC2-PLA22-hGH C6.4 tek hücre klonu dış ortam, **7:** pTtAC2-PLA23-6xHis-hGH D5.4 tek hücre klonu dış ortam, **8: Negatif kontrol;** vektör içermeyen indüklenmiş CU428 ırkı çöz. protein, **9: Negatif kontrol;** vektör içermeyen indüklenmiş CU428 ırkı dış ortam.

Açlık tamponundaki hücrelerin ısı şoku ile indüklemesi sonrasında elde edilen hücre içi ve hücre dışı protein örnekleri, ayrıca ELİZA analizine alınmıştır. İndüklemeler esnasında, bazı deney gruplarında dış ortama ayrıca proteaz aktivitesini durdurucu 1x proteaz inhibitör kokteyli (1xPİK) eklenmiştir. ELİZA bulguları, sitoplazmik hGH ve 6xHis-hGH üretiminde kültür hacmi 50 ml’den 500 ml’ye çıkartıldığında üretim miktarının yaklaşık 2 kat arttığını göstermiştir (Şekil 3.13. kuyu 1-4). Optimize edilmemiş immünoçöktürme ve Ni-NTA saflaştırılmasında da hGH’ın varlığı tespit edilebilmiştir. 1xPİK eklenmiş 500 ml hücre kültüründen ısı şoku sonrası elde edilen 100x konsantre hücre dışı ortamdaki hGH miktarı, PİK eklenmemiş hücre dışı ortama göre yaklaşık 2 kat daha fazladır. Ortama eklenen PİK’in proteazları kısmen inhibe etmesi sebebiyle hGH üretim miktarında artış olduğu bulunmuştur.



Şekil 3.13. hGH gen kaseti içeren TtAC2 taşıyan açlık tamponundaki *T. thermophila* tek hücre klonlarından ısı şoku indüklemesi ile elde edilen protein örneklerinin ELİZA ile analizleri. 50 ml ve 500 ml hücre kültüründen elde edilen toplam çözünür proteinlerin hepsi aynı konsantrasyonda olacak şekilde (yaklaşık 5µg/ml) ayrı tüplerde hazırlandı ve Elisa Kitinin B dilüsyon tamponu ile **1/50 dilue** edilerek 100 µl olarak kuyulara aktarıldı. **100x konsantre** edilmiş dış ortam örnekleri dilüe edilmeden 100 µl olacak şekilde kuyulara eklendi. Ni-NTA ve immünoçöktürme ile elde edilen protein örnekleri **1/10 dilüe** edilerek 100 µl olarak kuyulara aktarıldı (ThermoScientific, #EHGH1). 450 nm’de spektrofotometrik ölçümler gerçekleştirildi. **Kuyu 1:** pTtAC2-hGH A4.3 tek hücre klonu 50 ml kültürden çöz. protein, **2:** pTtAC2-6xHis-hGH B11.2 tek hücre klonu 50 ml kültürden çöz. protein, **3:** pTtAC2-hGH A4.3 tek hücre klonu 500 ml kültürden çöz. protein, **4:** pTtAC2-6xHis-hGH B11.2 tek hücre klonu 500 ml kültürden çöz. protein, **5:** pTtAC2-PLA22-hGH C6.4 tek hücre klonu 1xPİK eklenmiş 500 ml dış ortam, **6:** pTtAC2-PLA23-6xHis-hGH D5.4 tek hücre klonu 1xPİK eklenmiş 500 ml dış ortam, **7:** pTtAC2-6xHis-GFP-EK.-hGH D1 tek hücre klonu 500 ml kültürden çöz. protein, **8: Negatif kontrol;** Vektör içermeyen indüklenmiş CU428 500 ml kültürden çöz. protein, **9: Negatif kontrol;** Vektör içermeyen indüklenmiş CU428 500 ml kültürden dış ortam, **10:** pTtAC2-PLA22-hGH C6.4 tek hücre klonu 500 ml dış ortam, **11:** pTtAC2-PLA23-6xHis-hGH D5.4 tek hücre klonu 500 ml dış ortam, **12:** pTtAC2-hGH A4.3 tek hücre klonu immünoçöktürme 1. elüsyonu, **13:** pTtAC2-6xHis-hGH B11.2 tek hücre klonu Ni-NTA 1. elüsyonu, **14: Negatif kontrol;** Vektör içermeyen indüklenmiş CU428 Ni-NTA 1. elüsyonu, **15:** pTtAC2-hGH A4.3 tek hücre klonu immünoçöktürme konsantre elüsyonları, **16:** pTtAC2-6xHis-hGH B11.2 tek hücre klonu Ni-NTA konsantre elüsyonları.

ELİZA deney bulguları, hem hücre içi sitoplazmik hem de hücre dışına salgılanan hGH proteinlerinin varlığını göstermiştir. Ancak, hücre dışına salgılanan hGH’nin Western blot bulgularının işaret ettiği gibi ELİSA bulguları hGH’nin düşük miktarda bulunduğunu, teyit etmiştir.

4. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

4.1. Sonuç

Rekombinant insan büyüme hormonunun *T. thermophila* organizmasında üretimi için hGH içeren farklı tasarımlı gen kasetleri TtAC2 vektörüne klonlanarak, biyolistik silah transformasyonu ile vejetatif *T. thermophila* CU428 hücrelerine transforme edilmiştir.

Hücrelerin seleksiyonu sonrası tek hücre klonları hazırlanmıştır. pTtAC2-6xHis-GFP-EK.-hGH vektörü içeren tek hücre klonlarının beklenen füzyon proteini büyüklüklüğü olan 50 kDa monomer ve 101 kDa dimer proteinlerini ürettiği, Western Blot ile gösterilmiştir (Şekil 3.4.).

Sitoplazmik hGH üretim çalışmaları, pTtAC2-6xHis-hGH vektörü içeren tek hücre klonlarından beklenilmeyen 17 kDa monomer ile 34 kDa dimeri (Şekil 3.5. ve EK-25), ayrıca üretimi hedeflenen ve beklenen 22 kDa monomer ile 44 kDa dimerinin üretildiğini; indüklemeye, saflaştırılmış toplam çözünür proteinleri ile afinitik saflaştırılmış (Ni-NTA saflaştırması) hGH'ların Western Blot analizleriyle gösterilmiştir (Şekil 3.7.). pTtAC2-hGH vektörü içeren tek hücre klonlarında ise aynı monomer ve dimer protein bantları Western Blot analizinde saptanmıştır (Şekil 3.6.).

pTtAC2-PLA23-6xHis-hGH vektörü içeren tek hücre klonlarının konsantre edilmiş hücre dışı ortam protein örnekleri ile yapılan çalışmalarda ise yaklaşık 22 kDa ve 24 kDa büyüklerinde çok zayıf protein bantları bulunduğu görülmüştür (Şekil 3.8.) Gerçekleştirilen ELİZA deneylerinde ise hem PLA23-6xHis-hGH hem de PLA22-hGH üretiminde hücre dışı ortamda hGH'ın varlığı tespit edilmiştir ancak miktarının çok düşük seviyede olduğu bulunmuştur (Şekil 12-13). Kültür hacmi arttırılarak ve dış ortama 1xPİK eklemesi yapılarak üretim miktarlarında 2 kat artış gerçekleşmiştir ancak bu da yeterli bir artış olarak görülmemiştir.

T. thermophila'da hGH'ın sitoplazmik ve hücre dışına salgılatılarak yapılan üretim çalışmaları; üretimin hücre dışına salgılatılarak yapılmasının tercih edilmesi gerektiğini işaret etmektedir. Çünkü sitoplazmik üretim esnasında beklenen 22 kDa monomer üretilmesine karşılık sitoplazmada bulunan bir proteaz tarafından 5 kDa ve 17 kDa versiyonlarına parçalanmaktadır. Hücre dışına hGH'ın salgılatılması çalışmasında ise zayıfta olsa sadece sitoplazmik 22 kDa monomer ile 44 kDa dimeri üretildiği gösterilmiştir (EK-24).

Hücre dışına salgılanan hGH'nın çok düşük miktarda bulunması, literatür ışığında, sekretom proteazları tarafından parçalanabilir, hipotezini oluşturmuştur. Isı şoku ile indüklenmiş/indüklenmemiş tok ve aç hücrelerin konsentre edilmiş/edilmemiş sekretom proteazlarının enzim yerine kullanılması ve hGH'nın ise substrat olarak kullanılması ile kurulan in vitro proteaz reaksiyon verileri, bu hipotezin doğruluğu desteklemektedir (Şekil 3.10). Daha az proteaz yoğunluğu ve aktivitesi olduğu düşünülen açlık ortamında (Tris-HCL tamponu) yapılan ısı şoku indüklemelerinde ise sitoplazmik hGH ve 6xhGH üretimi daha net bir şekilde görülmesine karşılık dış ortam örneklerinde kirli bir arkaplan oluşumu ortaya çıkmıştır. Negatif kontrolde görülmeyen bu arkaplanın sebebi bilinmemektedir (Şekil 3.11.)

Literatürde, HSP70.2 promotorunun 3' ucunda 20 bç ve devamında HSP70.2 proteinini kodlayan ilk 36 bç (toplam 56 bç) hipotetik IRES elementi olarak tanımlanmıştır (Yu vd., 2012). HSP70.2 proteinini kodlayan 36 bç dizinin ilk üç bazı ATG kodonu olduğundan, bu kodonla birlikte 12 aminoasitlik bir takının hedef proteine eklenerek transle edilmesi, özellikle terapötik proteinlerde immünojeniteye neden oluşturabileceği düşünülmüştür. Bu problemin giderilmesi için söz konusu IRES elementinin ATG kodonu ATT olarak mutasyonla değiştirilmiştir ve modifiye IRES elementli yeni HSP70.2 promotoru oluşturularak TtAC2 vektörüne entegre edilmiştir. Bu şekilde promotorun vektörle birlikte ilk endüstriyel üretim amaçlı kullanımı bu tezde sınanmıştır ve bulgular sonucunda bu promotorla başarılı bir şekilde hGH üretimi gösterilmiştir.

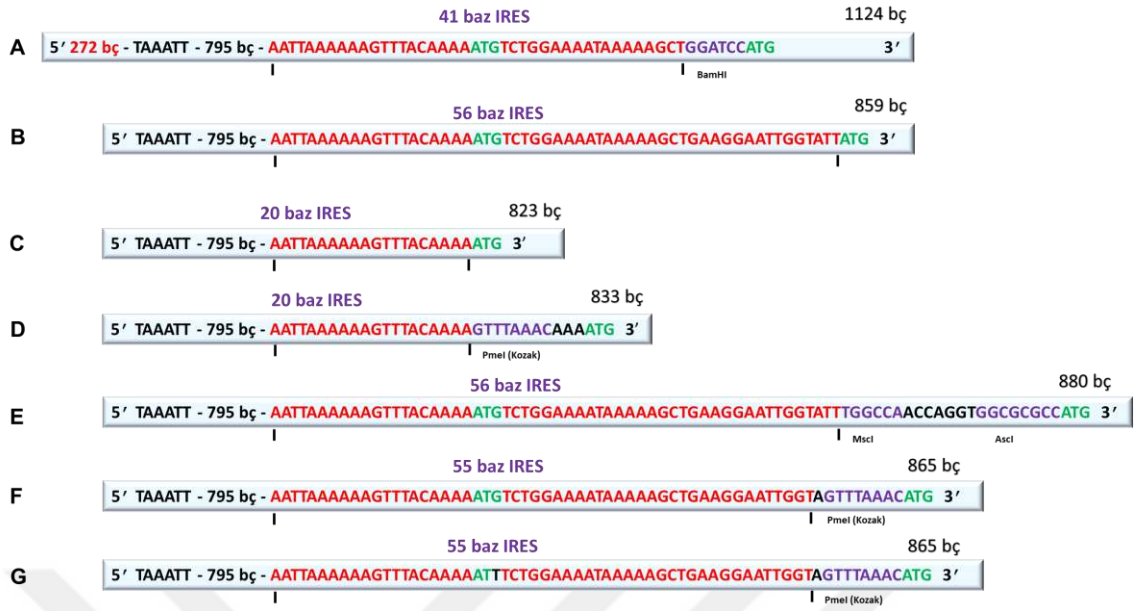
T. thermophila'da dış ortama salgılatılması amacıyla hDNaseI üretiminde kullanılan PLA36 sinyal peptid dizisinin (Weide vd., 2006) biyoinformatik analizlerinde (Signal IP5-0 programı), PLA36 sinyal peptidinin 22-23. aminoasiti arasından proteolitik kesim gerçekleştiği ve 23. aminoasitle birlikte toplam 12 aminoasitin proteinde takı olarak kaldığı belirlenmiştir. Bu durumun da İİU uyumlu olarak terapötik protein üretimine engel olacağı düşünülmüştür. Bu nedenle, Signal IP-5.0 proteolitik kesim programı biyoinformatik verilerine dayanarak aminoasit kalıntısız sinyal kesimi için PLA22 sinyal peptid dizisi hGH'nın hücre dışına salgılatılması için kullanılmıştır. Dış ortamda verim problemleri olmasına karşılık PLA22/23 sinyal peptid dizisi takılı hGH proteinlerinin *T. thermophila*'da üretildiği ve salgılatıldığı gösterilmiştir. Üretim miktarlarının artırılmasıyla elde edilen saflaştırılmış hGH proteinlerinin Edman Degradasyonu ile N-terminal ucunun belirlenerek hem IRES elementli HSP70.2 promotorunun hem de PLA22

sinyal peptidinin hGH'ta ek aminoasit kalıntısı bırakıp bırakmadığının öğrenilmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır.

Sonuç olarak; bu tez çalışması ile biyoaktivite analizleri için gerekli hGH proteinlerinin üretimi ve saflaştırılmasının vektörel altyapısı oluşturulmuştur. *T. thermophila*'da hGH'ın hücre dışına salgılatılarak üretilmesinin gerekliliğini ortaya koyan bu tez çalışmasının ana bulgusuna göre, sekretomda bulunan hGH'a spesifik parçalama yapan proteazları kodlayıcı gen(lerin) belirlenmesi ve genomdan silinmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Böylelikle hGH'ı spesifik parçalayan sekretom proteazından/proteazlarından arındırılmış mutant *T. thermophila* ırkında, bu tez kapsamında oluşturulan hGH kodlayıcı gen dizilerini içeren TtAC2 vektörleri kullanılarak optimize biyoreaktör kültürü çalışması ile hücre dışına yüksek verimlilikle hGH'ın salgılatılması ve saflaştırılması mümkün olacaktır.

4.2. Tartışma

Bu tez çalışması öncesi *T. thermophila* organizmasında hGH üretim çalışmalarına rastlanılmamış olmasına karşılık araştırma ekibinin 1502F092 BAP projesi kapsamında hGH üretiminin ilk AR-GE denemesi gerçekleştirilmiştir. Sözü geçen bu proje kapsamında; konjugatif ekstrakromozomal pVGF vektörü kullanılmış ve hGH üretiminin yapılabileceği Western Blot analizleri ile ilk defa gösterilmiştir (Dereli S., 2017; Çalışeki, M. Dereli, S. ve Arslanyolu, M. 1502F092 BAP, 2018; yayınlanmamış veri). Böylece *T. thermophila*'da hGH'ın üretilebileceği kısmen anlaşılmıştır (EK-3). Ancak pVGF vektörü (Malone vd., 2005; Yao vd., 2007), *E. coli* vektör sınırlarında *T. thermophila* mikroçekirdek kromozom kesilme bölgeleri (Chromosome Breakage Site; CBS) içermektedir. Konjugasyon esnasında yeni MAC gelişirken transform edilen halkasal pVGF vektörü, CBS bölgelerinden kırılır ve *E. coli* bölgesi salınırken kalan doğrusal vektör DNA'sının uçlarına telomer eklenir. Yeni makroçekirdek içinde doğrusal pVGF minikromozomu native rDNA minikromozomumu ile amitotik bölünmeler ve haploid ayrışma ile rekabete girerek, maksimum 2 ay muhafaza edilir (Chalker, 2012). Bu organizmada ilk aydan itibaren doğrusal pVGF minikromozom vektörünün kopya sayısında azalma ve ikinci ayın sonuna doğru kaybedilme gerçekleşebildiğinden bu vektör, geçici (transient) muhafaza edilen kararsız vektörler sınıfındadır. Ayrıca bu vektörde kadmiyumla indüklenen MTT1 promotörü ile gen ekspresyonu gerçekleştirildiği için metal toksisitesi ve kontaminasyonu, İİU'ya uyumlu değildir. hGH üretiminde kadmiyum varlığı, hGH dimerizasyonuna sebep olduğu bildirilmiştir (Dienys vd., 2000; Saboury vd., 2007). Tüm bu sebeplerden dolayı daha kararlı muhafaza edilen makronükleer *T. thermophila* yapay kromozomu (TtAC2) vektörünün hGH üretiminde kullanımı bu tez kapsamında gerçekleştirilmiştir (Arslanyolu, M., Üstüntanır, A. F., ve Çalışeki, M., 2019. Türk Patent ve Marka Kurumu Başvuru No: 2019/04291). Makroçekirdek içerisinde TtAC2 vektörünün paramomisin baskılı veya baskısız iki yıla kadar muhafazası ile İİU'ya uyumsuz kadmiyumla indüklenen MTT1 promotörü yerine ısı şoku ile indüklenen modifiye HSP70.2 promotörü içermesi hem indüksiyon hem de kararlı transgenik organizmalar üretilmesi açısından İİU'ya uyumluluk sağlamaktadır. TtAC2 vektörünün ısı şoku ile protein ekspresyon sürekliliği iki sene yeşil floresans proteininin (GFP) üretimi ile takip edilerek, gösterilmiştir. Dairesel ve doğrusal formda kullanılabilen TtAC2, bu tez çalışmasında sadece dairesel formuyla hGH üretimi çalışmalarında kullanılmıştır.



Şekil 4.1. HSP70.2 promotor versiyonları ile bu tez kapsamında üretilen hipotetik mutant IRES elementini içeren versiyonun karşılaştırması. IRES: Internal Ribosome Entry Site, kırmızı renkle belirtilmiştir. IRES elementi HSP70.2 promotorunun 3' ucu 20 baz çiftinden ve HSP70.2 promotorunu kodlayan ATG kodonu ile ilk 36 baz çiftinden (toplam 56 bç) oluştuğu hipotezlenmiştir.

- A.** Çin Patentinde Kullanılan HSP70.2 promotoru (Feng ve Miu, CN101586119A, 2009). Toplam 1124 bç HSP70.2 promotor dizisi kullanılmıştır ve ayrıca HSP70.2 proteinini kodlayan gen bölgesinden de 21 baz çifti hipotetik IRES elementi (toplam 41 bç IRES) olarak kullanılmıştır. IRES elementinin 3' ucuna BamHI enzimi (mor renk) eklenerek promotor tasarımı tamamlanmıştır. Rekombinant proteini kodlayan genin ATG kodonu yeşil renk ile belirtilmiştir. Yeşil renkle belirtilen ATG kodonlarından IRES içindeki ATG kodonu tanınarak translasyon başlamaktadır ve hedef proteinde ek bir takı olarak kalmaktadır.
- B.** Yu ve arkadaşlarının 2011 yılındaki araştırmasında kullandıkları HSP70.2 promotoru (859 bç, Yu vd., 2012). Çin patentinde kullanılan HSP70.2 promotoruna göre 5' uçtan 272 bç daha kısa promotor dizisi (820 bç) kullanılmıştır. HSP70.2 proteinini kodlayan gen bölgesinden ise 36 bç (12 a.a.) hipotetik IRES elementi (toplam 56 bç) promotora dahil edilmiştir. Deneysel çalışmalarda, 38°C'de 3 ve 6 saat aralıksız protein ısı şoku indüklemelerinde hücrelerde yüksek verimde protein ekspresyonu görülmüştür. İndüklenen hücrelerin ayrıca 30°C ayrıca toparlanma/iyileşme periyoduna alınmalarına gerek duyulmamıştır. Ancak bu tasarımda, IRES elementinin 5' ATG kodonu ile kodlanan 12 aminoasitlik ek peptid dizi takısının hedef proteinde kalma olasılığı endüstriyel üretimler için soru işareti oluşturmuştur.
- C.** TtAC1 vektöründe kullanılan HSP70.2 promotoru (823 bç, Arslanyolu, M. ve Üstüntanır, A. F, Patent Başvuru No: 2018/13880). Bu vektörde kullanılan HSP70.2 promotoru 820 bç'den oluşmaktadır ve HSP70.2 promotorunun 3' ucunda bulunan 20 bç hipotetik IRES elementi içermektedir. HSP70.2 proteini kodlayıcı bölgedeki IRES elementi bölgesi bulunmamaktadır. Üretimi hedeflenen protein olan sfGFP, PLA36 sinyal peptid dizisi ile kullanılmıştır ve dış ortamda protein üretimi ancak ve ancak ısı şoku indüklemeleri sonrasında hücrelerin 30°C'de toparlanma/iyileşme periyodlarına alınması ile görülebilmıştır.
- D.** TtAC2 vektör tasarımının ilk versiyonunda kullanılan HSP70.2 promotoru (880 bç). 820 bç HSP70.2 promotor bölgesi kullanılmıştır ve HSP70.2 proteinini kodlayan 36 bç IRES elementi bölgesi (toplam 56 bç) de dahil edilmiştir. IRES elementinin 3' ucuna ayrıca restriksiyon enzimi kesim bölgelerini içeren toplam 21 bç dizi eklenerek promotor bölgesi uzatılmıştır. Bu tasarımda, 38°C'de 3 ve 6 saat aralıksız protein ısı şoku indüklemelerinde hücrelerde yüksek verimde protein ekspresyonu görülmüştür. Ancak bu tasarımda da IRES elementinin ATG kodonu ile kodlanan ek peptid dizi takısının hedef proteinde kalması endüstriyel üretimler için problem teşkil etmektedir.

- E.** TtAC2 vektör tasarımının bir diğer versiyonunda kullanılan HSP70.2 promotoru (833 bç). Bu tasarımda da 820 bç HSP70.2 promotor bölgesi kullanılmıştır. HSP70.2 promotorunun 3' ucunda bulunan 20 bç hipotetik IRES elementi içermektedir, HSP70.2 proteini kodlayıcı IRES elementi bölgesi bulunmamaktadır. Promotora, PmeI restriksiyon kesim bölgesi (mor renk) ile ATG öncesi kozak dizisi eklenmiştir. Deneysel verilerde, ısı şoku indüklemeleri ile hedef sfGFP üretimi görülememiş olup sadece toparlanma/iyileşme periyodlarına alınan hücrelerde GFP ışıması görülmüştür. Böyle bir kullanım stratejisinin de endüstriyel olarak uygulanması ek maliyetlere ve zaman kaybına neden olacağı düşünülmüştür.
- F.** TtAC2 vektör tasarımında kullanılan ATG kodonu içeren 55 bç hipotetik IRES elementli HSP70.2 promotoru (895 bç). Bu tasarımda diğer HSP70.2 promotorlarından farklı olarak HSP70.2 proteinini kodlayan ilk 35 bç IRES elementi olarak kullanılmıştır ve ayrıca yerleştirilen PmeI restriksiyon enzimi kesim bölgesinin (mor renk) 5' ucuna Adenin bazı eklenerek IRES elementi ile transle edilen hedef protein için çerçeve kayması engellenmiştir. Bu promotor, Şekil 4.1.G.'de belirtilen promotorun kontrolü olarak kullanılmıştır ve ısı şoku indüklemelerinde direk olarak hedef protein ekspresyonu görülmüştür.
- H.** TtAC2 vektörünün patentlenen versiyonunda kullanılan ATG kodonu içermeyen 55 bç hipotetik IRES elementli HSP70.2 promotoru (865 bç, Arslanyolu, M., Üstüntanır, A. F., ve Çalıseki, M., 2019. Türk Patent ve Marka Kurumu Başvuru No: 2019/04291). Endüstriyel kullanım için HSP70.2 proteinini kodlayıcı dizilere dahil olan IRES elementiyle birlikte transle edilen 12 aminoasitlik peptid dizisinin hedef proteinlerde takı olarak kalmaması ve takısız üretimle İÜ uyumu sağlamak amacıyla, IRES elementinde bulunan ATG kodonu ATT (T mutasyonu siyah renk) olarak mutasyon ile değiştirilmiştir. Ayrıca yerleştirilen PmeI restriksiyon enzimi kesim bölgesinin (mor renk) 5' ucuna adenin bazı eklenmiştir. Deneysel bulgulara, ısı şoku indüklemelerinde yüksek verimde hedef proteinin üretimi görülmüştür ve ek olarak hücrelerin toparlanma/iyileşme periyodlarına alınmasına gerek kalmamıştır. Böylelikle endüstriyel kullanım için zaman kaybının ve maliyet artışının önüne geçilmiştir. Tez çalışmasında, bu promotorun ilk kez endüstriyel olarak sınanması hGH üretimleri ile gerçekleştirilmiştir.

hGH üretimleri öncesinde, TtAC2 vektöründe bulunan HSP70.2 ısı şoku promotorunun endüstriyel kullanımı için uygunluk ve kolaylığının sağlanması amacıyla promotor üzerinde bir takım değişiklikler yapılmıştır. Şekil 4.1.'de görüldüğü üzere HSP70.2 promotor bölgesi ve HSP70.2 proteini kodlayıcı gen bölgesini içeren birçok promotor tasarımları literatürde ve çalışma ekibi tarafından gerçekleştirilmiştir. Hipotetik IRES elementinin kullanım farklılıkları promotorlarda çeşitliliğe sebep olmuştur. Promotorlarda bulunan IRES elementi aracılığıyla hücrede stres koşullarında devamlı olarak translasyonun sürdürülebilmesi sağlanmaktadır. Stres koşulunda CAP bağımlı translasyon durmakta/yavaşlamakta ve alternatif translasyon yöntemi olan IRES aracılığı ile translasyon gerçekleşmektedir (Komar ve Hatzoglou, 2011). Hücrelerde ısı şoku strese sebep olduğu için IRES elementi olmaksızın gerçekleştirilen indüklemelerde translasyon mekanizması durmakta veya çok yavaşladığı, mRNA bulunmasına karşın üretilen protein miktarının azlığı veya yokluğundan anlaşılmıştır (Paralel çalışmaların verileri sunulmamıştır). Bu nedenle; ısı şoku sonrası üretilen mRNA'lerden translasyon yapılabilmesi için hücreler normal 30°C büyüme şartlarında toparlanma/iyileşme periyoduna alınması gerekmektedir. Böylelikle sitoplazmada biriken mRNA'lar IRES

bağımlı translasyon yerine, CAP bağımlı olarak transle edilebilmesine karşılık verimlilik seviyesi yetersizdir. Endüstriyel kullanıma daha uygun olan hipotetik IRES elementini içine alan fakat üretilen rekombinant proteinlerin N-ucuna yapay 12 aminoasit eklemeyen mutasyon yapılarak yeni bir HSP70.2 promotorunun geliştirilmesi gerektiği ortaya çıkmıştır.

ATG kodunu içeren hipotetik IRES elementi nedeniyle hedef proteinlere eklenen olası 12 aminoasitlik peptid takısı temel AR-GE araştırmaları için belki bir sıkıntı oluşturmazken ilaç endüstrisinde özellikle terapötik protein ilaç üretimleri ile İÜ'ya uygun olmamasından dolayı kabul edilemez. Bu kapsamda, IRES elementinde yer alan ATG kodunu ATT'ye G→T mutasyonu ile dönüştürülerek, olası 12 amino asitlik peptid takısı oluşumu engellenmiştir. Hipotetik IRES elementi sonuna ise bir KOZAK dizisi ile ATG eklenerek yeni translasyon başlama bölgesi oluşturulmuştur. Tez çalışmasında Şekil 4.1.H'ta verilen ve tanımlanan ATG kodunu içermeyen 35 bç hipotetik IRES elementli HSP70.2 promotoru hGH üretimleri için kullanılmıştır.

T. thermophila organizmasında rekombinant hGH üretiminin yapılabilirliğinin hızlı analizinin yapılabilmesi için GFP geni içeren 6xHis-GFP-EK.-hGH gen dizisi, TtAC2 vektörünün ısı şoku promotoru altına klonlanmıştır. Rekombinant vektörün *T. thermophila*'ya transformasyonu sonrası yapılan ısı şoku indüklemelerinde mikroskopik analizlerde hücrelerde GFP ışması görülmüştür. Western Blot analizlerinde ise sitoplazmik füzyon proteininin 50 kDa monomer ve 100 kDa dimer protein bandları görülmüştür. Literatürde hGH füzyon protein tasarımlarına bakıldığında; tez çalışmasında gerçekleştirildiği gibi hGH proteinin N-ucuna eklenmiş takılı örnekler bulunmaktadır. Bu şekilde kullanılmasının gerekçesi olarak ise C-ucu hidrofobik katlanmalar gösterilmiştir (Nicoll vd., 1986; Kim vd., 2013; Nguyen vd., 2014; Mooney vd., 2014; Çalik vd., 2008). C-ucu GFP takısı eklenerek in vivo hGH füzyon proteininin üretimi de gerçekleştirilebilmiştir (Magoulas vd., 2000). GFP takılarının hedef proteinlerin hem N-ucuna hem C-ucuna eklenebileceği; C-ucuna eklenen GFP proteininin sarkık olmasından dolayı bir problem çıkmamasına karşılık N-ucuna eklendiğinde bağlayıcı uyum aminoasit dizisinin araya eklenmesi gerektiği bildirilmiştir (Miyawaki vd., 2003). Tez çalışmasında sfGFP proteini ile hGH proteini arasında enterokinaz kesim (DDDDK) bölgesi yerleştirilmiştir fakat bu dizi bağlayıcı bir aminoasit dizisi olarak planlanmamıştır. Bu nedenle; üretilen sfGFP-hGH füzyon proteininin katlanması fiziksel olarak zorlanmış ve esnek bir adaptör bulunmadığından translasyon esnasında katlanma gerçekleşirken

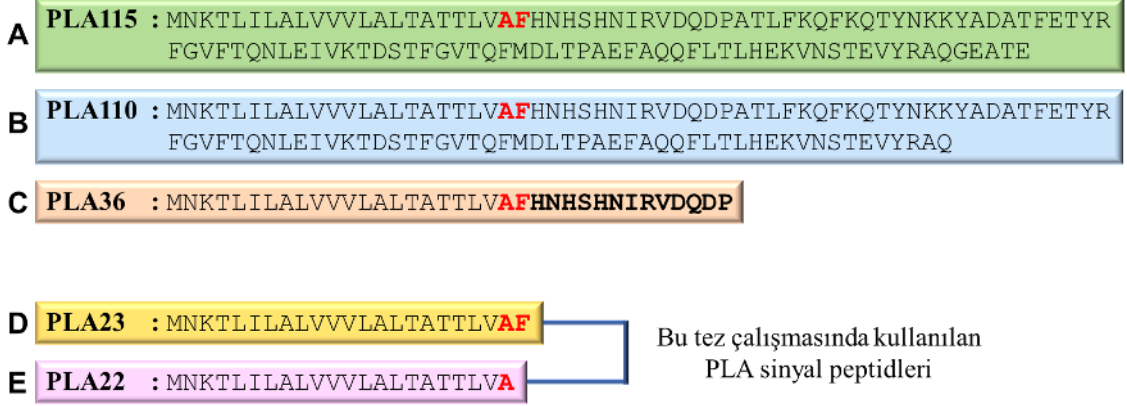
sfGFP kırıldığı gerçekleştirilen GFP ışımalı SDS-PAGE analizi ile bulunmuştur (EK-23). Bu durum ise sfGFP-hGH füzyon proteininin üretim verimliliğini düşürmektedir. Literatürde, esneklik sağlayan R grubu küçük aminositlerden oluşan GlyGlyGlyGlySer gibi aminoasit bağlayıcı dizilerinin kullanılması tavsiye edildiğinden yeni sfGFP-hGH'ın veya başka GFP'li füzyon proteinlerinin tasarımlarında bu durum dikkate alınması gerekmektedir (Chen vd., 2013; Klein vd., 2014).

Sitoplazmik olarak takısız hGH ve 6xHis takılı hGH üretimlerinde, Western Blot analizlerinde 22 kDa (hGH) ve 22,5 kDa (6xHis-hGH) hedef monomer protein bandları görüldüğünden üretimin başarıyla gerçekleştirildiği anlaşılmıştır. Bu bandların haricinde beklenilmeyen yaklaşık 17 kDa, 34 kDa ve 44 kDa büyüklüklerinde protein bandlarına da rastlanılmış fakat 5 kDa'luk bir protein bandı görülmemiştir (34 kDa dimer hGH, EK-25). Bu protein bantları, SDS-PAGE analizlerinde sıklıkla rastlanan hipofiz bezinden salgılanan 22 kDa hGH proteinin 44 kDa'luk dimeri ile olasılıkla *Tetrahymena thermophila* proteolitik enzimlerinin kesmesiyle oluşan beklenilmeyen 17 kDa monomer ile 34 kDa'luk dimeridir (Bustamante vd., 2009). 17 kDa hGH izoformu, 22 kDa hGH proteininin 43-44. aminoasit pozisyonunda proteaz enzimleri ile kesilmesi sonucu ortaya çıkmaktadır ve ayrıca literatür çalışmalarında pepsin ve thermolizin kesimleri ile de 17 kDa izoform elde edilebileceği raporlanmıştır (Lewis vd., 2000; Spolaore vd., 2004; Such-Sanmartín vd., 2009). Tez çalışmasının bulguları; sitoplazmik *T. thermophila* proteaz enzimlerinin 17 kDa hGH izoformu ile görülmeyen 5 kDa'luk izoformları oluşturabileceği hipotezini oluşturmaktadır. Ancak bu 17 kDa'luk hGH izoformu N-ucu 43-44. aminoasit pozisyonundaki bir proteaz enzimi kesilmiyle değilde C-ucundan yaklaşık 149-150. aminoasit arasından kesilmesiyle de oluşabileceği raporlanmıştır (Spolaore vd., 2004). 22 kDa hGH monomerinin 44 kDa dimer formu, iki 22 kDa monomerinin hidrofobik iç zincirleri arasında molekül arası yeni disülfid bağlarının kurulması ile oluşmaktadır. Ancak, 44 kDa hGH dimerlerinin saflaştırma koşullarından dolayı ortaya çıkmadığı, insanda hipofiz bezinde ve dolaşım sisteminde doğal olarak oluşan hGH izoformu olduğu belirtilmektedir (Grigorian vd., 2005). Bu dimerik yapı merkaptetanolün disülfid bağı parçalama etkisine karşı dirençlidir, ayrıca 22 kDa agregasyonu sebebiyle de dimerizasyon disülfid bağı kurulmaksızın da oluşabilmektedir (Grigorian vd., 2005). *T. thermophila*'da hGH üretimi sırasında doğal olarak 44 kDa hGH dimer izoformunun üretilebileceği ayrıca proteinlerin de konsantre edilmesiyle ortamdaki su molekülünün azalmasıyla dimerleşmenin artabileceği söz konusudur. Alternatif olarak

hGH üretimi için, TtAC2 ile yüksek miktarda rekombinant hGH üretimi yerine, genom entegrasyonuna dayanan sürekli fakat daha düşük miktarda hücre dışına salgılatılarak yapılacak hGH üretimi, dimer oluşumunu engellemede yardımcı olabilecek alternatif bir yaklaşım olarak düşünülebilir. Ayrıca saflaştırma esnasında lizis tamponu içine EDTA gibi redüktan kimyasalların eklenmesi ile dimerleşmenin azaltıldığı da bildirilmiştir (Grigorian vd., 2005). Western Blot ile üretildiği gösterilen sitoplazmik hGH proteinlerinin, ELİZA deneyleri ile de varlığı teyit edilmiştir. Takısız hGH için 202 µg/L (0,2 mg/L) ve 6xHis-hGH için 265 µg/L (0,26 mg/L) sitoplazmik üretim miktarları ELİZA ile belirlenmiştir (Şekil 3.13). Biyoreaktör şartlarında hücre içi sitoplazmik hGH üretimi ile optimize saflaştırma yöntemleri uygulanarak yüksek miktarda, saf hGH'ın elde edilmesi mümkün olabileceği düşünülmüştür.

Sitoplazmik hGH üretiminde diğer önemli bir konu, hGH proteininde bulunması gereken iki disülfid bağının üretim yapılan organizma tarafından oluşturulabilinmesidir. Literatürde, sitoplazmada disülfid bağı oluşumu, enzim olmaksızın oksidatif stres koşullarıyla kimyasal olarak da tetiklediği ve *S. cerevisiae*'da ısı şokunun oksidatif stresi tetikleyebildiği bildirilmiştir (Morano vd., 2012; Cumming vd., 2014). *T. thermophila*'da ısı şoku ile indüklemeye sırasında hücrelerde oksidatif stresin ortaya çıkacağı ve bu koşulda üretilen büyüme hormonunun disülfid bağlarının kurulabileceği hipotezlenebilir. Disülfid bağı bulunmayan büyüme hormonunun aktivitesini kaybetmediği fakat disülfid bağlarının bulunmasının büyüme hormonu reseptörüne olan afinitesini arttırdığını ve böylelikle biyolojik aktivitesinin arttığı literatürde bildirilmiştir (Dixon vd., 1966; Riia vd., 2013). Bu değerlendirme ışığında; Western Blot analizlerinin ortaya koyduğu 22 kDa sitoplazmik hGH'ın biyoaktif olabileceği sonucuna varılmaktadır.

(Weide vd., 2006)



Şekil 4.2. PLA1 sinyal peptid dizileri ile bu tez kapsamında geliştirilen PLA22/23'ün dizisel karşılaştırılması. Fosfolipaz A proteini (PLA1) 320 aminoasitten oluşmaktadır ve Ttherm_00683010 koduyla TGD'den (Tetrahymena Genome Database) PLA1'in biyoinformatik bilgilerine ulaşılabilir. Weide ve arkadaşlarının 2006 yılında insan DNase I'in *T. thermophila*'da dışarı salgılatılarak üretilmesi için PLA1 proteininin N-terminalinden itibaren belirledikleri uzunlukta aminoasit dizilerini sinyal peptid dizisi olarak kullanarak başarılı bir şekilde üretim gerçekleştirmiştir. **A.** N-ucu ilk 115 aminoasitlik PLA dizisi (PLA115). **B.** N-ucu ilk 110 aminoasitlik PLA dizisi (PLA110). **C.** N-ucu ilk 36 aminoasitlik PLA dizisi (PLA36). Üretimlerde elde edilen DNase I'in N-terminal ucunun Edman Degradasyonu ile belirlenmesi ile ilgili makalede bir veriye ulaşılamadığı için sinyal peptid dizisi olarak kullanılan diziler, Signal IP-5.0 biyoinformatik proteolitik kesim tahmin programına göre analiz edilmiştir. Program, PLA115, PLA110 ve PLA36 sinyal peptidlerinin hepsinde sadece tek bir bölgeden; 22-23. pozisyonunda Alanin (A) ve Fenilalanin (F) aminoasitleri (kırmızı renklendirilmiş) arasında sinyal peptid kesimi ve C-skorun (kesim olasılığı, 1 üzerinden) ise 0.4543 olduğu bilgisini vermiştir. Biyoinformatik verilere dayanarak, 22A aminoasiti ile 23F arasında kesim olduğu durumda, 22 aminoasitlik sinyal peptidin E.R.'da işlenip atılacağı kalan 23F ile özellikle PLA36 için 14 aminoasitin ek takı olarak üretilen hedef proteinde kaldığı düşünülmüştür. Endüstriyel kullanımlar için özellikle terapötik protein üretimlerde takıların immünojeniteye sebep olmasından dolayı bu şekilde bir PLA kullanımı uygun değildir. Bu nedenle tez çalışmasında, elde edilen biyoinformatik verilere göre kullanılan PLA sinyal peptidi tasarımı değişiklikler gerçekleştirilmiştir. **D.** Bu tez çalışmasında kullanılan N-ucu ilk 23 aminoasitlik PLA dizisi (PLA23). Tasarımda 6xHis takılı hGH'in dış ortama salgılatılarak üretimi hedeflenmiştir. Bu sebeple, 6xHis-hGH'in N-terminal ucuna PLA23 eklenmiştir. 22A-23F aminoasitleri arasında kesim gerçekleştiğinde, 6xHis-hGH'in sinyal peptid dizisi kalıntısı olmadan dış ortama salgılatılması beklenmiştir. Signal IP-5.0 programı, C-skor olarak 0.4084 gibi PLA36'ya yakın bir oranda gerçekleşme olasılığı vermiştir. **E.** Tez çalışmasında kullanılan N-ucu ilk 22 aminoasitlik PLA dizisi (PLA22). Tasarımda, takısız olarak hGH'in dış ortama salgılatılması hedeflenmiştir. PLA22 dizisinin son kodonu Alanini (A) kodlamaktadır ve hGH dizisinin ilk kodonu Fenilalanin (F) aminoasiti ile başlamaktadır. Böylelikle, doğal bir şekilde PLA22-hGH füzyonunda, uygun 22A-23F kesim bölgesi oluşmuştur. Signal IP-5.0 programı, C-skor olarak 0.7029 gibi yüksek ihtimalli bir kesim gerçekleşme olasılığını vermiştir. PLA22-hGH'in E.R.'ye yönlendirilerek PLA22'nin sinyal kesimi sonrası aminoasit kalıntısız hGH'in salgılatılması hedeflenmiştir (İlgili Signal IP-5.0 programı analiz grafikleri EK-11'de verilmiştir).

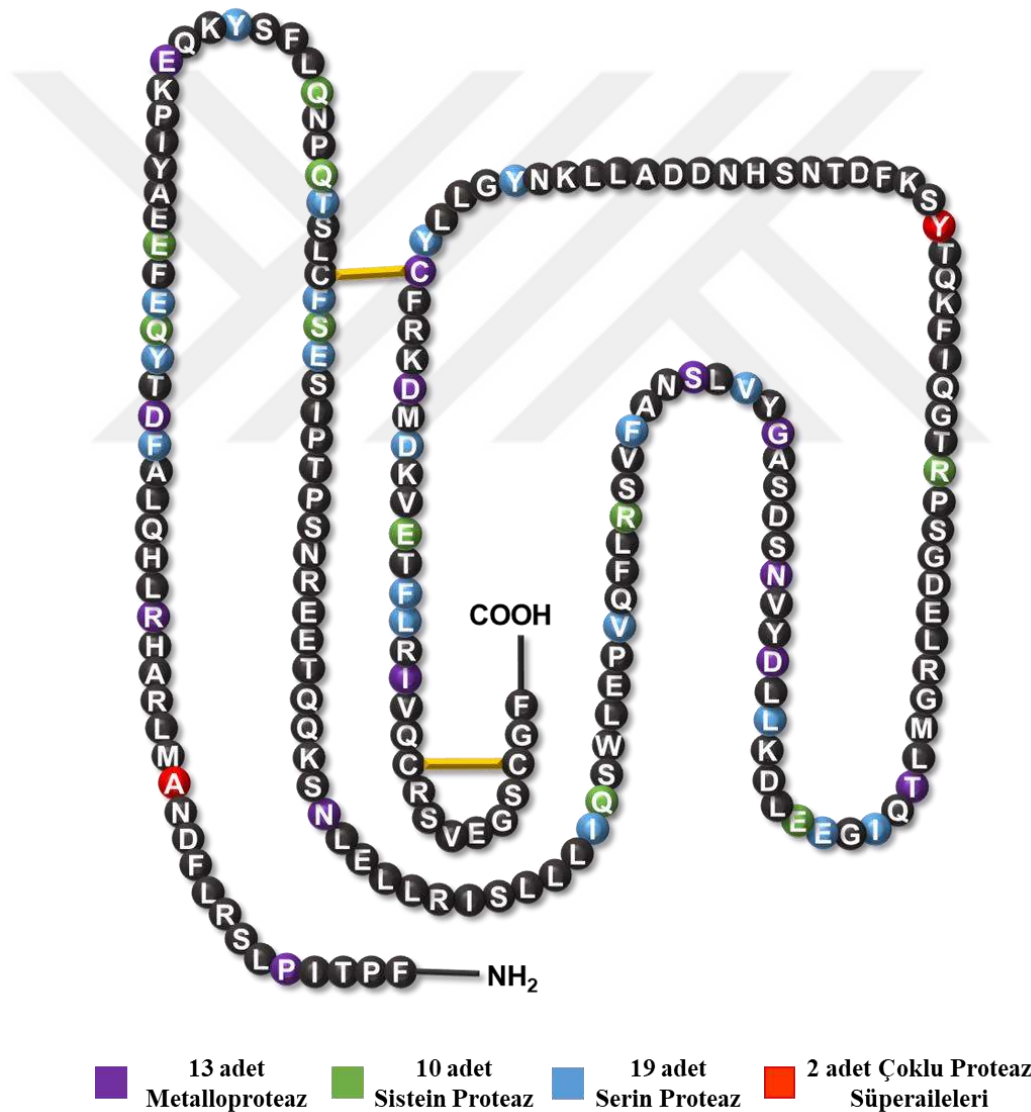
T. thermophila'da dış ortama salgılatılması için E.R.'ye yönlendirilerek gerçekleştiren hGH proteinlerinin üretimi; doğru bir şekilde katlanıp paketlenmesi, disülfid bağlarının oluşturulması ve daha az protein bulunan dış ortamdan kontamine olasılığı azaltılmış şartlarda etkin saflaştırması, amaçlanmıştır. Bu kapsamda, literatürde

T. thermophila'da dış ortama salgılatılan DNaseI üretiminde kullanılan PLA36, PLA110 ve PLA115 sinyal peptid dizileri arasından PLA36 araştırma ekibi tarafından rekombinant protein üretimlerinde kullanılmıştır ve dış ortamda protein üretimleri görülmüştür (Weide vd., 2006; (Arslanyolu, M. ve Üstüntanır, A. F., Türk Patent ve Marka Kurumu Başvuru No: 2018/13880). Ancak, biyoinformatik olarak Signal IP-5.0 proteolitik kesim tahmin programı analizine alındığında PLA36'nın 22A-23F pozisyonunda sinyal kesimine uğradığı ve kalan 14 aminoasitin hedef proteinde ek takı olarak kaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.2.). Bu durumun aksini belirten hiçbir deneysel bulgu literatürde bulunamamıştır. Bu yüzden endüstriyel kullanımlarda, terapötik proteinlerde immünojeniteye sebep olacak takıların kullanılması uygun olmadığı için PLA22 ve PLA23 sinyal peptid dizileri kullanılarak hGH'nın üretilmesi ve hücre dışı ortamına salgılatırılması hedeflenmiştir (Şekil 4.2-D, E).

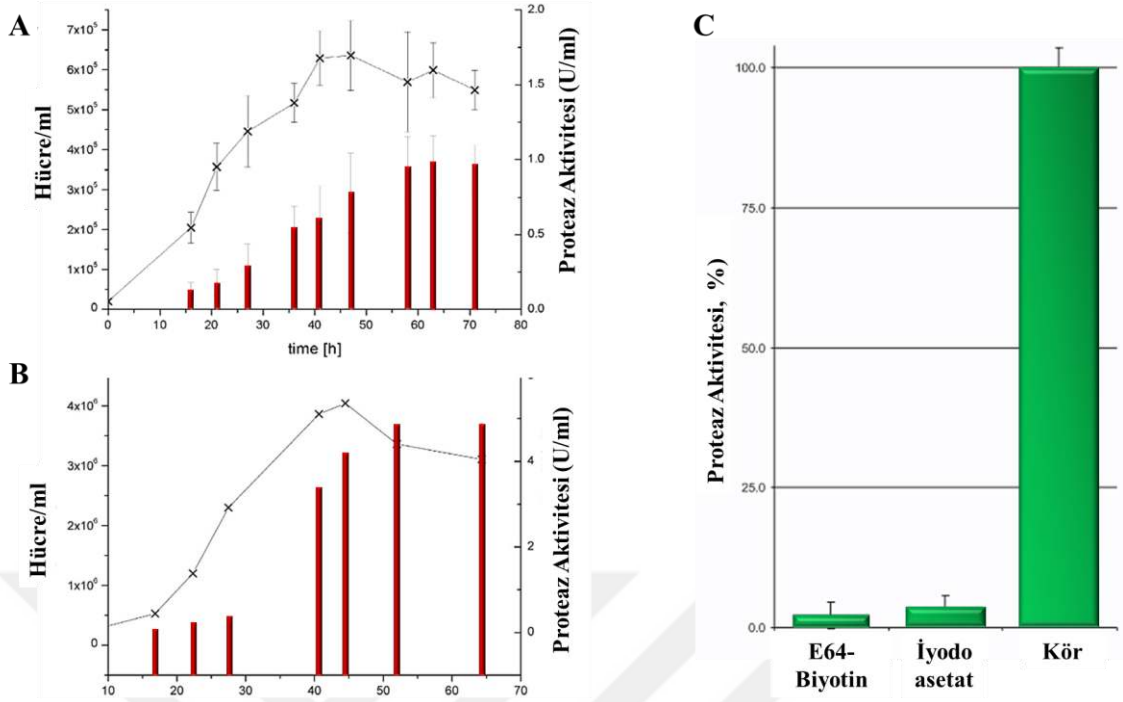
Hücrelerin ısı şoku ile indükleme ve toparlanma periyodları sonrasında konsantre edilmiş ve edilmemiş dış ortam protein örneklerinin kullanması ile gerçekleştirilen Western Blot analizi, pTtAC2-PLA23-6xHis-hGH vektörü içeren tek hücre klonlarından konsantre edilmiş dış ortam proteinlerinde, yaklaşık 22 kDa ve 24 kDa büyüklüklerinde zayıf protein bandlarının görülmesiyle sonuçlanmıştır. Literatürde 22 kDa hGH monomerin yanı sıra insanda glikozilasyona uğramış 24 kDa hGH formunda varlığı bilinmektedir (Haro vd., 1996). *T. thermophila* organizmasının da insana benzer glikozilasyon profilini rekombinant proteinlere ekleyebildiği literatürde bildirilmiştir (Callow vd., 2016). hGH üretiminin dış ortamda yetersiz miktarda olmasından dolayı 24 kDa'luk glikozilasyonlu hGH'nın varlığı saflaştırmadan sonra PNGase F enzimiyle analiz edilememiştir (Weide vd., 2006). pTtAC2-PLA22-hGH vektörü içeren tek hücre klonlarının dış ortam örneklerinde ise Western Blot analizinde hGH bandı saptanamamıştır. Daha yüksek hassasiyete sahip ELİZA ile gerçekleştirilen çalışmalarda, hem PLA22-hGH hem de PLA23-6xHis-hGH üretimlerinde PLA sinyal peptid dizileri işlenerek salgılatılmış hGH'ların varlığı tespit edilmiştir. Ancak dış ortamda hGH miktarının (0,016 ve 0,019 µg/L) oldukça düşük olduğu bulunmuştur (Şekil 3.12).

Tüm bu veriler ışığında hücre dışına salgılatılarak yapılan hGH üretiminde, verim kaybı olduğu anlaşılmıştır. Yapılan in vitro proteolitik enzim aktivite deneylerinde görüldüğü üzere *T. thermophila* sekteromundaki proteazlar, hGH proteinini çok etkin bir şekilde parçalamaktadırlar (Şekil 3.10). Bu deneysel veriyi; *Tetrahymena thermophila* proteazlarını veritabanında bulundurmayan fakat bilinen tüm ticari ve literatür

proteazlarını veri tabanında bulunduran PROSPER biyoinformatik programı ile hGH dizisi üzerinde yapılan proteolitik analiz bulguları desteklemektedir. PROSPER program analizi spesifik proteolitik kesim noktalarını tahmin ettiğinde 10 sistein proteaz, 13 metalloproteaz, 19 serin proteaz ve 2 çoklu proteaz süperaile üyesi tarafından (toplamda 44 farklı noktadan) kesilebileceği yani paramparça olabileceği biyoinformatik olarak öngörülmektedir (Şekil 4.1). Literatürde deneysel olarak da proteaz enzimlerinin hGH'ı birçok bölgesinden kestiği de bildirilmiştir (Laureto vd., 1995; Wroblewski vd., 2001; Alam vd., 2000; Saijoh vd., 2006; Such-Sanmartín vd, 2009).



Şekil 4.3. Biyoinformatik PROSPER programına göre insan büyüme hormonunun proteaz enzimleri ile kesime uğrayabilecek aminoasit pozisyonları. 'prosper.erc.monash.edu.au' websitesinden programa ulaşılabilir.



Şekil 4.4. *T. thermophila* CU438 hattı flask ve biyoreaktör kültür çalışmasında proteaz aktiviteleri ve proteaz aktivitesinin azaltılması için kullanılan moleküller.

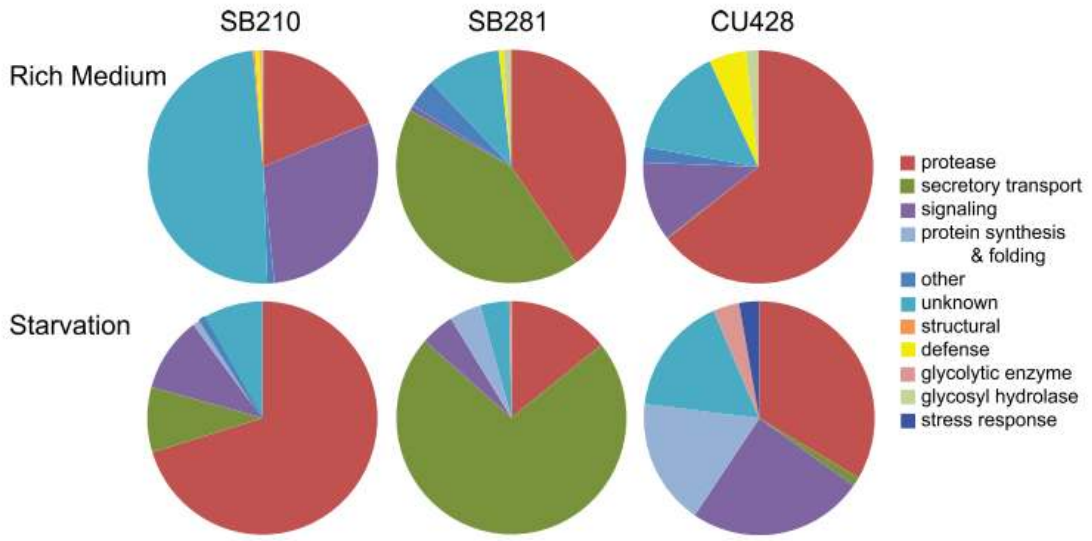
- T. thermophila* CU438 hücre hattı flask kültüründe zamana ve hücre sayısına bağlı olarak proteaz aktivitesi grafiği. Grafikte görüldüğü üzere hücre sayısı arttıkça 40. saatten sonra hücrelerin logaritmik fazdan durağan faza geçişlerinde proteaz aktivitesi ciddi bir şekilde artmaktadır. Hücre sayısı flask kültürde 650 bin/ml’de maksimize olmaktadır ve proteaz aktivitesi ise hücrelerin durağan fazında en yüksek değerlere (1 U/ml) ulaşmaktadır (Herrmann vd., 2006).
- T. thermophila* CU438 hücre hattı biyoreaktör kültüründe zamana ve hücre sayısına bağlı olarak proteaz aktivitesi grafiği. Flask kültürde 650 bin/ml en yüksek değere ulaşan hücre sayısı biyoreaktör kültüründe 4 milyon hücre/ml’ye kadar ulaşmaktadır. Hücrelerin durağan fazında proteaz artışı ciddi bir şekilde farkedilmektedir ve 5U/ml olarak en yüksek aktivite değerine ulaşmaktadır (Herrmann vd., 2006).
- T. thermophila* sekterom proteazlarının aktivitesinin E64 sistein proteazı ve İyodoasetat ile engellenmesi. Çalışmada sistein proteazların aktivitesinin dış ortamda çok fazla olduğu belirtilmiştir ve bu yüzden sistein proteazlarını inhibe edici kimyasallar kullanılmıştır. Biotin ve E64 sistein proteazı füzyon proteini olarak oluşturulmuştur. Lityum iodoasetat ise güçlü bir alkali edici ajan olarak proteaz aktivitesinin azaltılması amacıyla kullanılmıştır. Grafiğe bakıldığında kimyasal eklenmemiş kör hesaplanmasında proteaz aktivitesi %100 oranındayken, iodoasetat eklenmesi ile aktivite %10’ların altına düşmüştür, bu aktivite E64-biyotin füzyonu eklendiğinde ise daha çok düşüş göstermiştir (Herrmann vd., 2006). Araştırmaya göre E64 sistein proteaz inhibitörünün *T. thermophila*’da dış ortamda proteaz aktivitesini azalttığından dış ortama salgılanması hedeflenen proteinler için kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

T. thermophila’nın sekretomunda bulunan proteazların büyük çoğunluğunun yüksek aktivite gösteren sistein proteazlardan oluştuğu bilinmektedir (Madinger, vd., 2010). *T. thermophila* CU438 ırkı hücrelerinin flask ve biyoreaktör kültürizasyonunda ortak özellik olarak hücrelerin logaritmik fazdan durağan fazına geçişinde proteaz aktivitesinde ciddi artış görülmektedir. Proteaz aktivite değerleri flask kültürde en çok 1U/ml’ye çıkarken, biyoreaktör kültüründe ise 5U/ml’ye kadar erişmektedir. Bu

değerlerin hücrelerin durağan faz evrelerinde maksimize olduğu görülmektedir (Şekil 4.3-A ve B., Herrmann vd., 2006).

Hücre sekteromunda sistein proteazların aktivitesinin durdurulması, iki farklı (yüksek alkali edici lityum iyodoasetat ve sistein proteaz spesifik inhibitör E64 ile biyotininin birleştirilmiş yapısı) proteaz inhibitörü ile test edilmiştir (Herrmann vd., 2006). İnhibitör kullanılmayan kontrolde (körde) %100 oranındaki proteaz aktivitesi, E64 sistein proteaz inhibitörü kullanılarak %10 civarına düşürülmüştür (Şekil 4.3-C). Bu araştırma sonucunda hücre dışına salgılanarak protein üretiminin, E64'ün varlığında gerçekleştirilebileceği ortaya konulmuştur. Ancak, İİU'ya uyum çerçevesinde E64'ün ortama eklenmesi kabul edilemeyeceği gibi kullanımı endüstriyel ek maliyetler oluşturacaktır. Lityum iodoasetatın ise dış ortam proteaz aktivitesini çok fazla durdurmasına rağmen toksik olmasından dolayı endüstriyel kullanımı söz konusu değildir. Alternatif olarak; *T. thermophila*'da rekombinant proteinlerin (hGH ve diğer teropötikler gibi) üretimi için verimli bir şekilde alternatif ekspresyon konakçısı olarak kullanımı, raporlanmış sistein proteazların makroçekirdek genomundan susturulmasıyla mümkün olacağı hipotezlenmiştir (Herrmann vd., 2006).

Zengin besiyerinde flaskta büyütülen *T. thermophila* CU428 ırkının sekretomunda proteaz enzimleri yaklaşık %50-70 arasında, açlık besiyerinde ise %30-35 arasındadır (Madinger vd., 2010). Bu hücrenin zengin besiyeri sekretomunda 158 farklı protein bulunurken, açlık besiyerinde 28 protein bulunmaktadır. Bu tez araştırmasında hGH üretimi için ısı şoku indüklemesi NEFF besiyeri ortamında gerçekleştirilmiştir. Literatüre göre açlık tamponunda daha az proteaz salgılandığı için ısı şoku indüklemesinin açlık tamponunda yapılmasıyla hGH'nin daha az degrade olacağı öngörülmüştür. Alternatif olarak ise dış ortama salgılanması hedeflenen hGH gibi rekombinant proteinler için *T. thermophila* CU428 ırkı yerine, mutant *T. thermophila* SB281 hücresinin tercih edilmesi sekretomunda daha az proteaz ile çok fazla taşıyıcı protein bulundurmasından dolayı tercih edilebilir (Şekil 4.4., Madinger vd., 2010). Öte yandan, hGH proteinini keserek parçalayan spesifik proteazların amino asit dizisi geri genetik yöntemlerle (2B proteaz zimogram ve aktivite içeren protein bantların LC/MS ile amino asit dizilerinin belirlenmesi) tespit edilerek kimliklendirilen proteaz kodlayıcı genlerin makroçekirdek genomunda susturulması ile verimliliğin artışı sağlayacak mutant suşlar geliştirilebilir.



Şekil 4.5. *T. thermophila* ırklarının sekterom proteinleri analizi. SB210, SB281 ve CU428 hücre hatlarının tokluk ve açlık ortamında sekterom proteinleri incelenmiştir ve proteinler fonksiyonel gruplar içerisinde sınıflandırılmıştır. Tez çalışmasında proteazlar üzerinde durulduğundan şekil proteazlar üzerinden incelenmiştir. SB210 ırkı tokluk sekretomunda % 25'ten az oranda proteaz bulunurken, açlıkta bu oran % 60-70 oranına ulaşmaktadır. SB281 ırkında ise tokluk ortamında sekretomda % 35'lere yakın proteaz enzimi bulunurken, açlıkta bu oran % 15 civarına düşmektedir. Ayrıca bu ırkta dış ortama salgılatılması hedeflenen proteinlerin salınımında taşıma görevi yapan proteinlerin oranı oldukça yüksektir ve dış ortama hedef proteinin salgılatılması için oldukça elverişli bir ırk olduğu görülmektedir. Tez çalışmasında kullanılan CU428 hücre hattında ise toklukta % 60 civarında proteaz yoğunluğu bulunurken, açlık ortamında sekretomda bu oran % 30 civarına kadar düşmektedir (Madinger, vd., 2010).

Tez çalışmasının özgün değerleri; ATG kodonu içermeyen İİU uyumlu mutant IRES elementli HSP70.2 ısı şoku promotorunun kullanılması, sinyal kesimi sonrası PLA36 gibi ek peptid dizisi oluşturmeyen PLA22 sinyal dizisinin kullanılarak dış ortama protein salgılatılması, hGH proteininin *T. thermophila* proteazları tarafından parçalandığının in vitro proteaz aktivite testi ile teyit edilmesi, olarak sıralanabilir.

Tez çalışmasında hGH'ın *T. thermophila* organizmasında rekombinant üretimi için gerekli vektörlerin geliştirilmesi, testi ve üretim verimliliğini düşüren problemlerin tayin edilmesine yardımcı olmuştur. *T. thermophila*'nın alternatif bir üretim konakçısı olarak hGH'ın üretiminde kullanılabilirliği böylelikle tanımlanmış ve üretim altyapısının İİU'ya uyumlu olarak iyileştirilmesi sağlanmıştır.

4.3. Öneriler

T. thermophila'da rekombinant protein üretiminde, tokluk şartları sekretomunda daha az oranda proteaz ve daha çok oranda salgılatmada görevli taşıyıcı protein bulunduran *T. thermophila* SB281 ırkının tercih edilmesi gerektiği ortaya çıkmıştır (Madinger, vd., 2010). Alternatif olarak hGH veya üretilmek istenilen terapötikler substrat olarak kullanılarak, bu terapötik proteinleri kesen *T. thermophila* SB210 sekretomunda bulunan proteazlar geri genetik yöntemlerle belirlenerek, o proteaz geninin genomda susturulması ile üretim verimliliği yüksek ırklar geliştirilebilir önerisi, bu tez çalışmasının ana çıktısıdır.



KAYNAKÇA

- Alam, K. S. M., Fujikawa, T., Yoshizato, H., Tanaka, M., & Nakashima, K. (2000). Synthesis and purification of a deleted human growth hormone, hGH (Δ 135- 146): Sensitivity to plasmin cleavage and in vitro and in vivo bioactivities. *Journal of Biotechnology*, 78(1), 49–59.
- Aldag, I., Bockau, U., Rossdorf, J., Laarmann, S., Raaben, W., Herrmann, L., Hartmann, M. W. W. (2011). Expression, secretion and surface display of a human alkaline phosphatase by the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *BMC Biotechnology*, 11(1), 11.
- Arslanyolu, M., Üstüntanır, A. F. (2018). *Tetrahymena Thermophila* Yapay Kromozomu 1 (TtAC1) ve Rekombinant Protein Üretiminde Kullanımı. Türkiye, Türk Patent ve Marka Kurumu Başvuru 2018/13880.
- Arslanyolu, M., Üstüntanır, A. F., ve Çalışeki, M., (2019). *Tetrahymena Thermophila* Yapay Kromozomu 2 (TtAC2) ve Rekombinant Protein Üretiminde Kullanımı. Türkiye, Türk Patent ve Marka Kurumu Başvuru 2019/04291.
- Ascacio-Martínez, J., & Barrera-Saldaña, H. (2012). Genetic Engineering and Biotechnology of Growth Hormones. *Genetic Engineering- Basics, New Applications and Responsibilities*, (2), 173–196.
- Ayça Fulya Üstüntanır ve Muhittin Arslanyolu (2015). *Tetrahymena thermophila* Makroçekirdek Yapay Kromozom Vektör Yapımı ve Biyolojik Muhafazasının Tanımlanması. *Anadolu Üniversitesi BAP* 1208F131.
- Ayyar, V. S. (2011). History of Growth Hormone Therapy. *Indian Journal of Pediatrics*, 15(7), 162–165.
- Barchetta, S., Terza, A. La, Ballarini, P., Pucciarelli, S. ve Miceli, C. (2008). Combination of Two Regulatory Elements in the *Tetrahymena thermophila* HSP70-1 Gene Controls Heat Shock Activation, *Eukaryot Cell.*, 7(2), 379–386.
- Bustamante, J. J., Gonzalez, L., Carroll, C. A., Weintraub, S. T., Aguilar, R. M., Muñoz, J., Haro, L. S. (2009). O-Glycosylated 24 kDa human growth hormone has a mucin-like biantennary disialylated tetrasaccharide attached at Thr-60. *Proteomics*, 9(13), 3474–3488.
- Calow, J., Behrens, A. J., Mader, S., Bockau, U., Struwe, W. B., Harvey, D. J., Crispin, M. (2016). Antibody production using a ciliate generates unusual antibody glycoforms displaying enhanced cell-killing activity. *MAbs*, 8(8), 1498–1511.
- Cassidy-hanley, D., Bowen, J., Lee, J. H., Cole, E., Verplank, L. A., Gaertip, J., Bruns, P. J. (1997). Germline and Somatic Transformation of Mating. *Genetics Society of America*, 146, 135–147.

- Cázares-Delgadillo, J., Ganem-Rondero, A., & Kalia, Y. N. (2011). Human growth hormone: New delivery systems, alternative routes of administration, and their pharmacological relevance. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78(2), 278–288.
- Chalker, D. L. (2012). Transformation and Strain Engineering of *Tetrahymena*. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 109).
- Chen X, Zaro JL, Shen WC. (2013). Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev*, 65(10):1357–1369.
- Chung, J.-Y., Sunwoo, J.-S., Kim, M.-W., & Kim, M. (2015). The neuroprotective effects of human growth hormone as a potential treatment for amyotrophic lateral sclerosis. *Neural Regeneration Research*, 10(8), 1201.
- Cowan, G. J. M., Bockau, U., Eleni-Muus, J., Aldag, I., Samuel, K., Creasey, A. M., Cavanagh, D. R. (2014). A novel malaria vaccine candidate antigen expressed in *Tetrahymena thermophila*. *PLoS ONE*, 9(1).
- Cumming, R. C., Andon, N. L., Haynes, P. A., Park, M., Fischer, W. H., & Schubert, D. (2004). Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 279(21), 21749–21758.
- Çalik, P., Orman, M. A., Çelik, E., Halloran, S. M., Çalik, G., & Özdamar, T. H. (2008). Expression system for synthesis and purification of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris* and structural analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnology Progress*, 24(1), 221–226.
- Dattani, M. ve Preece, M. (2004). Growth hormone deficiency and related disorders: insights into causation, diagnosis, and treatment. *The Lancet*, 363(9425), 1977–1987.
- Dereli, S. (2017) İnsan Büyüme Hormonu Salgılatma Sinyal Dizisinin *Tetrahymena thermophila* Tarafından Rekombinant Protein Üretiminde Kullanımı. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, 25051310052
- Dienys, G., Sereikaite, J., Luksa, V., Jarutiene, O., Mistiniene, E., & Bumelis, V. A. (2000). Dimerization of human growth hormone in the presence of metal ions. *Bioconjugate Chemistry*, 11(5), 646–651.
- Dixon JS, Li CH. Retention of the biological potency of human pituitary growth hormone after reduction and carbamidomethylation. *Science* 1966; 154: 785–786.
- Eisen, J. A., Coyne, R. S., Wu, M., Wu, D., Thiagarajan, M., Wortman, J. R., Orias, E. (2006). Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote. *PLoS Biology*, 4(9), 1620–1642.
- Feng, L., Miu, W. (2009). *Tetrahymena* transgenic carrier containing HSP70 promoter, GFP, preparation method and use thereof. Patent Çin, CN101586119A.

- Gaertig, J., Gao, Y., Tishgarten, T., Clark, T. G. ve Dickerson, H. W. (1999). Surface display of a parasite antigen in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Nat Biotechnol*, 17(5), 462-465.
- Gouveia, B. G., Rijo, P., Gonçalo, T. S., & Reis, C. P. (2015). Good manufacturing practices for medicinal products for human use. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 7(2), 87-96.
- Graham, M. R., Evans, P., Davies, B., & Baker, J. S. (2008). Arterial pulse wave velocity, inflammatory markers, pathological GH and IGF states, cardiovascular and cerebrovascular disease. *Vascular Health and Risk Management*, 4(6), 1361-1371.
- Grigorian, A. L. (2005). Extraordinarily stable disulfide-linked homodimer of human growth hormone. *Protein Science*, 14(4), 902-913.
- Hamilton, E. P., Kapusta, A., Huvos, P. E., Bidwell, S. L., Zafar, N., Tang, H., Coyne, R. S. (2016). Structure of the germline genome of *Tetrahymena thermophila* and relationship to the massively rearranged somatic genome. *ELife*, 5, 1-46.
- Haro, L. S., Lewis, U. J., Garcia, M., Bustamante, J., Martinez, A. O., & Ling, N. C. (1996). Glycosylated Human Growth Hormone (hGH): A Novel 24 kDa hGH-N Variant pituitary gland and from the hGH-V gene by the placenta (1-5). GH belongs to a gene family are structurally similar (1-5, 14). Numerous GHs originating from pituitary extracts an. 556, 549-556.
- Herrmann, L., Erkelenz, M., Aldag, I., Tiedtke, A., & Hartmann, M. W. W. (2006). Biochemical and molecular characterisation of *Tetrahymena thermophila* extracellular cysteine proteases. *BMC Microbiology*, 6, 1-9.
- Ishikawa, M., Hiroi, N., Kamioka, T., Tanaka, T., Tachibana, T., Ishikawa, H., & Miyachi, Y. (2001). Metabolic effects of 20kDa and 22kDa human growth hormones on adult male spontaneous dwarf rats. *European Journal of Endocrinology*, 145(6), 791-797.
- Iwamoto, M., Mori, C., Hiraoka, Y., & Haraguchi, T. (2014). Puromycin resistance gene as an effective selection marker for ciliate *Tetrahymena*. *Gene*, 534(2), 249-255.
- Jacobs, M. E., DeSouza, L. V., Samaranayake, H., Pearlman, R. E., Siu, K. W. M., & Klobutcher, L. A. (2006). The *Tetrahymena thermophila* Phagosome Proteome. *Eukaryotic Cell*, 5(12), 1990-2000.
- Kim, M. J., Park, H. S., Seo, K. H., Yang, H. J., Kim, S. K., & Choi, J. H. (2013). Complete Solubilization and Purification of Recombinant Human Growth Hormone Produced in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 8(2).
- Klein, J. S., Jiang, S., Galimidi, R. P., Keeffe, J. R., Bjorkman, P. J., & Regan, L. (2014). Design and characterization of structured protein linkers with differing flexibilities. *Protein Engineering, Design and Selection*, 27(10), 325-330.

- Komar, A. A., & Hatzoglou, M. (2011). Cellular IRES-mediated translation. *Cell Cycle*, 10(2), 229–240.
- Laurence, J., Grimison, B. ve Gonenne, A. (1992). Effect of recombinant human growth hormone on acute and chronic human immunodeficiency virus infection in vitro. *Blood*, 79(2), 467-472.
- Laureto, P. De, S., T., G., T., & A., F. (1995). Probing the structure of human growth hormone by limited proteolysis. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 45(2), 200–208.
- Lewis UJ, Lewis LJ, Salem MAM, Staten NR, Galosy SS, Krivi GG (1991). A recombinant-DNA-derived modification of human growth hormone (hGH_191) with enhanced diabetogenic activity. *Mol Cell Endocrinol* 78: 45-54.
- Lewis UJ, Sinha YN, Haro LS. (1994). Variant forms and fragments of human growth hormone in serum. *Acta Paediatr (Suppl 399)*:29–31.
- Lewis UJ, Sinha YN, Lewis GP (2000). Structure and properties of members of the hGH family: a review. *Endocr. J.*; 47 Suppl: S1–S8.
- Lopez-Guajardo CC, Armstrong LS, Jordan L, Staten NR, Krivi GG, Martinez AO, Haro LS. (1998). Generation, characterization and utilization of anti-human growth hormone 1-43, (hGH1- 43), monoclonal antibodies in an ELISA. *J Immunol Methods* 215:179–185.
- Lupu, F., Terwilliger, J. D., Lee, K., Segre, G. V., & Efstratiadis, A. (2001). Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. *Developmental Biology*, 229(1), 141–162.
- Madinger, C. L., Collins, K., Fields, L. G., Taron, C. H., & Benner, J. S. (2010). Constitutive Secretion in *Tetrahymena thermophila*. *Eukaryotic Cell*, 9(5), 674–681.
- Magoulas, C., McGuinness, L., Balthasar, N., Carmignac, D. F., Sesay, A. K., Mathers, K. E., Robinson, I. C. A. F. (2000). A secreted fluorescent reporter targeted to pituitary growth hormone cells in transgenic mice. *Endocrinology*, 141(12), 4681–4689.
- Malone, C. D., Anderson, A. M., Motl, J. A., Rexer, C. H., & Chalker, D. L. (2005). Germ Line Transcripts Are Processed by a Dicer-Like Protein That Is Essential for Developmentally Programmed Genome Rearrangements of *Tetrahymena thermophila*. *Molecular and Cellular Biology*, 25(20), 9151–9164.
- Mehmet Çalıseki, Serkan Dereli ve Muhittin Arslanyolu (2018). Protein Terapötiği İnsan Büyüme Hormonu (hGH)'nun *Tetrahymena thermophila*'da Rekombinant Üretimi ve Karakterizasyonu. *Anadolu Üniversitesi BAP* 1502F092.
- Miyawaki A, Sawano A, Kogure T. (2003). Lighting up cells: Labeling proteins with fluorophores. *Nat. Cell Biol.* ;5(Suppl.): S1–S7.

- Mooney, J. T., Fredericks, D. P., Zhang, C., Christensen, T., Jespergaard, C., Schiødt, C. B., & Hearn, M. T. W. (2014). Purification of a recombinant human growth hormone by an integrated IMAC procedure. *Protein Expression and Purification*, 94, 85–94.
- Morano, K. A., Grant, C. M., & Moye-Rowley, W. S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(4), 1157–1195.
- Nguyen, M. T., Koo, B. K., Thi Vu, T. T., Song, J. A., Chong, S. H., Jeong, B., Choe, H. (2014). Prokaryotic soluble overexpression and purification of bioactive human growth hormone by fusion to thioredoxin, maltose binding protein, and protein disulfide isomerase. *PLoS ONE*, 9(3), 3–12.
- Nicoll, C. S., Mayer, G. L., & Russell, S. M. (1986). Structural features of prolactins and growth hormones that can be related to their biological properties. *Endocrine Reviews*, 7(2), 169–203.
- Pérez-Ibave, D. C., Rodríguez-Sánchez, I. P., Garza-Rodríguez, M. de L., & Barrera-Saldaña, H. A. (2014). Extrapituitary growth hormone synthesis in humans. *Growth Hormone and IGF Research*, 24(2–3), 47–53.
- Peterson, D. S., Gao, Y., Asokan, K. ve Gaertig, J. 2002. The circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* is expressed and localized to the cell surface in the free-living ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Mol Biochem Parasitol*, 122(2), 119-126.
- Polgreen, L. E., Thomas, W., Orchard, P. J., Whitley, C. B., Miller, B. S. (2014). Effect of recombinant human growth hormone on changes in height, bone mineral density, and body composition over 1–2years in children with Hurler or Hunter syndrome. *Molecular genetics and metabolism*, 111(2), 101-106.
- Reaven, G. M., Ling, N., Frigeri, L. G., Lewis, U. J., & Mondon, C. E. (1988). Amino-Terminal Peptide of Growth Hormone Enhances Insulin Action in Normal Rats. *Endocrinology*, 123(2), 827–833.
- Reh, C. S., ve Geffner, M. E. (2010). Somatotropin in the treatment of growth hormone deficiency and Turner syndrome in pediatric patients: A review. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*, 2(1), 111–122.
- Riia K. Junnila, John J. Kopchick Edison (2013). Significance of the disulphide bonds of human growth hormone. *Endokrynologia Polska*, Volume 64; Numer/Number 4/2013 ISSN 0423–104X
- Roy, J., Jain, N., Singh, G., Das, B., & Mallick, B. (2019). Small RNA proteome as disease biomarker: An incognito treasure of clinical utility. In *AGO-Driven Non-Coding RNAs* (Vol. 5).
- Ruehle, M. D., Orias, E., & Pearson, C. G. (2016). *Tetrahymena* as a unicellular model eukaryote: Genetic and genomic tools. *Genetics*, 203(2), 649–665.

- Saboury, A. A., Ghourchaei, H., Sanati, M. H., Atri, M. S., Rezaei-Tawirani, M., & Hakimelahi, G. H. (2007). Binding properties and structural changes of human growth hormone upon interaction with cobalt ion. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 89(3), 921–927.
- Saettone, Nabeel-Shah, Garg, Lambert, Pearlman, & Fillingham. (2019). Functional Proteomics of Nuclear Proteins in *Tetrahymena thermophila*: A Review. *Genes*, 10(5), 333.
- Saijoh, K., Wu, H. K., Takehara, K., Borgono, C. A., Obiezu, C. V., Micheal, I. P., Diamandis, E. P. (2006). Proteolytic processing of human growth hormone by multiple tissue kallikreins and regulation by the serine protease inhibitor Kazal-Type5 (SPINK5) protein. *Clinica Chimica Acta*, 377(1–2), 228–236.
- Salem M. A. M. (1998). Effects of the Amino-Terminal Portion of Human. *Endocrinology* 123(3).
- Salim, H. M. W., Ring, K. L., & Cavalcanti, A. R. O. (2008). Patterns of Codon Usage in two Ciliates that Reassign the Genetic Code: *Tetrahymena thermophila* and *Paramecium tetraurelia*. *Protist*, 159(2), 283–298.
- Shang, Y., Song, X., Bowen, J., Corstanje, R., Gao, Y., Gaertig, J., & Gorovsky, M. A. (2002). A robust inducible-repressible promoter greatly facilitates gene knockouts, conditional expression, and overexpression of homologous and heterologous genes in *Tetrahymena thermophila*. *PNAS*, 99(6).
- Singh, S. K., Cousens, L. P., Alvarez, D. ve Mahajan, P. B. 2012. "Determinants of immunogenic response to protein therapeutics", *Biologicals*, 40(5), 364-368.
- Sinha YN ve Jacobsen BP. (1994). Human growth hormone (hGH)- (44-191), a reportedly diabetogenic fragment of hGH, circulates in human blood: measurement by radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 78:1411–1418.
- Song, H., Jiang, J., Wang, X., & Zhang, J. (2017). High purity recombinant human growth hormone (rhGHhGH) expression in *Escherichia coli* under phoA promoter. *Bioengineered*, 8(2), 147–153.
- Spolaore, B., De Laureto, P. P., Zamboni, M., & Fontana, A. (2004). Limited proteolysis of human growth hormone at low pH: Isolation, characterization, and complementation of the two biologically relevant fragments 1-44 and 45-191. *Biochemistry*, 43(21), 6576–6586.
- Strobl, J.S. ve Thomas, M.J. (1994). Human growth hormone. *Pharmac. Rev.* 46: 1–34.
- Such-Sanmartín, G., Bosch, J., Segura, J., & Gutiérrez-Gallego, R. (2009). Generation of 5 and 17 kDa human growth hormone fragments through limited proteolysis. *Growth Factors*, 27(5), 255–264.

- Warner MD, Sinha YN, Peabody CA. (1993). Growth hormone and prolactin variants in normal subjects. Relative proportions in morning and afternoon samples. *HormMetab Res* 25:425–429.
- Weide, T., Herrmann, L., Bockau, U., Niebur, N., Aldag, I., Laroy, W., Contreras, R., Tiedtke, A. ve Hartmann, M. W. (2006). Secretion of functional human enzymes by *Tetrahymena thermophila*. *BMC Biotechnol*, 6, 19.
- Wroblewski, V. J., Masnyk, M., & Becker, G. W. (1991). Proteolytic cleavage of human growth hormone (hGH) by rat tissues in vitro: Influence on the kinetics of exogenously administered hGH. *Endocrinology*, 129(1), 465–474.
- Xanthopoulou, A. G., Anagnostopoulos, D., Vougas, K., Anagnostopoulos, A. K., Alexandridou, A., Spyrou, G., Tsangaris, G. T. (2010). A two-dimensional proteomic profile of *Tetrahymena thermophila* whole cell lysate. *In Vivo*, 24(4), 443–456.
- Xiong, J., Lu, X., Zhou, Z., Chang, Y., Yuan, D., Tian, M., Miao, W. (2012). Transcriptome analysis of the model protozoan, *Tetrahymena thermophila*, using deep RNA sequencing. *PLoS ONE*, 7(2), 1–13.
- Yaeger, P. C., Orias, E., Shaiu, W. L., Larson, D. D., & Blackburn, E. H. (1989). The replication advantage of a free linear rRNA gene is restored by somatic recombination in *Tetrahymena thermophila*. *Molecular and cellular biology*, 9(2), 452-460).
- Yao, M.-C., Yao, C.-H., Halasz, L. M., Fuller, P., Rexer, C. H., Wang, S. H., Chalker, D. L. (2007). Identification of novel chromatin-associated proteins involved in programmed genome rearrangements in *Tetrahymena*. *Journal of Cell Science*, 120(12), 1978–1989.
- Yilmaz, G., & Arslanyolu, M. (2015). Efficient Expression Of Codon-Adapted Affinity Tagged Super Folder Green Fluorescent Protein For Synchronous Protein Localization And Affinity Purification Studies in *Tetrahymena thermophila*. *BMC Biotechnology*, 15, 1–9.
- Yu, T., Barchetta, S., Pucciarelli, S., La Terza, A., & Miceli, C. (2012). A Novel Robust Heat-inducible Promoter for Heterologous Gene Expression in *Tetrahymena thermophila*. *Protist*, 163(2), 284–295.
- Zhang, J., Tian, M., Yan, G. X., Shodhan, A., & Miao, W. (2017). E2f11 is a meiosis-specific transcription factor in the protist *Tetrahymena thermophila*. *Cell Cycle*, 16(1), 123–135.

EKLER

EK-1. hGH İzofomları ve Literatür Bilgisi

İnsan büyüme hormonunun izofomlarının fonksiyonları, özellikleri ve patoloji durumları ile ilgili literatür bilgileri aşağıda verilmiştir (Tablo EK-1.1).

Tablo EK-1.1. İnsan büyüme hormonu izofomları fonksiyonları, özellikleri ve patoloji durumları

hGH-N izofomları	Fonksiyonları ve Özellikleri	Patoloji Durumları	Referanslar
22 kDa hGH (191 a.a., hipofiz ön lobe yaklaşık %90 üretim)	Doğum sonrası büyüme ve gelişim Kh., lipid, aa., nitrojen ve mineral metabolizması vd.	IGF-1 ile birlikte diabetik retinopatiye sebep olur. Yüksek dozu diyabetogonik aktiviteye sahiptir (20 kDa daha az).	Ishikawa vd., 2001, Ascacio-Martínez ve Barrera-Saldaña., 2012, D.C. Pérez-Ibave vd.,2014, S. Eshaq vd.,2017.
20 kDa hGH (176 a.a., hipofiz ön lobe yaklaşık %10 üretim)	İskelet dokuda in vitro fonksiyonları 22 kDa hGH ile aynı olduğu belirtilmiştir. Sağlık bireylerde 22 kDa hGH sentezini baskılar.	Akromegali ve anorexia nervosa hastalarında daha fazladır.	Ishikawa et al., 2001, Ascacio-Martínez ve Barrera-Saldaña., 2012.
24 kDa hGH (191 a.a. O-link glikolizasyon)	Daha yüksek afinite ile reseptöre bağlanmaktadır.	Bilinmiyor.	Bustamente vd., 2009, Haro vd., 1996.
5 kDa hGH (1-43 a.a. hGH peptid zinciri)	İnsülin benzeri etki, insülin ile birlikte glukoz oksidasyonu artışı, insülin aktivitesini ve üretimini arttırıcı özellikte olduğu belirtilmiştir.	Bilinmiyor.	Mondon vd., 1988, Salem vd., 1988, Lewis vd., 2000, Gerard Such-Sanmartin vd., 2008.
17 kDa hGH (43-191 a.a. hGH peptid zinciri)	Anti-insülin aktivitesi, diabetogonik özellik göstermektedir.	Retinal damarlarda hastalıklarda ciddi miktarda artışı gözlemlenmiştir.	Lewis vd., 2000, Bustamente vd., 2009.
45 kDa hGH (disülfid linkli 22 kDa hGH homodimeri)	Biyoaktivitesi 22 kDa hGH'a göre yarıya yarıya düşüktür.	Bilinmiyor.	Bustamente vd., 2010, Grigorian vd., 2004.

Tedavileri

Tablo EK-2.1. İnsan büyüme hormonunun izolasyonu, rekombinant üretimi ve ilaç olarak kullanımının tarihsel süreçleri (Vageesh S. Ayyar.,2011; Saenger., 2017).

1972	GH Biyokimyasal Yapısının Ortaya Çıkarılması
1979	İlk hGH Geninin Klonlanması
1981	İlk Rekombinant hGH Geliştirilmesi
1985	Büyüme Hormonu Terapisi Başlangıcı
1993	Kronik Böbrek Yetmezliğinde rhGH Kullanımı
1996	Yetişkin Büyüme Hormonu Eksikliği Tedavisi
1997	Turner Sendromunda rhGH Kullanımı
2000	Prader-Willi Sendromunda rhGH Kullanımı
2001	Gebelikte Bebek Gelişim Geriliği
2003	İdiyopatik Kısa Boylulukta rhGH Kullanımı

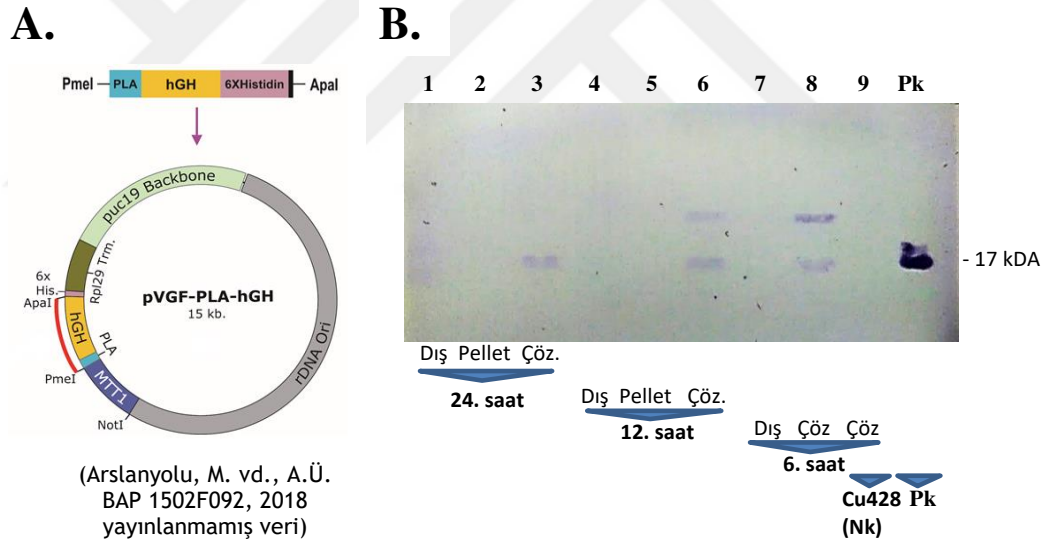
EK-2.2.).

Tablo EK-2.2. FDA onaylı büyüme hormonu ilaçlarının tedavilerde kullanım tablosu.

[illegible]

EK-3. pVGF Vektörü ile hGH Üretim Çalışmaları

Araştırma ekibinin önceki çalışmasında rekombinant insan büyüme hormonu üretimi gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada iki farklı genom aktarım yöntemi kullanılmıştır. Birinci olarak ısı şoku ile indüklenebilen HSP70 promotoruna sahip kaset ile 45 kopyalı sistem üzerinden genom entegrasyon çalışması yapılmıştır. İkincisinin de ise *T. thermophila* genomunda ekstrakromozomal olarak 8000 kopyaya kadar çıkabilen, MTT1 promotoruna sahip pVGF vektörü üzerinden rekombinant insan büyüme hormonu üretimi çalışmaları yapılmıştır. Kasetler hazırlanırken genin 5' ucunda (proteinin N-terminalinde olacak şekilde) iki farklı dışarı salgılatma dizisi kullanılmıştır. Bu dizilerinden bir hGH'ın kendi E.R. sinyal dizisidir, ikincisi ise *T. thermophila* 'da dışarı salgılatma dizisi olduğu deneysel olarak kanıtlanan 36 aminoasitten oluşan fosfolipaz A (PLA) sinyal dizisidir. Bu sinyal dizileri, yapılan tasarımlarda kullanılmıştır ve her iki genom aktarımı yöntemi için de kullanılabilirliği sınanmıştır.



Şekil EK-3.1. PLA36-hGH-pVGF vektörü ile hGH üretiminin Western Blot Analizi. A. pVGF-PLA36-hGH vektörü yapısı. Kadmiyumla ve diğer ağır metallerle tetiklenebilen MTT1 promotoru, 6xHis takılı hGH, Rpl29 terminasyon dizisi ile oluşturulmuş insan büyüme hormonu kaseti içerir. rDNA orijinde, rDNA lokusunda bulunan rDNA genlerini içeren 17S rDNA'de yapılan nokta mutasyonu ile paromomisine direnç sağlayarak seleksiyon sağlanır. Yapısında ayrıca E.coli konakçısında kopya sayısı artışını sağlayan orijin ve seleksiyon sağlanması için antibiyotik direnç geni bulunmaktadır. B. pVGF-PLA36-hGH vektör transforme edilmiş *Tetrahymena thermophila* hücrelerinin 6,12,24. saat kadmiyum ile tetiklenme sonucu elde edilen proteinin Ni-NTA saflaştırması sonrası Western Blot analizi. 1-3 arası kuyular 24. saat, 4-6 arası 12. saat, 7-8 6 saat, 9 ise CU428 ırkından vektör içermeyen negatif kontrol protein örneklerini ve Pk (10. kuyu) Ticari ürün 22 kDa hGH pozitif kontrol proteini (Humatrope 8 mg, Eli Lilly) içermektedir. %5 paketleme %20 ayrıştırma jeli 60V 15 dakika, sonrasında 80V'da koşurulmuştur. Blotlama 0.2 A sabit 25 V 'da gerçekleştirilmiştir. %5'lik süt tozu 1 saat oda sıcaklığından bloklaya gerçekleştirilmiştir. Birincil anti-GH-1/2 poliklonal antikor (sc-36787) 1:200 oranında

kullanılmış +4 derece gece boyu, ikincil antikor olarak 1:10000 HRP Konjuge Anti-Rabbit antikor (GeneScript, A00098) kullanılmış oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Görüntüleme TMB substratı ile 15 dakika inkübasyon sonucu gerçekleştirilmiştir (ThermoScientific, N301). 17kDa civarında koştuğu SDS-PAGE analizleriyle tespit edilen pozitif kontrole eş 24, 12, 6. saat çözünür proteinlerinde protein bandları görülmüştür ve ayrıca hGH dimeri boyutlarında olduğu düşünülen 24, 12, 6. saat çözünür protein bandları da görülmüştür (Çalışeki, M Dereli, S. ve Arslanyolu, M 1502F092 BAP, 2018; yayınlanmamış veri).

Bu sonuç *T. thermophila* 'da rekombinant insan büyüme hormonu üretilebileceği öngörüsünü desteklemiştir ancak üretilen ve tespit edilen bu proteinin ileri analizleri gerçekleştirilememesi nedeniyle bilimsel açıdan üretimin doğruluğu yüzde yüz olarak ispatlanamamıştır. Bunun nedeni, tüm protein tabanlı analizler için elde edilen saflaştırılmış büyüme hormonu miktarının çok az olduğundan, yetersiz kalmasıdır. Bu üretim verimindeki problemler, başlıca kullanılan vektörel sistemden kaynaklı olduğu düşünülmüştür. pVGF vektörünün ekibimiz tarafından kullanımı sırasında, zamana bağlı olarak vektörün genom içerisinde kopya sayısının düşmesi ile birlikte protein ekspresyon veriminin de düştüğü görülmüştür ve belirlenmiştir.

EK-4. Tez Kapsamında Çalışılan *T. thermophila* Irkının Seçimi

Tetrahymena thermophila rDNA orijin dizisini içeren 5'NTS allelleri farklılaşmıştır ve B tipi allel 42 bazlık delesyonundan dolayı C3 tipi allele kıyasla dezavantajlı durumdadır. Allellerin rDNA replikasyon üstünlüğü veya baskınlık sıralaması C3>B>C3 rmm1 veya C3 rmm4 şeklindedir (Yaeger vd., 1989). Bu yüzden tezde kullanılan TtAC2 vektörü C3 orijin taşıdığından çekinik B allele sahip vejetatif transformasyona uygun *T. thermophila* CU428 ve SB210 ırkları arasından CU428 hücre ırkı seçilerek çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

EK-5. *T. thermophila* Hücre Kültürizasyonu ve Besiyerlerinin Hazırlanması

T. thermophila hücre hatları cam tüp stoklarından 50 µl hücre kültürü alınarak NEFF/SPP besiyeri içeren Petri kaplarına veya Erlenlere aktarılır (Tablo 1.). Hazırlanan petri kaplarındaki hücre kültürleri nem çemberi oluşturulmuş kaplar içinde ve erlendeki hücre kültürleri ise 30°C' inkübatörde hücreler logaritmik faza ulaşmaya kadar (yaklaşık 2 gün) inkübe edilir.

Tablo EK-5.1. NEFF ve SPP besiyerleri hazırlığında kullanılan malzemeler ve kültürizasyon aşamasında besiyerine eklenen kimyasallar. NEFF besiyerine alternatif olarak proteaz pepton oranı artırılmış SPP besiyeri de kullanılabilir (Cassidy Hanley D vd., 1997). Belirli hacimlerde NEFF besiyeri hazırlandıktan sonra Erlenlere aktararak 121°C için 1 atm ve 21 dakika olacak şekilde otoklav edilerek besiyerinin sterilizasyonu sağlanır. Hücre kültürizasyonu aşamasında antibiyotikler ve tabloda verilen diğer kimyasallar besiyerine final konsantrasyonlarına uygun olacak şekilde eklenir.

Modifiye NEFF besiyeri içeriği	Süper Proteaz Pepton (SPP) besiyeri içeriği	Besiyerlerine eklenen kimyasalların son konsantrasyonları
%0,25 Proteaz Pepton	%2 Proteaz Pepton	250 µg/ml Pen/Step
%0,25 Maya Ekstraktı	%0,1 Maya Ekstraktı	0,25 µg/ml Amfoterisin
%0,5 Glukoz	%0,2 Glukoz	100 µg/ml Paramomisin
33,3 µM FeCl ₃	33 µM FeCl ₃	0,01 µg/ml CdCl ₂

T. thermophila hücrelerinin mikroskop altında canlılıkları ve besiyerindeki konsantrasyonu kontrol edilir ve logaritmik faza ulaşmış olmadıkları inkübasyonun 2. günü içerisinde değerlendirilir.

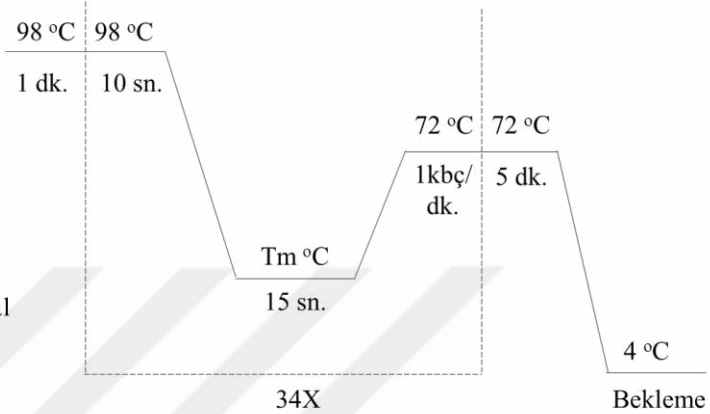
EK-6. Rekombinant DNA Teknolojisi Teknikleri

EK-6.1. Standart PZR ile Hedef DNA Dizisinin Üretimi

Tez çalışmasında hGH gen dizilerinin üretimi için gerçekleştirilen tüm DNA üretim aşamalarında PZR reaksiyonu için PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Takara, R010A) enzimi kullanılmıştır.

Standart PZR Reaksiyonu:

- PrimeSTAR tamponu : 5,00 µl
- PrimeSTAR dNTP : 1,25 µl
- Fprimer : 1,20 µl
- Rprimer : 1,25 µl
- Kalıp : 1,00 µl
- PrimeSTAR Pol. Enzimi : 0,25 µl
- dH₂O : 11,75 µl



Şekil EK-6.1. PrimeSTAR Polimeraz Enzimi için PCR Şartları

EK.6.2. Örtüşen PZR ile DNA Dizilerinin Birleştirilmesi

PZR ile üretilen gen dizilerinin birleştirilmesi için örtüşen PZR yöntemi kullanılmıştır. Temel olarak primer eklemekten 7 döngü verilerek 49 °C’de DNA dizilerinin birleştirilmesi sağlanır ve dizilerin dış primerlerinin eklenmesi ile standart PZR reaksiyonu şartlarında birleştirilmiş DNA dizilerinin miktarı arttırılır.

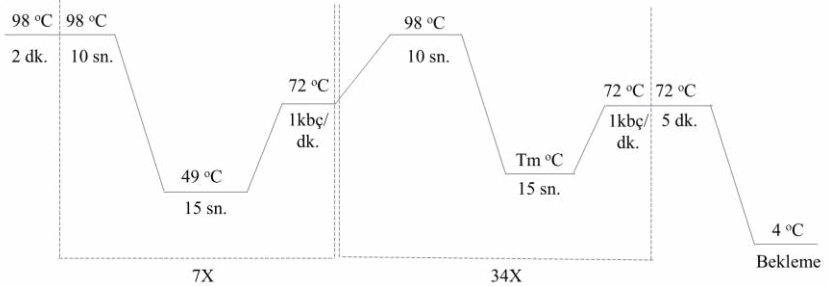
Örtüşen PZR Reaksiyonu (PrimeStar):

- PrimeSTAR HS Tamponu : 5,00 µl
- PrimeSTAR dNTP : 2,00 µl
- 1. Kalıp (50 – 100 ng) : 1,00 µl
- 2. Kalıp (50 – 100 ng) : 1,00 µl
- PrimeSTAR Pol. Enzim : 0,25 µl
- dH₂O : 10,75 µl

-----7 döngü primersiz-----

- Fprimer (1. kalıbın) : 2,5 µl
- Rprimer (2. kalıbın) : 2,5 µl

-----34 döngü primerli-----



Şekil EK-6.2. Örtüşen PZR Reaksiyonu ile DNA Dizilerinin Birleştirilmesi (PrimeStar)

EK-6.3. Restriksiyon Enzimi Kesim Reaksiyonları

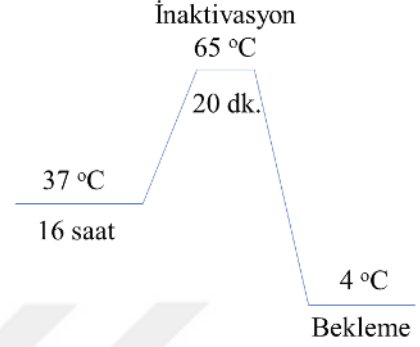
Elde edilen DNA miktarına göre 1 µg DNA için 1 ünite (1 µl) enzim kullanılarak restriksiyon enzimi kesim reaksiyonları kurulmuştur.

Restriksiyon Enzimi Kesim Reaksiyonu (Tekli Kesim):

- Enzim tamponu : 2,00 µl
- Kaynak (250-1000 ng) : 1,00 µl
- Restriksiyon enzimi : 1,00 µl
- dH₂O : 16,0 µl

PmeI-AscI Çiftli Restriksiyon Enzimi Kesim Reaksiyonu:

- 10X Tango Tamponu : 2,00 µl
- Kaynak (250-1000 ng) : 1,00 µl
- PmeI rest. enzimi : 1,00 µl
- AscI rest. enzimi : 1,00 µl
- dH₂O : 15,0 µl



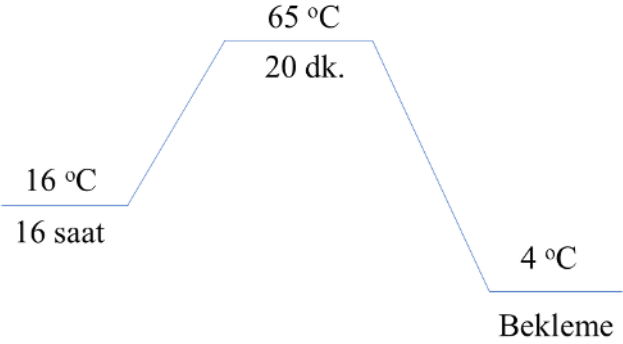
Şekil EK-6.3. Restriksiyon Kesim Reaksiyonları

EK-6.4. Ligasyon Reaksiyonları

PmeI-AscI kesimleri yapılarak yapışkan uçla hale getirilen hGH gen dizilerinin ve TtAC2 vektörünün birleştirilmesi amacıyla ligasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

Ligasyon Reaksiyonu:

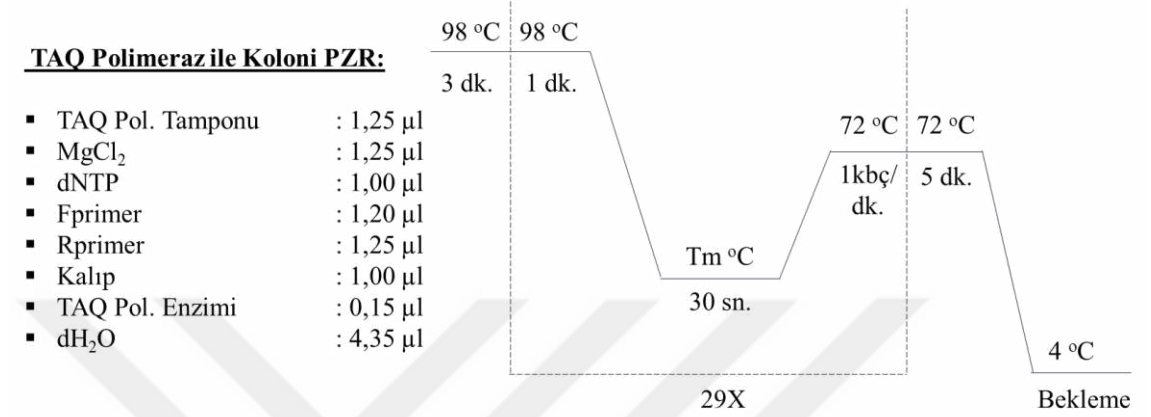
- İnsert : 1 µl
- Vektör : 1 µl
- T4 DNA Ligaz Tamponu : 2 µl
- T4 DNA Ligaz (NEB) : 1 µl
- dH₂O : 5 µl



Şekil EK-6.4. Ligasyon Reaksiyonu (NEB T4 DNA Ligaz)

EK-6.5. Koloni PZR Reaksiyonları

Vektöre klonlanan genin dış primerlerinin kullanılması ile pozitif *E.coli* transformantların seçimi için TAQ Polimeraz enzimi (Thermo Scientific, EP0402) kullanılarak PZR reaksiyonları kurulmuştur.



Şekil EK-6.5. TAQ Polimeraz ile Koloni PZR Reaksiyonu

EK-7. *E.coli* K lt rizasyonu, Isı Şoku ile Bakteriyel Transformasyonu ve Plasmid İzolasyonu

DH5alfa kompetent hücreleri -86  C stoktan çıkarılarak buz üzerinde 5 dakika boyunca     lmesi sağlanır. Sonrasında ligasyon ürünü kompetent hücrelere eklenir ve 30 dakika boyunca buz üzerinde inkübasyon gerçekleştirilir. Daha öncesinde 42  C'ye ayarlanmış su banyosunda 2 dakika boyunca hücreler ısı Őokuna maruz bırakılır ve 3 dakika da buz üzerinde bekletildikten sonra üzerlerine 500  l LB Broth eklenerek 37  C 50-60 dakika inkübe edilir. 8000 rpm – 3 dakika boyunca santrifüj edilerek süpernatant 100  l kalacak şekilde uzaklaştırılır. Kalan s pernatantla hücreler     lerek 1x amfilinli LB Agar tabağına yayılır ve 37 derecede 16 saat boyunca inkübe edilir.

Tablo EK-7.1. LB Broth Besiyeri İçeriği

Kimyasal	100 ml için:
Trypton	1,0 gr
Yeast Extract	0,5 gr
NaCl	0,5 gr

İnkübasyon sonrası hücreler konik tüplere aktarılır ve 5000 x g'de 10 dakika boyunca santrifüj edilir ardından süpernatant uzaklaştırılır. Plasmid izolasyonu kitleri kullanılarak (Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit K0502, Midiprep Kit K0481) elde edilen pozitif klonlardan plasmid izolasyonları gerçekleştirilir ve konsantrasyonları  l    r.

EK-8. Sentetik Kodon Optimize hGH Geni Analizi

Tez çalışması öncesinde araştırma ekibi tarafından hGH geni *T. thermophila* kodon sözlüğüne göre kodon optimize edilerek hGH sentetik gen bir Çin Firmasına olarak ürettirilmiştir (Çalışeki, M Dereli, S. ve Arslanyolu, M 1502F092 BAP, 2018; yayınlanmamış veri).

```
1  M A T G S R T S A G C W G S A T S R D N
   ATG GCT ACA GGC TCC CGG ACG TCC CTG CTC CTG GCT TTT GGC CTG CTC TGC CTG CCC TGG
   ATG GCT ACT GGT TCT AGA ACT TCT TTA TTA TTA GCT TTC GGT TTA TTA TGC TTA CCT TGG

61  L Q E G S A F P T I P L S R L F D N A M
   CTT CAA GAG GGC AGT GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA TCC AGG CTT TTT GAC AAC GCT ATG
   TTA CAA GAA GGT TCT GCT TTC CCT ACT ATT CCT TTA TCT AGA TTA TTC GAC AAC GCT ATG

121  L R A H R L H Q L A F D T V Q E F E E A
   CTC CGC GCC CAT CGT CTG CAC CAG CTG GCC TTT GAC ACC TAC CAG GAG TTT GAA GAA GCC
   TTA AGA GCT CAC AGA TTA CAC CAA TTA GCT TTC GAC ACT TAC CAA GAA TTC GAA GAA GCT

181  Y I P K E Q K Y S F L Q N P Q T S L C F
   TAT ATC CCA AAG GAA CAG AAG TAT TCA TTC CTG CAG AAC CCC CAG ACC TCC CTC TGT TTC
   TAC ATT CCT AAA GAA CAA AAA TAC TCT TTC TTA CAA AAC CCT CAA ACT TCT TTA TGC TTC

241  S E S I P T P S N R E E T Q Q K S N L E
   TCA GAG TCT ATT CCG ACA CCC TCC AAC AGG GAG GAA ACA CAA CAG AAA TCC AAC CTA GAG
   TCT GAA TCT ATT CCT ACT CCT TCT AAC AGA GAA GAA ACT CAA CAA AAA TCT AAC TTA GAA

301  L L R I S L L L I Q S W L E P V Q F L R
   CTG CTC CGC ATC TCC CTG CTG CTC ATC CAG TCG TGG CTG GAG CCC GTG CAG TTC CTC AGG
   TTA TTA AGA ATT TCT TTA TTA TTA ATT CAA TCT TGG TTA GAA CCT GTT CAA TTC TTA AGA

361  S V F A N S L V Y G A S D S N V Y D L L
   AGT GTC TTC GCC AAC AGC CTG GTG TAC GGC GCC TCT GAC AGC AAC GTC TAT GAC CTC CTA
   TCT GTT TTC GCT AAC TCT TTA GTT TAC GGT GCT TCT GAC TCT AAC GTT TAC GAC TTA TTA

421  K D L E E G I Q T L M G R L E D G S P R
   AAG GAC CTA GAG GAA GCC ATC CAA ACG CTG ATG GGG AGG CTG GAA GAT GGC AGC CCC CGG
   AAA GAC TTA GAA GAA GGT ATT CAA ACT TTA ATG GGT AGA TTA GAA GAC GGT TCT CCT AGA

481  T G Q I F K Q T Y S K F D T N S H N D D
   ACT GGC CAG ATC TTC AAG CAG ACC TAC AGC AAG TTC GAC ACA AAC TCA GAC AAC GAT GAC
   ACT GGT CAA ATT TTC AAA CAA ACT TAC TCT AAA TTC GAC ACT AAC TCT CAC AAC GAC GAC

541  A L L K N Y G L L Y C F R K D M D K V E
   GCA CTA CTC AAG AAC TAC GGG CTG CTC TAC TGC TTC AGG AAG GAC ATG GAC AAG GTC GAG
   GCT TTA TTA AAA AAC TAC GGT TTA TTA TAC TGC TTC AGA AAA GAC ATG GAC AAA GTT GAA

601  T F L R I V Q C R S V E G S C G F
   ACA TTC CTG CCC ATC GTG CAG TGC CGC TCT GTG GAG CGC AGC TCT CGC TTC
   ACT TTC TTA AGA ATT GTT CAA TGC AGA TCT GTT GAA GGT TCT TGC GGT TTC
```

Şekil EK-8.3. İnsan Büyüme Hormonu geninin *Tetrahymena thermophila* hücrelerine göre kodon optimizasyonu.: 1.Sıra, hGH aminoasitleri. 2.Sıra, İnsan büyüme hormonu geni kodon dizileri, CAA23779 3.Sıra- (Altı Çizili Kısım) İnsan büyüme hormon geninin *Tetrahymena thermophila* uyumlu kodon dizisi. Kırmızı olan bazlar değişiklik yapılmış bazlardır, değişiklik yapılmış kodon sayısı 149'dur (%68). Bunların 143 tanesi 1.nükleotid, 4 tanesi 2.nükleotid, 43 tanesi ise 3.nükleotid değişikliği içermektedir (Çalışeki, M Dereli, S. ve Arslanyolu, M 1502F092 BAP, 2018; yayınlanmamış veri).

EK-9. 6xHis-sfGFP-Enterokinaz-GFP Gen Dizisi ve Primerleri

Tablo EK-9.1. 6xHis-sfGFP-Enterokinaz-GFP gen dizisi üretimi için kullanılan DNA primerleri

PRİMERLER			
6xHis-sfGFP-EK-hGH	FhisGFP	5' aaaGTTTAAACAAAATGCACCACCACCACCACCACCTCTAAAGGTGAAGAATTATTCACCTGG	3'
	RentrGFP	5' GAATAGTAGGGAACCTATCATCATCATCTTTGTATAATTCGTCCATACCG	3'
	FenthGH	5' CGAATTATACAAAGATGATGATGATAAGTTCCTACTATTCTTTATCTAG	3'
	HGH	5' aaaGGCGCGCCTCAGAAACCGCAAGAACCTTCAACAGATC	3'

PmeI-6xHis-GFP-Enterokinaz Kesim Tanıma Bölgesi-hGH-AscI

GTTTAAACAAAATGCACCACCACCACCACCACCTCTAAAGGTGAAGAATTATTCACCTGGTGTGTTCTTATT
TTAGTTGAATTAGACGGTGACGTTAACGGTCACAAATTCTCTGTTAGAGGTGAAGGTGAAGGTGACGCTAC
TAACGGTAAATTAACTTTAAAATTCATTTGCACTACTGGTAAATTACCTGTTTCCTTGGCCTACTTTAGTTA
CTACTTTAACTTACGGTGTTCAATGCCTCTCTAGATACCCTGACCACATGAAAAGACACGACTTCTTCAAA
TCTGCTATGCCGTGAAGGTTACGTTCAAGAAAGAACTATTTCTTTCAAAGACGACGGTACTTACAAAACCTAG
AGCTGAAGTTAAATTCGAAGGTGACACTTTAGTTAACAGAATTGAATTAAAAGGTATTGACTTCAAGAAG
ACGGTAACATTTTAGGTCACAAATTAGAATACAACCTCAACTCTCACAACGTTTACATTACTGCTGACAAA
CAAAAAACCGGTATTAAAGCTAACTTCAAAATTAGACACAACGTTGAAGACGGTTCTGTTCAATTAGCTGA
CCACTACCAACAAAACACTCCTATTGGTGACGGTCCTGTTTTATTACCTGACAACCACTACTTATCTACTC
AATCTGTTTTATCTAAAGACCCTAACGAAAAAAGAGACCACATGGTTTTATTAGAATTCGTTACTGCTGCT
GGTATTACTCACGGTATGGACGAATTATACAAAATGATGATGATGATAAGTTCCTACTATTCTTTATCTAG
ATTATTCGACAACGCTATGTTAAGAGCTCACAGATTACACCAATTAGCTTTCGACACTTACCAAGAATTCTG
AAGAAGCTTACATTCCTAAAGAACAAAAATACTCTTCTTACAAAACCTCAAACCTCTTTATGCTTCTCT
GAATCTATTCCTACTCCTTCTAACAGAGAAGAACTCAACAAAAATCTAACTTAGAATTATTAAGAATTTCT
TTTATTATTAATTCAATCTTGGTTAGAACCTGTTCAATTCCTAAGATCTGTTTTCGCTAACTCTTTAGTTT
ACGGTGCTTCTGACTCTAACGTTTACGACTTATTAAAAGACTTAGAAGAAGGTATTCAAACCTTTAATGGGT
AGATTAGAAGACGGTTCCTAGAACTGGTCAAATTTTCAAACAACTTACTCTAAATTCGACACTAACTC
TCACAACGACGACGCTTTATTAAAAAACTACGGTTTATTATACTGCTTCAGAAAAGACATGGACAAAGTTG
AAACTTTCTTAAGAATTGTTCAATGCAGATCTGTTGAAGGTTCTTGCGGTTTCTGAGGCGCGCC

Şekil EK-9.1. PmeI-6xHis-GFP-EK.-hGH-AscI (1342 bp)

EK-10. Takırsız hGH ve 6xHis-hGH Gen Dizileri ve Primerleri

Tablo EK-10.1. Takırsız hGH ve 6xHis-hGH gen dizileri üretimi için kullanılan DNA primerleri

PRİMERLER			
hGH	FhGHTakırsız	5' agctttGTTTAAACATGTTCCCTACTATTTCCTTTATCTAG	3'
	HGH	5' aaaGGCGCGCCTCAGAAACCGCAAGAACCTTCAACAGATC	3'
6xHis-hGH	FhishGH	5' agctttGTTTAAACATGCACCATCACCATCACCATTCCCTACTATTTCCTTTATCTAG	3'
	HGH	5' aaaGGCGCGCCTCAGAAACCGCAAGAACCTTCAACAGATC	3'

PmeI-hGH (takırsız)-AscI

GTTTAAACATGTTCCCTACTATTTCCTTTATCTAGATTATTTCGACAACGCTATGTTAAGAGCTCACAGATTACACCAATTAGCTTTTCGACACTTACCAAGAATTTCGAAGAAGCTTACATTCCCTAAAGAACAAAAATACTCTTTCTTACAAAACCCTCAAACCTCTTTATGCTTCTCTGAATCTATTCCCTACTCCTTCTAACAGAGAAGAACTCAACAAAAATCTAACTTAGAATTATTAAGAATTTCTTTATTATTAATTCAATCTTGGTTAGAACCTGTTCAAATCTTAAGATCTGTTTTTCGCTAACTCTTTAGTTTACGGTGCTTCTGACTCTAACGTTTACGACTTATTAAGACTTAGAAGAAGGTATTCAACTTTAATGGGTAGATTAGAAGACGGTTCTCCTAGAACTGGTCAAATTTCAAACAACTTACTCTAAATTCGACACTAACTCTCACAACGACGACGCTTTATTAAAAACTACGGTTTATTATACTGCTTCAGAAAAGACATGGACAAAGTTGAACTTTCTTAAGAATTGTTCAATGCAGATCTGTTGAAGGTTCTTGCGGTTTCTGAGGCGCGCC

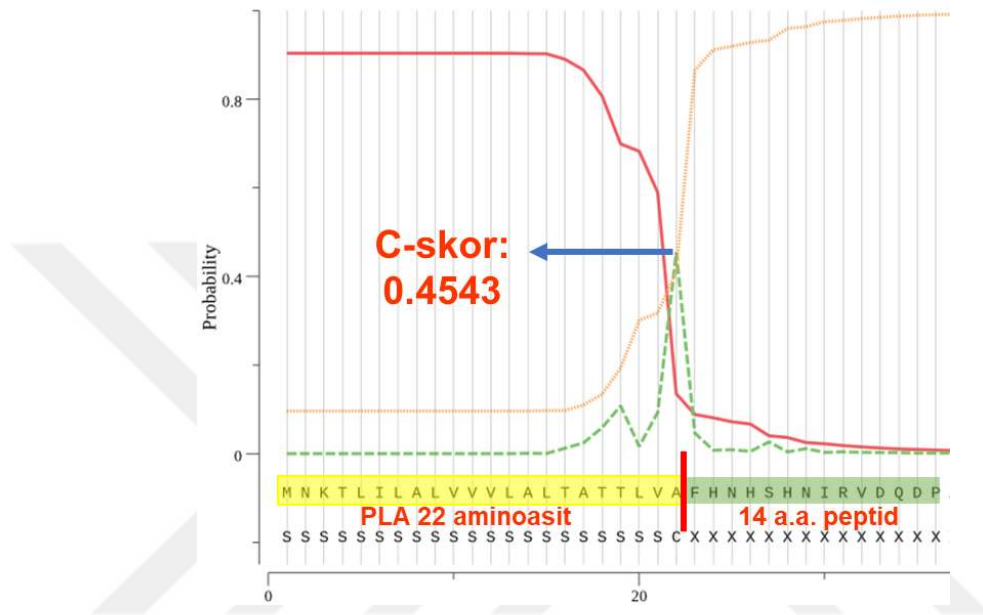
PmeI-6xHis-hGH (takırsız)-AscI

GTTTAAACATGCACCATCACCATCACCATTTCCTACTATTTCCTTTATCTAGATTATTTCGACAACGCTATGTTAAGAGCTCACAGATTACACCAATTAGCTTTTCGACACTTACCAAGAATTTCGAAGAAGCTTACATTCCCTAAAGAACAAAAATACTCTTTCTTACAAAACCCTCAAACCTCTTTATGCTTCTCTGAATCTATTCCCTACTCCTTCTAACAGAGAAGAACTCAACAAAAATCTAACTTAGAATTATTAAGAATTTCTTTATTATTAATTCAATCTTGGTTAGAACCTGTTCAATCTTAAGATCTGTTTTTCGCTAACTCTTTAGTTTACGGTGCTTCTGACTCTAACGTTTACGACTTATTAAGACTTAGAAGAAGGTATTCAACTTTAATGGGTAGATTAGAAGACGGTTCTCTAGAACTGGTCAAATTTTCAAACAACTTACTCTAAATTCGACACTAACTCTCACAACGACGACGCTTTATTAAAAACTACGGTTTATTATACTGCTTCAGAAAAGACATGGACAAAGTTGAACTTTCTTAAGAATTGTTCAATGCAGATCTGTTGAAGGTTCTTGCGGTTTCTGAGGCGCGCC

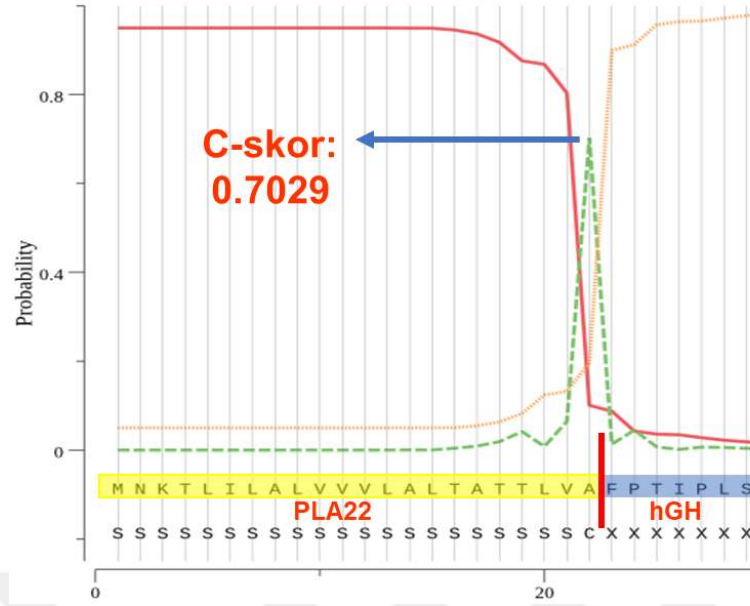
Şekil EK-10.1. Takırsız hGH (595 bç) ve 6xHis-hGH dizileri (613 bç)

EK-11. PLA22-hGH ve PLA23-6xHis-hGH Gen dizileri ve Primerleri

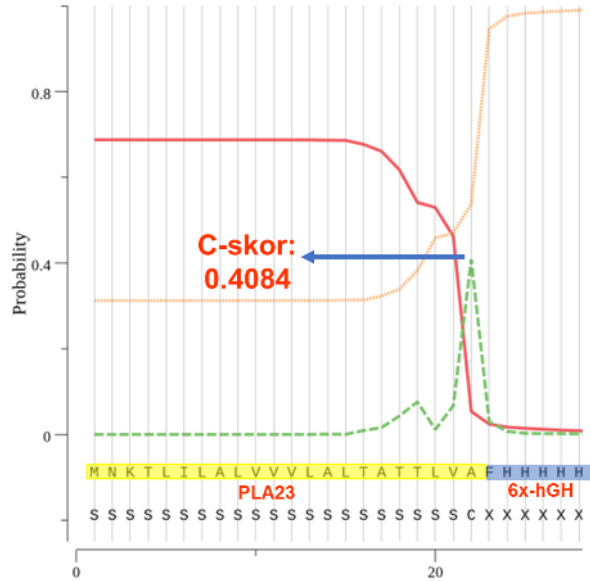
Literatürde sinyal dizisi olarak kullanılmakta olan Fosfolipaz A proteininin ilk 36 aminoasitlik bölgesi yerine, SignalIP5-0 sinyal peptid kesim tahmin programına göre proteaz kesiminin gerçekleştiği 22-23 aminoasit bölgesine kadar olan PLA1 gen bölgesinin kullanılması tercih edilmiştir.



Şekil EK-11.1. Signal IP-5.0 biyoinformatik programı ile PLA36 aminoasitin analizi. C skoru olarak 4.4543'ü vermiştir ve kesim bölgesini yüksek olasılıkla 22-23 aminoasit arasında olduğunu işaret etmiştir. Böylece 23. Fenilalanin ve sonrası 13 aminoasit dizisi E.R.'da kesim sonrası hedef proteinin N-ucuna takılı olarak kalmaktadır. C-skor sinyal peptid kesiminin olduğu bölgenin değerini vermektedir.



Şekil EK-11.2. Signal IP-5.0 biyoinformatik programı ile PLA22-hGH aminoasitin analizi. Şekil EK-11.1. deki Signal IP-5.0 programı verisine göre, PLA36'da 22-23. aminoasit arasında proteaz kesimi görülmektedir. hGH'ın takısız üretimi amaçlandığından PLA36'nın kesimi sonrası 14 aminoasitlik ek takımın oluşmaması için 22 aminoasitlik PLA dizisi (PLA22) kullanılmıştır. PLA22-hGH analizinde Signal IP-5.0 programı C skor olarak 0.7029'u vermiştir ve kesim bölgesinin 22-23 aminoasit arasında olduğunu işaret etmiştir. 23. aminoasit olan Fenilalanin hGH'ın kendi aminoasit dizisine dahildir ve kesim sonrası takılı hGH proteininde kalmaktadır. Bu tasarımla, hGH üretiminde sinyal kesim sonrası aminoasit kalıntısı beklenmemektedir. C-skor sinyal peptid kesiminin olduğu bölgenin değerini vermektedir.



Şekil EK-11.3. Signal IP-5.0 biyoinformatik programı ile PLA23-6xHis-hGH aminoasitin analizi. PLA23-6x-hGH aminoasit dizisi için 6x takılı tasarım olduğundan dolayı PLA23 kullanılmıştır ve Signal IP-5.0 incelemesinde C skor 0.4084'ü vermiştir ve kesim bölgesi 22-23. aminoasitleri arasında olduğunu işaret etmektedir. 23 aminoasit olan Fenilalanin kesim sonrası 6x takılı hGH füzyon proteininde kalmaktadır. C-skor sinyal peptid kesiminin olduğu bölgenin değerini vermektedir.

Tablo EK-10.1. PLA22-hGH ve PLA-6xHis-hGH gen dizileri üretimi için kullanılan DNA primerleri

PRİMERLER			
PLA22-hGH	FkoPLA	5' agctttGTTTAAACATGAACAAGACTTTAATTTTAGCTTTAG	3'
	HGHPLA	5' gataAAGGAATAGTAGGGAAAGCAACTAAAGTAGTAGCAGttaaagc	3'
	FplahGH	5' TTCCCTACTATTCCCTTTATCTAGAT	3'
	HGH	5' AAAGGCGCGCCTCAGAAACCGCAAGAACCTTCAACAGATC	3'
PLA23-6xHis-hGH	FkoPLA	5' agctttGTTTAAACATGAACAAGACTTTAATTTTAGCTTTAG	3'
	RkoPLA	5' GAAATGGTGATGGTGATGGTGAAAAGCAACTAAAGTAGTAGCAGT	3'
	FörthishGH	5' CACCATCACCATCACCATTTCCTACTATTCCCTTTATCTAGAT	3'
	HGH	5' AAAGGCGCGCCTCAGAAACCGCAAGAACCTTCAACAGATC	3'

PmeI-22 a.a. PLA22-hGH (takırsız)-Ascl

GTTTAAACATGAACAAGACTTTAATTTTAGCTTTAGTTGTTGTTTTAGCTTTAACTGCTACTACTTTAGTTGCCTTTCCCTACTATTCCCTTTATCTAGATTATTCGACAACGCTATGTTAAGAGCTCACAGATTACACCAATTAGCTTTTCGACACTTACCAAGAATTCGAAGAAGCTTACATTCCCTAAAGAACAAAAATACTCTTTCTTACAAAACCTCAAACCTCTTTATGCTTCTCTGAATCTATTCCCTACTCCTTCTAACAGAGAAGAACTCAACAAAAATCTAACTTAGAATTATTAAGAATTTCTTTATTATTAATTCAATCTTGGTTAGAACCTGTTCAATTCTTAAGATCTGTTTTTCGCTAACTCTTTAGTTTACGGTGCTTCTGACTCTAACGTTTACGACTTATTAAAAGACTTAGAAGAAGGTATTCAAACCTTTAATGGGTAGATTAGAAGACGGTTCTCCTAGAACTGGTCAAATTTTCAAACAACTTACTCTAAATTCGACACTAACTCTCACAACGACGACGCTTTATTAAAAAACTACGGTTTATTATACTGCTTCAGAAAAGACATGGACAAAGTTGAAACTTTCTTAAGAATTGTTCAATGCAGATCTGTTGAAGGTTCTTCCGGTTTCTGAAGCGCGCC

PmeI-23 a.a. PLA-6xHis-hGH (takırsız)-Ascl

GTTTAAACATGAACAAGACTTTAATTTTAGCTTTAGTTGTTGTTTTAGCTTTAACTGCTACTACTTTAGTTGCTTTTCCACCATCACCATCACCATTCCCTACTATTCCCTTTATCTAGATTATTCGACAACGCTATGTTAAGAGCTCACAGATTACACCAATTAGCTTTTCGACACTTACCAAGAATTCGAAGAAGCTTACATTCCCTAAAGAACAAAAATACTCTTTCTTACAAAACCTCAAACCTCTTTATGCTTCTCTGAATCTATTCCCTACTCCTTCTAACAGAGAAGAACTCAACAAAAATCTAACTTAGAATTATTAAGAATTTCTTTATTATTAATTCAATCTTGGTTAGAACCCTGTTCAATCTTAAAGATCTGTTTTTCGCTAACTCTTTAGTTTACGGTGCTTCTGACTCTAACGTTTACGACTTATTAAAAGACTTAGAAGAAGGTATTCAAACCTTTAATGGGTAGATTAGAAGACGGTTCTCCTAGAACTGGTCAAATTTTCAAACAACTTACTCTAAATTCGACACTAACTCTCACAACGACGACGCTTTATTAATAAACTACGGTTTATTATACTGCTTCAGAAAAGACATGGACAAAGTTGAAACTTTCTTAAGAATTGTTCAATGCAGATCTGTTGAAGGTTCTTGCAGTTTCTGAAGCGCGCC

Şekil EK-11.4. PLA22-hGH (658 bç) ve PLA-6xHis-hGH dizileri (679 bç)

EK-12. Takılı ve Takısız hGH Gen Dizileri İçeren Dizi Analizi Teyiti Yapılmış pTtAC-2 Vektörlerinin DNA dizisi

>pTtAC2-6xHis-GFP-EK. -hGH

TTGCACTTGTTCGCTCAGTTTACGCCATAATATGAAATGCTTTTCTTGTGTCTTACGGAATACCACCTTGCCACCTATCACCACAAC
AACTTTTTCCCGTTCCCTCCATCTCTTTTATATTTTTTTTCTCGATCGAGTTCAAGAGAAAAAAGAAAAAGCAAAAGAAAAAGG
AAAGCGCGCCTCGTTTCATAGAAAAAGAAATTTGCGGGAAAGGACTGTGTTATGACTTCCCTGACTAATGCCGTGTTCAAACGATACCT
GGCAGTGACTCCTAGCGCTCACCAGCTCTTAAACGAGAATTAAGAAAAAGTCGTCATCTTTCGATAAGTTTTTCCCACAGCAAAAGC
AATAGTAGAAAAACAATGGGAAACGTTGAATGAAGACAAAGCGTCGTGGTTTAAAGGAAATACGCTCACGTACATGCTAGGGAAC
AGGACCGTGACGCGGATCGGCCCTAGGCGGCCGCGATCCGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTG
AATGCTGTTTTTCCCACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAAC
CCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCA
ACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCC
CAACCCCAACCCCAACCCCAATAATTTCTTTGACATTGAGTAAAAGTTATTTATTGAATGTAATACCTTTGATTTTTAGTTATTATGA
ATGATTAAGATGTTAAATGTTTAAATTTCTATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCGCCTTATTTCCC
TTTTTTCGGCATTTTTGCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAG
TGGGTTACATCGAATCGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGGAAGACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAA
AGTTCTGCTATGTGGCGCGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTG
GTTGAGTACTCACCAGATACGAGGCCCAATAATTTCTTTGACATTGAGTAAAAGTTATTTATTGATGTAATACCTTTGATTTTTTGGT
TATTTATCAATGATTAAGATGTTAAATGTTTAAATTTCTATAATATTTTGAATAGTTTATATATGAATAAACATAGAAATTTAATTA
ATCTCAAAATGACTAAGCTAGTCAAGATTGAAGTTCTTATCAAAATATTTTAAATTAATAATTTTATTTTGTAGTTTATCAAAA
TTTTTATAAGTTTTTTCATTCAAAAATAAATTTTGAAGGGTTTTTGTATATAAAGATCAATAAATAAATGTTTTTCAAGAAATTA
ATGATGATTAATAAATTTTATCTAAAAATGAAGCTTCCGCGTTAAATTTAAATTTCTTATAAGCCTTAAATAATGCAATCTCATAA
ATTATAGAGATCAACCATTTTTACATATTTTATGAATTAATTTTGTAGTAAATTTTGCATCAATTTCCACTTAATTTTTGTGTGGGA
TTTTTATTTTTTACGCTTGAATTAAGTGGGATAAAGTTAAATCTAAGCGTAGTTTAGCGCATTTTTACACGCAAAAAAATTTTAT
TCAAAATCCACTTTAGCAAATTTATTCATTGGACAAGCGGTGGTAAAAAAGAGATTTATCTAATAAAGTGGTTTTTCTTGAAAAAGTCAA
CTTTTTAAATCAAATCTTTAGGTCTTTTGGTTTGGTCCCAAAAAAATATTGATAAGTGGGTGAAATTTTGAATGAAAAATTTGGTTA
AAATACAAAGATTTTTTCATTCAATTTTGCTTCTTAATAAAAGTCAACTTTTAGGAAAGAATATTAGCCTGCAGGCAGGACTTAAAAA
AATATATTGATAAGTGGGTGAAATTTTGAATGAAAAATTTTGTACAAAGATTTTTTCATTCAATTTTGTCTTAATAAAGT
CAACTTTTAGGAAAACAATATAGGTCTTTGACGGCTGGAGAAAAAAGTATTGATAAGTGGGTGAAATTTTGAATGAAAAATTTTGT
TAAAAATGCAAGATTTTTTCATTCAATTTTGCTTGTTTTAAATTTTCAATTCATTTTATAAAGCAAAATTTTACTTTAATTTTTACATTC
ACTTTTTCAATCAAAATCCACTTTTCGCAATTTTTCCATTGGAGCCCCAGGAAATCCATGCAAAATTTTCTATAAAAGTGGCATTGTTAA
TAAATTTCAACTTTTACGATGCTTATTAGCAAATCTATTGAGTTTATTTTAACTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTG
TATTTTATAAAATACTAAAATTTTTTCATTCAATTTTGCAATTAATAAAATTTTACTTTGAGAAAAATTTAGCTAAGCTCATTCTCGGTA
AAAAGCATAAATTTTAAAGCGTAACTTTTAACATATCATGCATAAAGACTTATATCAGCTTAAACACAACCTATTCAATTTTTTTACTAAC
AAATAACATAAAAATTTAACATTTTTAATATTGATTTATAATTTATTTATAAGCAGTTGATTGAAGCTTTCCAAATGAGAAAAATTTGC
CTCATAGCTGCTTTTGATGCTTATTAGCAAATCTATTGAGTTTATTTTAACTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTG
GATAAAATGTAAATCTCTAAGTATTTAATAACCCAGTGAGTGAAAAAGGAAAAAATTTACTAAAGTTAAACAAAATTAATTTAA
CAAATCAAAACATAAAAAATTTCTTAAAGAGGTTAAACAACCCAGCAGAAAGTAAAAAATAAAGGGAGATGAGATAAATCTAAGGAGAC
GGGCTGAATCTCAGCAGATCGTAGAAATTTCTACTCTCATGCTTACATAACCCGTTCCATGTTAAGTCGCTCACAAAAGATTTACGTAG
ATGATAATTTTGAATAGCATTAGCAGTTAAGGTCAAGCTTTTTCGCTCTTCCCGCTCACTTTTCCGAACTTAAATTTGATTTT
CGTTTATCATCACACTTAGACATTGCTTTCCAGCATGGATTCTGACTTAGAGGCCTTCAGTCATAATCCAACAGATGGTAGCTTCACG
GCATTGTCTTTTCAGACAACCGTATTACCATTATCTGATTAAAGTGTTCCCTCTCGTACTAAGTTAAATTTAGTGTCCGAACATCGTT
TCATCAGTAGGGTAAAACTAACCTGTCTCAGGACGGTCTAAGCCAGCTCAGGTTCCCTATTAGCGGGTGAACAATCCGACACCGTTG
TGAATTTGCTTACAGATGATAGGAAGAGCCGACATTGAGATGATGAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGT
TATCCCTGTGGTAACTTTTCTGACACCTCTAGCTTAAAACTTGTAAGTTAAAGGATCGATAGGCCACGCTTTCGCGGTTTGTATTCC
TACTGAAAATCAAAATCAATGATAGCTTTTACCCTTTTGTCTTACGTGAGATTCCGTTCTCACTGAGCTACACTTAGGACGCTGCGT
TATGGTTTAAACAGGCATTCCGCCCCAGACAACTCCCCCCTAACCATGCTTCGCAAAATCAGTCAATAAATGACCTTAATCTTAGA
ACTGGTTTGCACCACTTTTCTTACGAAATTAAGCAAAATGACTAGCTGGGTAGTGTTTTTACAGCATGATTGCTCTCCACCTAG
GCTATACCCACGTCGCATTTTCAAAAGTTAGACTAGAGTCAAGCTCAACAGGGTCTTCTTTCCCGCTGATTATTTCAAGCCCGTTT
CCTTAGCTGTGGGTTTCGCTAGATAGTAGATAGGGACAGTGGTAATCTCATTAAATCCATTATGCGCGTCACTAATTAGATGACGAGGC
ATTTGGCTACCTTACGAGTACTCCAAAATCAATATACCTTTTCGATACAAAATAGTTCCAGCGGCTCCAGTGTTCATCACTTC
ATCCGCTAGCTTCCCATTAAGGAGAGGTCCGACTATATCTTATGAGAGAAATACATCTTCCCGCAGCACTTATGCTGTGAACATGCA
TCCATATCAACAGAAGATCTGTTGACTTAGGACTTGGCTGCGTGGTTAGGACCATGTCCGTGAGCTTATTACCATAACCTTTTGAAGG
CCATCTCAAAAGTTTCCCGTGAAGCTTGGTACTGAACGGCTGTTGACCCCTTTCCCGCAATTTGACGGTCTTGCCCTTTAAACCGATGC
AATCTATTGGTTTAAAGACTAGCTACCAGGTGCATGCCTGATAACTTTTCCCTCCAAAGGTAATATTGCTATTTAGAGAGTCATAGT
TACTCCCGCTTTTACC CGCTTGGTTGAATTCGCTCACTTTGACATTAGAGCACTGGGCGAGAAATCACATTTGCTCATACCTGT
TGAGGCCGTGACAATGCTTTGTTTTTATTAACAGTCGGATTACCTTTGTCCGCTTCAGTTCTGAGTTGATCGTTAATTGTATAAAGA
CGGCCGAAACCTACCTTGCAAATTCATCGTTTCGCAAGTCTATCAGCATGTTGCCACACTAACAAACAGCTTGGATATCATTACAAAG
CCTTTATACCCGATCTCAGAGCCAATCCTTTATCCCGAAGTTACGGATCCAATTTGCCGACTTCCCTTATCTACATTTGTTCTATGGAC
CAGAGTTTGCACCACTTTGAGACCTGATGCGGTTATGGGTAGCAACTGGCGTGAAATTAATGCTCTCCCGAGATTTTCAAGGGTTCATCA
GGCGCGCAACTGACAGCTCTTAGGGTGAGCTGCTCTGCCATACATACAGCCGATATCTCTGGATAATCCAATTTTATGGCCATAGTAT
GTTAAAAAGAAAAGATAAATCTTCCAGTGACACCTGCTGACGTTTCCGGGTTTCTTTGCGTTTACCGCTATACCAAGCTTCAGCTTGA
GAATATTAACCTCATTTCCCTTTTGACAACGAAACGAATGCTTCTTGTATTGAAGGAGTTAACCTTATGCTCTTAGGATCGAGTAACC
ACTAATCGCTGCTCCATATAGGCTCACGCCAATACTTCTAGGCAACGATCACGCCCTCTACTCATCAAAGCCTCGCATTTGCTCTGA
TGGTTGAGTATCGGCAACACGCTTCAGCGCCATTCAATTTTCAAGGGCTAGTTTATTCGGCAGGTGAGTTGTTACACACTCCTTAGCGGA
TTCTAACTTTCCATAGCCACCGTCTCTGCTGTCGATGAAACCAACACCTTTTGTGGTATCTGATGAGCGTGCATTTGGGCGCCTTATCT
CAACGTTAGGTTCACTCCCTCATCGCCAGTTCTGCTTACCAAAAAATGGCCAACTCAAGAGCACTGCGTTCTTCCCGAGAGTTTCAATTA
AGTAAACTCCGCGGCTCTTACCAATTTAAAGTTTGAAGATAGGTGGAAGTTCTTAGGACTCCCGAGTCCCTCAATCATTCGCTTTACC
TAATAAAACTGCGTACTTGTCTTGTCTATCCTGAGAGAACTTTCGGAGGGAACAGCTACTAGATGGTTGATAGTCTTTCGCCCCCT
ACACTCAAAATTTGACGAACGATTTGACAGTCAGTATCGCTACAGGCTTCCACCAGAGTTTCCCGTGGCTTCACTTATTCAGCGGTAG
TTCACCTCTTTTCGGTCTTACAAATTAAGCTCTTCTCGAACCTTTCGCGGAGACTCAAGCGGGGTGATGCTGCTACCTTGGCGCTT
GGCACCTGTACTCACTTTCGTTTCGCGGACGGGTTTTTCCACCCTATCACTCGCTTAATTGATAGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAG

ACGGGTCAGTAGAAGCCATTTTGACAAAATCGCCCTTAGGCCCTCAGTCCAGTTTGAAGTTTCTCTTTTGATCTGCATTGCTGCCCG
ATCTCAGGTGACTCCTTCAATCTGAACCCATTTTGTCTTCTGACCGGTGTAGCAAGTTCTGTACCATTTCCTTACTCATCGACCTTTT
ACGTATCGACTCTGCAGTGATTAGTACTTCCCCCTTATCGCCCGTCCAGTTTATTGCTCTTCTACAGCTTCTCTCAACGGTTTCAA
GTCTTTTAGCCCTCTTTTCAAAGTTCTTTTTCATCTTTCTTCCGAGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCCCGTGTATATTTAGCTTTAGA
AGAAGTTTATCTCCCACTTAGGGCTGCAATTCCAAACAACCCGACTCTTTGAAATCTCCCTTACACCAGCCTTCTCTCCGACTACGG
GGTTGTCAACCTCTTTGACGTCCTGTCCCAAGGAACCTTATGAGAGGAGCTTAGTTTTCAGGTTGACCCCTTAGATTACAATTCGTGT
GTTGACCACTTCAGATTTTCACTTTGAGCTTTAGCCTGTTTCACTTCGCCATTACTGGGGCTATCCTAGTTAGTTTCTTTTCTCCGCTT
ACTGATATGCTTAAGTTTCAGCGGGTAACTCTTGTCTTGTTCAGGTGTAGTGAGAAAAATGTAATTTTCTATGAGTAGCATAGTGAGCA
TTCGCCTTGATGCCTGAACGAATGTTACATTACTGGAATGTGACTACTTCGTTCTGGCGGCGATTGCTCGACCACCCATCAGCTTTA
ACGAGAGAAGCTTTTACGGCTTCAATCGCATTAAGATGCGTGATTCTTTCCACACTGAAACAAACATGAAGGTTTTTACACCTCCA
CCACTTGGCTTCAAAGATCTGATGACTCGCGGTCTGCAATTTCGATTGCGTATCGCATTTCGCTGCGTCTTTCATCGTCACGGGAAC
CTAGATATCCACCGTTGAAAGTTTTCTTTTCGTTTTGCGATGTTATCCAGATCTTAGACATATGAAAAATTTTATTTCACACTAGGTGT
GACAATAAAACCTCGAAGAAAAACGAAGTTCTCTTCGAAAGTACATAAGTTAAGGTTTGTTAATTGTGTTAATGATCCATCTGCAGGT
TCACCTACAGATACCTTGTTACGACTTCTTGTGTTCCAAATGGTAGGGTTTACTTATTTTTCCGCACACATTGCTGTGCGAGTCCAGA
AGGTTTACCAGACCATTCGTTACTACAAGCGACGGGCGGTGTGTACAACCGCAGGGACATAATCAACGCAAGCTGATGACTTGCATT
TACTAGAAATTCCTCGTTTCAAGATCCACAATTCCAAAGAACTATCCCTAACACGACTGGTATTAATAAGATTTACCTTCCCTCAG
GACAGGAAATACTTTTTGCGCCAGTCATTGTAACGCGCGTGCAGGCGGAGCAGCTTAGGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCTTAAAC
TTCCATTGGCTTATTGCACAATAGTCCCTCTAAGAAGTACAACCTGTTATTTACAAGCAGACTAGTTAGCAGGTTAAGGTCTCGTTTCG
TTAACGGAATTAACGAGACAAATCACTCCACCAACTAAGAACGGCCATGCACCACCACCCAAAGAATCAAGAAAGAGCTCTCAATCTG
TCAATGCCGTAGAAACGTAAGTTTCCAGCTTGTCTATTTCTTCTGACTGGCTCCCTGAATTAGGATTGGCCAAATTTTCTCCCTGCTC
AATTCCTTTAAGTTTCAGACTTGGCTACCATACTTCCCCCAGAACCCAAAGACTTTGATTCTCATAACGGTGCCGACTGGACATTTAT
TCCAGCGGATCCCGAGTCGGTATAGTTTATAGTTAAGACTAGCAGCTATCTGATCGTCTTTGATCCCTTAACCTTTCGTTCTTGATTA
ATGAAAAACATCTTTGGCAATAGCTTTTCGCATTAGTTAGTCTCTTAATAAAATCCAAGAATTTTCACTCTGACTATTAATACTAATGCCC
CCAATGCTCCCTATTATCATTTACCAAAATCCAAGAACCAATTAAGTACTAGTCTTATTCATTTTCCAGTATTCCAGTATGATTGTTTCCGG
CTAAAACCTGCTTGGAAACACTCTAATTTTTTTCACAGTAAAATGTTTACTCCCTAAGTCGAACCAAGTGAAGGCCGATTTTAGTTTGCAA
ACGTATGTCCAGTTTTCACACGACGAATCGAAATGAACCTGAACAGAAAGTTCAACTACGAGCTTTTAACTGCAACAACCTTTAATATAC
GCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCATGACTTGGCTTCCAAATGTTTCTCCGCTAAGAGATTTACACTGTTCTCATT
CAATGCCGTAGAAACGTAAGTTTCCAGCTTGTCTATTTCTTCTGACTGGCTCCCTGAATTAGGATTGGCCAAATTTTCTCCCTGCTGC
CGAACCGTAGTTGTAGTAGCCGTTTCTCAGGCTCCTTCTCCGGAATCGAACCCCTAATTCCTCCGTTACCCGCTGACTGCCATGGTAGTCC
AATACACTACCATCGAGAGCTGATAGGGCAGAACTTAGATGATTTATCGAGGTAAACCTCGATCCGATCAGTTACTTTGATTTCATCT
CAATCACATTGCTGCGATTGGTCTAATATCTAATAAATACGTTCCGGTCGAGGACACGGAATTTAAGCATGTATTAGCCCAACAAT
TAGCTCGGTTATCCATGTAATCTTTAATTATCAAAATAAACTATAACTGTTTTAATGAGCCATTTCGCAATTTTCTCCCTGCTGATGTTAA
CTGGCACATGCATGGGTAAATATTTAAGACAAGCATATGTAAGTGGCAGGATCAACCAGGTTACTATCTCATAAAATTTGCTCGCTATT
TTCCGATTTGATCTTCCAAACAGCTTGTCTCATTTTTTGAATAGTGTTCAAAAGGTTGGTTTACAAAAGATTAAATAGTTTCATCGAGAA
CTGACGCGTTGTAATAGATCAGTACTCAGCTATATCGTTAGATTAAAGCTTTATACATAGATCCCGCATCGTTTTCGTTTACTATTAGTT
TCTTCTGATTGCTTAAATCTTGAAGTGGTTCGCAAGGCAATCTTACTGAAGCTCAATTCGACTATCTTTCGACTAGTCAACTTTGATCCGAGATGTTTAA
TAACATCTGCGATTTCACCGATTTTATAACAGTACTAGCGTGTTCGTTTATTGTAACAATATCTGCATAGATATCGATACAACAAGTG
TCACTGGGAAAAGTTTCTGCGAAGCTTTCGAGTGAATTTACAGCCTTCATGAAAATTTTCAGTCAGGCCATTTGCTCTAATACGAGCT
TAATCCAGAAAAACCTTCAACAGACCTTCAGCGGCCATCGACTAAAAGCCGAAGCCATAGAGAAAAACGCTGCTCAGTTAGCGCTTC
ATTATCGTTTCTTAACTGGTTGCCCAAAAGGAAATCTTACTGAAGCTCAATTCGAGCTGATATTTTATTGTTGATCCGAGATGTTTCC
CTTCTTAAATATGCATTTTTTACCCCTGATATTATTTTTTATTTTTTTTGGCCAAAGAATTTTTCTCAAAGTCAAAAAAGTTCGGAAGG
TTTACTATTTTTGTTTTTTTTTTTGGCCAAAAAAGACTCTGCCAAATTTTCAATCCCTTGTAATTTTTTCAGTTTTCATTATTTTT
TTCATTTTTTTCATTTTTTCGCTATTTTTTCACTAAGTCTAATTTAATTTAGAGCTGATTTTAAGCTAAATTTTTAAGTGGCTGCTGTA
CTTTTGAAGTGGCTCCACTCATTTTTTAAAGCGAGTCTGCTTCAATTTTATAGCTGAGTCCACTCATTTTTTATGCGCAATTTTATGTT
TCTGTGAGTCCACTTATTTTTGTTTAACTCCGCGAATATTAAGCGAGTCCGCTTAATTTTTTGTAGTGGCTCCACTCATTTTTTAAAGTGA
GTTCACTTAAATTTTTTAGTGACTCCACTCATTTTTATGCGAGTCCACTTAAATATTGAGCGAGTCCGCTCATTTTTTGTAAAGTGGC
TTCACACAAAATCTAAGCGCAATCTCAAAATTTCTCCTAAATCATTTTTTTCATTTTTTAAATTTTTTCTAAGTCTTTTTTCACTTTTT
GATTTTGTAGTCTTAAAGTCTTTTTTTTTCATTTTTTTCAGAAATTTTCTAAGTTTACTATTTTTGTTTTTTTGGTTCGCAAGATTTTCA
TAATGAGCAATTTTCAAAATCAATATTTTTTAAATCTAGATAAACTTTTTCTTTAAGTCTCTTTTATAACTCTTTATTTAATCAAAAA
AATTTATTTTGAATGTAATAATTTAATAAAATGAATAAATGAATGATAAAATGTTTTTACATATAAAAAATGATATACGATGCT
GTTAAATATGTTTTATGTTTTTTTTTATATATGTTTTATTTAATTTTACTAGCATTTAAATGATTAAAAAATATAAAATAAATTTTACTT
TCTATCATTTTTTAAATTTATAAATTTTCTCTAAGTCTTTTTTATCTCTTTTTTGTAGTTTTTCTCTAAGTCTTTTTTACACTTTTAAAT
TTTTTCTAAGTCTTTTTTCAACTCTCAAAAAAGTGATTTTTTACTATTTTTGTTTTTTTTTTTGGCCAAAAAATATCTAATGAGCA
ATTTTTCAAAATCAATATTTTTAATCTAGATAAACTTTTTCTTTAAGTTATCTTTATAAAGTCTTTATTTTACCATACCAAAAAAGT
TTTTTGTGAATGAAAAATTTAATAAAATGAATAAATGAATTTGATAAAATGTTTTTACATAAAAAAACTATTTACTCTTATTCCT
AAAATATTTTACTTTTTTATTTTATAAATGTTTTTACTTTAAATTTTTCTGACATTTAAATGTATAAAAAAGGAAATCTTCAATTTTTGTCC
ATTTTATAGTCTTTTTCTTTAAAAATTTAATAATTTCTTAAATTTACCTCTTAAAAAATATTTTATCATTTTAAAAATCATATATTTT
ATTAAAAAAGTGTTTTAAAGTGAAATGAATTAATTCATTTTAAATTTACTAGCATTAAGTAGTCAAATAGCTAAATATGTAATA
TTTTCTCATTTTTTGAACCTATTTTGCTTGAATTTGTAAATTTGTAAATTTTATCTAATTTAAACATTTTACACATAAAAAAC
AAATATTTTTTGTGTTTTTAAATACTATTTGCTAGTTTATTAGATTAAAAATAATTTCTATTTGCTACATTTTCCAGGTGAATTAAGCAGAA
TATAACATCTAATTTCTATCTACTCAAATTTAAATTTTAAACCAATTTTACTCAATTTTAAAGTTATTTTCGAAGGTAAATTTCAA
CAACATAGTGTGAAGGCTATAAACTAACAACAAAAAGCAAAAAACCGTACGAGCTATACGTGTACGATGACCCGGGTAAATTAAG
TGCAAGCAAAATCTTAAAAATATATAAATGAAAAATAAAATAAAACATTTCCCTAAATTTATATTTGTGAGATATTTTAGCTATG
TAATTTGCAAGCAATTTTGTGTTTACAAAACATGAATTAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
AAATATCTTAATTTCTATATTAATTTATTAATTTTACTTTTAAAGAAAAAGAGAAAACTTCTAAATCAAAATTAATTTAATAGAAGT
TTTTAATCTATCTAAATAGTAATAATGTTTATATTTGAATAATATAAATTTATCAATAAATAAATACATTTTACGAAATATTTATTT
TTATATTTCTGCTGATAATTAAGTGAAGTGTATAGCTAATTTTTTAAATTTTAAATATTTTTTAAAAAATTTTTTGGTGTGTTGTTG
ATAGATTAATTAATTTTGAAGTTTTAGTTTATAATCAATTTTTTTTAAATCTTTCTAATAATTAATAAAGATTTTTTAACTTTCTC
TTTTTCTATTTGCTATTAATAATCAATTTTATTCATAAAGGATATTTAATAATTTAGAAACATTTTACTGATTTCTAAAATTCCTTTG
TTATTAAAAAATACACTTCAAATTAAAAAAATAAAATTTCCAACAATTTCTATCAGAAATTTTTTTCGCTTTAAACAGCTAAAAAGAA
ATTTGATCAAAAAATAAATCAATTAATTTCAAAAAACAAAAAACACTCTCAACAAAAATCTTCAAAAAAGGACTCAACAAAAATA
ATTAAAAAAGTTTACAAAAATTTCTGGAAAAATAAAAGCTGAAGGAATGGTGAAGTTAAACAAAAATGACCCAGCACCCAGCACCTCT
AAAGGTGAAGAATTAATTCACGTTGTTGTTTCTATTTTAGTTGAATTAGACGGTGACGTTAACGGGTACAAAATTTCTCTGTTAGAGGTG
AAGGTGAAGGTGACGCTACTAACGGTAAATTAACCTTTAAATTCATTTGCACACTACTGGTAAATTAACCTGTTCTTGGCTACTTTAGT
TACTACTTTAACTTACGGTGTTCATGCTTCTCTAGATACCTGACCACATGAAAAGACACGACTTCTTCAATCTGCTATGCTGAA

TTAAGTACGTTTCAAGAAAGAACTATTCTTTCAAAGACGACGGTACTTACAAAACCTAGAGCTGAAGTTAAATTCGAAGGTGACACTTTAG
TTAACAGAAATTTGAATTTAAAGGTTATTGACTTCAAAGAAAGACGGTAAACATTTTAGTGCACAAATTAGAATACAACCTTCAACTTCAACTCAA
CGTTTACATTACTGCTGCACAAACAAAAACCGGTATAAAGCTTAACCTTCAAATTTAGACACAACCGTTGAAGACGGGTTCTGTTCTCAATTA
GCTGACCCACTTACCAACAAAACTCCTATTGGTGCAGGCTCCTGTTTATTACCTGACACCACTACTTATTCTACTCAATCTGTTTATTAT
CTAAAGACCCCTAACGAAAAAAGAGACCACATGGTTTTATTAGAAATTCGTTACTGCTGCTGGTATTACTCACGGTATGGACGAATTATA
CAAA**GATGATGATGAT**TAAGTTCCTCTACTATTCTTTTATCTAGATTATTCGACAACCGCTATGTTAAGAGCTCACAGATTACACCAATTA
GCTTTTCGACACTTACCAAGAACTTCGAAGAGCTTACATTCTAATCTCAAAGAAAAAATCTCTTTCTTCAAAAACCCCTCAAACCTCTTTTAT
GCTTCTCTGAATCTATTCTCTACTCCTTCTACAGAGAGAAGAACTCAACAAAAATCTAACTTGAATTAATTAAGAATTTCTTTATTTATTT
AATTCAATCTTGGTTAGAACCTGTTCAATTCTTAAGATCTGTTTTTCGCTAACTCTTTAGTTTACGGTGCTTCTGACTCTAACGTTTAC
GACTTATTAAAGACCTTAGAAGAAGGTATTCAAACCTTAAATGGGTAGATTAGAAGACGGTTCCTCTAGAACTGCTCAAAATTTTCAAAC
AAACTTACTCTAAATTCGACACTAACTCTCAACACGACGCGCTTTATTAATAAACTGCTGGTTTATTACTGCTTCAGAAAAGACAT
GGACAAGGTTGAACCTTTCTTAAGAATTTGTTCAATGCAGATCTGTTGAAGGTTCTTGGCGGTTTCTGA**GCGCGCGG**CATCCTTAATAA
AAAAATCAATATATATTTTACAAACTTTCATATAAAATAAATATATTTATAAAAAATTAATTTTTTAGTGATTATATTAACATTAAAGCA
CCAAAAAACGTGTTAATATACACTATAAAATATAAATTTATTCAAATTGACTAAAATCATTATTTTACAACCTCATTGTATATATAT
TTTTATGTCATTAATTTTTTTTTAACTTTCTTAAAAAATAATCCCTCTTCACATACATGTTTAGCTCTTAAAAATTTGTCTGCAATCCA
ATAATAATATTTTTTTTTGCCATTAAATTTTTCAAATTTTTTACTGGAAAAATCGACGATCGCATTTGGCGGCCATTTCGCATATAACA
TTATTCTTAAAAAATATTTAAAAATAAAAAATAAAGGGTTTTGAATAACTCCTTTAATTTAAATACACATTTTAAATTTTTTTTT
GCTCTTTAAATATTCATAAAAAATAAAAAATACTAACTAAAAATAAATAAAAGATAATAATGATTAAAGGTATAATACTGAATAAG
AAAAACATAATAGAGTACTTATTTTTTATATCATACTATTTTAAATATCTTGAAGGCAAAACCTTTTTATATATCTTAAATAATATTGT
ATCGTTTATTCAATTTATTTTTCTTTAAATTTCAAATTTTGAATAAAAGATGACATGTTTTTAAAGAAAAACATGAATATAAAAAA
GATAAATATCAATTTATTTTATTATTAATATATAAGCTGCTCAAAACATAGCTCATTCATCAATTAATATATGTGAATCATTAATTT
TCAAAATATTACTCATTATTTAGGCTATCATTATTTTTTATTTTCAATTATCCGTTTCTATTATATTTTAAATTAAGTTGTGATTC
TTGAATTTTGTGTCATGAATTTATTTGTAATCTTTTTTATTCTGTATAAAAAATAAATTTGATTGACTCATGATTTAAATCATGAGTC
AACCTTAACATTTTCAAATTTCTTCTATTTCTAAATATAGATGTATTCTTGAATCTCTCTTGAATATAAGTAATTTTTTATATTT
CTGATATAATTTCTTAGCTACGTGATTACGATTTTATACAATGATCCATATAAAATAATGTAAATAGTATATATATATATTCGTCTT
TTTTATTCTTTATATAATTTAAAAAATAAAAAAATTAATAAAGCTCTAATAAAATAAATAAATACTAACTTAAAAATAATGAT
TGAACAAGATGGTTTACACGCTGGTTCTCCCGCGCTTGGGTGGAAGACTTTCGTTATGACTGGGCTCAACAAACCATCGGTTGC
TCTGATGCGCGCGCTTCCGCTCTTCTGCTCAAGGTGCTGCTGTTCTTTCTGCTCAAGACGACCTTTCTGGTGGCCTTAAGCAACTTC
AAGATGAAGCTGCGCGTCTTCTTGTGCTGCCACCACCGGCTGCTTTCGCTGCTGCTGCTTACGTTTGTGCTGACTGACGCGGTGAGAGA
CTGGCTTCTTTTAGGTGAAGTCCCGGTCAAGATCTTCTTCTTCTCACCTTGCTCTGCGGAAAAAGTTTCTATCATGGCTGATGCT
ATGCGTCGCTCTTCATACCTTTGATACCGCTACCTGCCCTTTTGACCACCAAGCCAAACATCGTATCGAACGCTGCTGCTACTCGTATG
AAGCGCGTCTTCTGCGATCAAGATGATCTTGACAGAAGAACCTAAGGTTCTGCCCCGCGCACTTTTCCGCGAGCTTTAAGCGCCGAT
GCGGACGCTGGAAGATCTTGTGCTGCCACCCATGGTGATGCTGCTTACCAATCATGTTGAAATGGTGCTTTTTCTGGTTTCTATC
GACTGTGGTCTGTTGGTGTGCGCGACCGTTATCAAGATATTGCCTTAGCTACCGGTGATATTGCTGAAGAAGTTGGTGGTGAATGG
CTGACCGTTTCTTGTCTTTACGGTATCGCGCTCCCGATTCTCAAGCTATCGCCTCTCATGCTCTTTCGACGAATTCTTCTGAGA
TCTTAAATTTAAAAATTTCAATATATTTTACAACTTTTCATATAAAAAATAATATATTAATAAAATTTTATGTTATATATATTA
ACATTAAGACACAAAAAACGTGTTAATATCTACTATATAAATAATTAATTTTCCAATTGACTAAATCATTTTATTTTACAACAT
TTGTATATATATTTTATGTCAATTTATTTTTTTTAACTTTCTAAAAAATAAATTCCTCTTCACATACATGTTAGCTCTTAAAAATTTG
TCTGCAATCCAATAATAATATTTTTTTTTTGGCATTAAATTTTCAAATTTTACTGGAAAAATGCGAGTCGACTATCTGCAGGCATGCA
AGCTTGGCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCTGCTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAAATTCACACACATACGAGCGGGAAGCATAA
AGTGAAGCGTGGGTGCTTAATGAGTGAGCTAACTACGATTAATTCGTTGCGCTACTGCGGCTTTCCGCTCGGGAACACTGTC
GTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGCGGTTTTCGCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCG
CTGCGCTCGGTGCTTGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCGGTAAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAG
GAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCGCCCC
TGACGAGCATACAAAAATCAGCGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACGAGCATATAAGATACGAGCGGTTTTCCCTTGGAGC
TCCCTGTGCGCTCTCTGTTTCCGACCTCGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCCTTTCGGAAGAGCGTGGCGCTTCTCAT
GCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTGTTGCTCCTCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTACGCGCGACCGCTG
CGCTTCTCCGGTAACTATGCTTCTGAGTCAACCGGTAAGACGACCTTATCGCCACTGGCAGAGCCACTGGTAACAGGATATGCG
AGAGCGAGGTGTAGGGCGGTCTACAGAGTTCTTGAAGTGTGGCTTAACTACGCTACACTAGAGAAGACAGTATTTGGTATCTGCG
CTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTTCGGAATAAGAGTTTGTAGTCTTTGATCCGCAACAAACACCGCTGGTAGCGGTGTTTTTTGT
TTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGCTGACGCTCAGTGGAACGAA
AACTCAGCTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACTAGATGCTTTTAAATTTAAATTTGAAGTTTAAATCAA
TCTAAAGTATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGCTATTTTCGTT
ATCCTATAGTTGCTGATCCTCCGCTGCTGTAGATAACTCATGATCGGAGGGCTTACATCTGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGA
GACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTATCAGCAATAAACACGACCGCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCG
CCTCATCCGAGTCTATTAATGTGTGCGGGAGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTTGCTAC
AGGCATCTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGCTGCTTCACTCAGCTCCGTTTCCCAAGCTACAGGCGAGTTACATGATCCCATC
TTGTGCAAAAAAGAGGCTAGCTCCTTGGCTCCCGATCGTTGTCAGAAAGTAAGTTAGGCGCAGGTGTTACTCATGTTATGTCGAG
CACTGCATAAATTTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTG
TATGCGGCGACCGAGTTGCTTGTGCGGCGCTCAATACGGGATAATACGCGGCCACATAGCAGAAGTTTAAAGTGCTCATCTTGA
AAACGTTTCTTGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGCTCCGATTGATGTAACCCCATCTGTCAGCCCACTGATCTT
CAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTTCTGGGTGAGCAAAAAAGGAAAGGCAAAATGCGCAAAAAAGGAAATTAAGGCCACACGGAA
ATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTTCAATATTTATGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGT
ATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGCGGCACATTTCCCGAAAAAGTGCACCTGACGTTAAGAAACCATTTATATCATGACAT
TAACCTATAAAAAATAGCGGTATCAGCAGGCCCTTTCTGCTCGCGCGTTTTCGGTATGACGTTGAAAACTCTGACACATGACGCTCCC
GGAGCGGCTCAGCAGTTGCTGTGAAGCGGATGCGGGAGCAGACAGCCCTCAGGCGCGTACGCGGTTGGCGGGTGTGGCGGCTGCGGG
TGGCTTAACATATGCGGCATCAGACGAGATTGACTGAGAGTCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAAT
ACCGCATCAGGCGCATTTCGCCATTACGGCTGCGCACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCTTCTCGCTATTACGCCAGCTGGC
GAAAGGGGATGCTGTCGAAGGCGATTAAGTTGGGTAAACGCGAGGTTTTCAGATCAGCAGTTGTAAGAACGACGCGCAGTGAAATC
GAGCTCATAGGTACGAAATTTCTACGATCTGCTGAGATTACGCCGCTCTCTAGATTATCTCATCTCCCTTATTTTACTTCTGCT
CTGGGTTGTATTAACCTCTTAAAGAAATTTTTTTATTTTATTTGATTGTTTGAATTAATTTTGAATTAATTTTGAATTAATTTTCTCTT
TTCCTCCACTGGGGTTATTAATACTTAGAGATTTTTTATTTTATCAAATAAATTTATGAAGCTATTAAACAAAAACAAAAAAGT
TAATAAAAACTCAATAGATTGTCTAATAAGATGCAAGACGATATGAGGCAATTTTTCTCATTGGAAGCTTCAATCAACTGCTTAT
AAAAAATAATAAAATAAATAAAGTTAAAGTTTTATGTTATTTGTTAGTAAAAAATGAATAGTTGTGTTTAAAGCTGATATA
AGTCTTTATGATGATATGTTAAAGGTACGCTTAAATATGCTTTTTACGCAGATAGGCTAGCTTAATTTTCTCAAAGTAA

TTTTTTTAAATGCAAAATGAATGAAAAATTTTAGTATTTTATAAAAAATCTTCATTCAAATTTTACCCACTTATCAATTTATTTTT
TTTGTGACTAAAGCAGTCCCAGAGCCTTTTCTCTAAAAGTTGAATTTTATTAACAATGCCACTTTTATAGAAAAATTTGCGATGGATTT
CCTGGGGCTCCAATGGAAAAATTGCGAAAGTGGATTTTGAATGAAAAAGTGAATGTAAAAATTAAAGTAAAAATTTGCTTTATAAAAT
GAATGAAAAATTTAAAAACAAGCAAAATGAATGAAAAATCTTTGCATTTTAAACAAAAATTTTCATTCAAATTTACCCCACTTTATCAA
TAACTTTTTTTTCCCCAGCCCGTCAAAGACCTATTATTGTTCCTAAAAGTTGACTTTTATTAAGAAACAAAAATGAATGAAA
AAATCTTTGTATTTTAAACAAAAATTTTCATTCAAATTTACCCCACTTATCAATATATTTTTTTTAAAGTCCTGCCTGCAGGCTAATAT
TCTTTCTAAAAGTTGACTTTTATTAAGAAGCAAAATGAATGAAAAATCTTTGTATTTTAAACCAATTTTTCATTCAAATTTTACC
CACTTATCAATATTTTTTTTGGGACCAAAACCAAAAGACCTAAAGATTGATTAAAAAGTTGACTTTTTCAGAAAAACCACTTTATT
AGATAAATCTCTTTTTTACCACGGCTTGTCCAATGAATAATTTGCTAAAGTGGATTTGAATAAAAAATTTTTTGCCTGTAAAAATGCG
CTAAACTACGCTTAGATTTTAACTTTATCCCACCTTAATTTCAAGCGTAAAAATAAAAAATCCACACAAAAATTAAGTGGAATTGAT
GCAAAAAATTTCACTAAAAATTAATTCATAAATATGTAAAAATGGTTGATCTCTATAATTTATGAGATTTGCATTATTTAAGGCTTAT
AAGAAATTTTAAATTTAACGCGGAAGCTTCATTTTTTAGATAAAAATTTTAAATCATCATTAATTTCTTGAAAAACATTTTATTTATTGA
TCTTTTATAACAAAAACCTTCTCTAAAAGTTTATTTTTGAATGAAAACTTATAAAAAATTTATGAAAACTACAAAAATAAAATTTTT
AATTAATAATATTTTATAAGAACTTCAATCTTTGACTAGCTTAGTCATTTTGAGATTTAATTAATATTTTATGTTTATTTCATATAT
AACTATTCAAATATTATAGAATTTAAACATTTTAAACATCTAATCATTGATAAATAACCAAAAAATCAAAGTATTACATCAATAAAT
AACTTTTACTCAATGTCAAAGAAATTTATATAGGGCCCGTAACTGCTGGAATTACACATGGCATGGATGAATTATACAAAGGTAC
CGTCTTCTGAGGTACCTTATCTAAATGAACAACACTTAAATAAATAAATAAATAAAGAACGTACTTATATTTAAATAAATCTCGAAAT
TTTCTAATTACTATTATTTTTATTTTTTATACTTATGTCAAACAATACATAGACATCATATGGATTACAAACATAAAGTATTGGAGTA
ATAAACACTACGCGCCCCAGGGCCGTCGTTTTCAACGTCGTGACTGGGCAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACA
TCCCCCTTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAAA
TTGTAAGCGTTAATATTATAGAATTTAAACATTTTAAACATCTAATCATTCAATAAATACTAAAAATCAAAGTATTACATTCAATAAA
TAACTTTTACTCAATGTCAAAGAAATTTATGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGG
GTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGG
GGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGG
TGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGG
TGTTGATGCGCGGGATCGGCCTAGGCGGCCGCGATCCTCGGGGACACCAAAATATGGCGATCTCGGCCTTTTCTGTTTCTTGAGCTGGG
ACATGTTTGGCATCGATCCATCTACCACCAGAACGGCCGTAGATCTGCTGCCACCGTTGTTTCCACCGAAGAACCACCGTTGCCGTA
ACCACCACGACGGTTGTTGCTAAAGAAGCTGCCACGCCACGGCCACCGTTGTAGCCGCCGTGTTGTTATTGTAGTTGCTCATGTTA
TTTCTGGCACTTCTTGGTTTTCTCTTAAGTGAGGAGGAACATAACCATTCTCGTTGTTGTCGTTGATGCTTAAAT



>pTtAC2-hGH

TTGCACTTGTTCGCTCAGTTCAGCCATAATATGAAATGCTTTTCTTGTGTGTTCTTACGGAATACCACTTGCCACCTATCACCACAACCT
AACTTTTTTCCCGTTCCTCCATCTCTTTTATATTTTTTTTCTCGATCGAGTTCAAGAGAAAAAAGAAAAAGAAAAAGAAAAAGG
AAAGCGCGCCTCGTTATAGAAAAAGAAAAATTGCGGGAAAGAGACTGTGTTATGACTTCCCTGACTAATGCCGTGTTCAAACGATACCT
GGCAGTGACTCCTAGCGCTCACCAAGCTCTTAAAACGAGAATTAAGAAAAAGTCGTCATCTTTCGATAAGTTTTTCCCACAGCAAAGC
AATAGTAGAAAAAAACAATGGGAAACGTTGAATGAAGACAAAGCGTCGTGGTTTAAAGGAAATACGCTCACGTACATGCTAGGGAAC
AGGACCGTGCAGCGGATCGGCCTAGGCGGCGCGATCCCGCGCATCAACAATATTTTCACTGAATCAGGATATCTTCTAATACCTG
AATGCTGTTTTTCCACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAAC
CCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCA
ACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCC
CAACCCCAACCCCAACCCCAATAATTTCTTTGACATTGAGTAAAAGTTATTTATTGAATGTAATACTTTGATTTTTAGTTATTTATGA
ATGATTAAGATGTTAAATGTTTAAATTTCTATAATATTGAAAAAGGAAGAGATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCC
TTTTTTCGCGCATTTTGCCTTCCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAG
TGGGTTACATCGAATCGATCTCAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAA
AGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGT
GTTGAGTACTACCAAGATACTCGAGCCCAATAATTTCTTTGACTGAGTAAAAGTTATTTATTGATGAGTAAAAGTATTTATTGATGAGT
TATTTATCAATGATTAAAGATGTTAAATGTTTAAATTTCTATAATATTTTGAATAGTTTATATATGAATAAACATAAAATATTAATTAA
ATCTCAAAAAATGACTAAGCTAGTCAAGAGATTGAAGTTCTTATCAAAATATTTTAAATAAAAAATTTTATTTTTTGTAGTTTTTATAAA
TTTTTATAAGTTTTTTCATTCAAAAATAAACTTTTAGAAGGGTTTTTGTGTATAAAAGATCAATAAATAAAATGTTTTTCAAGAAATTA
TAAATGATTAATAAATTTTTATCTAAAAATGAAGCTTCGCGCTTAAAAATTTTCTATAAGCTTAAATGATGAAAGTATTTGATGAAAGT
ATTATAGAGATCAACCATTTTTACATATTTTATGAATTAAATTTTAGTGAAATTTTTGCATCAATTTCCACTTAATTTTTGTGTGGGA
TTTTTATTTTTACGCTTGAAATTAAGTGGAATAAGTTAAATCTAAGCGTAGTTTAGCGCATTTTTTACACGCAAAAAAATTTTTAT
TCAAATCCACTTTAGCAAATTTATTCATTGGACAAGCCGTGGTAAAAAAGAGATTTATCTAATAAAGTGGTTTTCTTGAAAAAAGTGA
CTTTTAAATCAAAATCTTTAGTCTTTTTGGTGTGGTGCAAAAAAATTTGATAAGTGGGTGAAATTTTGAATGAAAGTATTTGGTTA
AAATACAAAGATTTTTTCATTCATTTTGCTTCTTAATAAAAGTCAACTTTTAGGAAAGAATATTAGCCTGCAGGCAGGACTTAAAAAA
AATATATTGATAAGTGGGTGAAATTTTGAATGAAAAATTTTGTATAAATACAAAGATTTTTTCATTCATTTTGTTCCTAATAAAAGT
CAACTTTTAGGAAAAACAATATAGGTCTTTGACGGCTGGAGAAAAAAGTATTGATAAGTGGGTGAAATTTTGAATGAAAAATTTTGT
TAAATGCAAAAGATTTTTTCATTCATTTTGCTTGTGTTTTAAATTTTTCATTCATTTTATAAAGCAAAATTTTACTTTTATTTTACATTC
ACTTTTTTCATTCAAATCCACTTTTCGCAATTTTTCCATTGGAGCCCCAGGAAATCCATGCAAAATTTTCTATAAAAGTGGCATTGTAA
TAAAAATTCAACTTTTAGAGAAAGGCTCTGGGACTGCTTTAGTCACAAAAAATAAATTTGATAAGTGGGTAAAATTTGAATGAAGAA
TTTTTATAAAATACTAAAATTTTTTCATTCATTTTGCAATAAAAAATTTACTTTGAGAAAAAATTTAGCTAAGCTCATTCGCGTA
AAAAGCATAATTTTAAAGCGTAACCTTTTAACATATCATGCATAAAGACTTATATCAGCTTAAACACAACATTTCAATTTTTTTTACTAAC
AAATAACATAAAACTTTAACATTTTTAATATTGATTTATAATTTATTTATAAGCAGTTGATTGAAGCTTCCAAATGAGAAAAATTGC
CTCATAGCTGCTTTGCATCTTATTAGCAAATCTATTGAGTTTTTTTTAACTTTGTTTTGTTTTGTTTTAATGAGTTCATAAATTATTT
GATAAAATGTAAAATCTCTAAGTATTTAATAACCCAGTGAGTAAAAAAGGAAAAAATTTACTAAAGTTAAACAAAATTAATATAAA
CAAAATGATAATTTTAAAGCGTAACCTTTTAAAGAGGTTAAACAACCCAGCAGAAAGTAAAAAATAAAGGGAGATGAGATAAATCTAAGGAGAC
GGGCTGAATCTCAGCAGATCGTAGAAATTTCTACTCTCATGCTTACAATACCCGTTCCATGTTAAGTCGTCTACAAAAGATTTACGTAG
ATGATAATTTGGAATACGATTAGCAGTTAAGGTCAAGCTTTTTTCGCTCTTCCCGCTCTACCTTTCCGAATTAATTTTTTATTTTTTT
CGTTTTATCATCACACTTAGACATTGCTTTCCAGCATGGATTCTGACTTAGAGGCCTTCAGTCATAATCCAACAGATGGTAGCTTCACG
GCATTTGCTTTTTGAGACAACCGTATTTACCAATTATCTGATTAAGTGTTCCTCTCGTACTAATTAATTTTCTGCGAACATCTGCTT
TCATCAGTAGGGTAAAACTAACCTGTCTCACGACGGTCTAAGCCCAGCTCACGTTCCCTATTAGCGGGTGAACAATCCGACACCGTTG
TGAATTTCTGCTTCACATGATAGGAAGAGCCGACATCGAAGGATCAAAAAGCAACGTCGATATGAATCTTTGCTGCCACAAGCCAGT
TATCCCTGTGGTAACTTTTCTGACACCTCTAGCTTAAACTTTGTAAGTTTAAAGGATCGATAGGCCACGCTTTTCGCGGTTGTATTCC
TACTGAAATGTTTCCCTGAGACTTTGGTACTGAAACGCTGTGATCCCTTTCCGCAATTTTGACGGTCTTGCCTTTTAAACCGCTGCGT
TATGGTTTAAACAGGCATTCCGCCCCAGACAACTCCCCCCTAACCATGTCTTCGCAAAATCAGTCAATAAATGACCTTAATCTTAGA
ACTGGTTTGCACCAGTCTTTTCTTCAGGAAATAAGCAAAATGACTAGCTGGGTAGTGGTTTTACAGGATCGATTGCTCTCCCACCTAG
GCTATACCCACGTTGCCATTTACAAAGTTAGACTAGAGTCAAGCTCAACAGGGTCTTCTTTCCCGCTGATTATTCTAAGCCCGTTT
CCTTAGCTTTTTGAGTCTGATAGATAGGACAGTGGTAACTTCCGATTAATCCATTCATGCGCGCTACACTAATGACGATACAGCTGAGC
ATTTGGCTACCTTACGAGTACTCCAAAATAATCAATATACTTTTCGCATACAAATTAGTTCCAGCGGCTCCAGTGTTCATCACTTC
ATCCGCTAGCTCCCATTAAAGGAGAGGTCCGACTATATCTTTATGAGAAAGAATACATCTTCCCGACCCGACATTTAGTCTGTGAATGCA
TCCATATCAACAGAGATCTGTTGACTTAGGACTTGGCTGCGTGGTTAGGACCATGTCCGTCAGCTTATTACCATAACCTTTTGCAAG
CCATCTCAAAAGTTTTCCCTGAGACTTTGGTACTGAAACGCTGTGATCCCTTTCCGCAATTTTGACGGTCTTGCCTTTTAAACCGCTGCG
AATCTATTGGTTTAAAGACTAGCTACCAGGTGCATGCCTGATAACTTTTCCCTCCAAAGGTAATAATTGCTATTTAGAGAGTCATAGT
TACTCCGCGCTTTACCCGCGCTTGGTTGAATTGCGTCACTTTGACATTCAGAGCACTGGGCAGAAATCACATTTGTGTCTACCTGT
TGAGGCGGTCACAATGCTTTGTTTTATTAAACAGTCGGATTACCTTTGTCCGCTTCAGTTCTGAGTTGATCGTTAATTGTATAAAGA
CGGCCGAAACCTACCTTGCAAAATTCCTGTTTCGCAAGTCTATCAGCATGTTGCCACACTAACAAACAAGCTTGGATATCATTTACAAAG
CCTTTATACCCGATCTCTCAGAGCCAATCCTTTATCCCGAAGTTACGGATCCAATTTGCCGACTTCCCTTATCTACATTTGTTCTATGGAC
CAGAGGCTGTAAACCTTGGAGACCTGATGCGGTTATGGGTAGCAACTGGCGTGAAATTATGTCTCCCCCAGATTTTCAAGGGTCATCA
GGCGCGCAACTGACAGCTCTTAGGGTGAGCTGCTCTGCCATACATACAGCCGATATCTCTGGATAATCCAATTTTATGGCCATAGTAT
GTTAAAAAAGAAAAAGATAACTCTTCCAGTGACACCTGCTGAGTGTTCCTGGGTTTTCTTTGCGTTACCGCCTATACCACGTCACGCTTGAG
GAATATTAACCTCATTTCCCTTTTGACAACGAAACGAATGTCTTCTGTATTGCAAGGAGTTAACCTATGTCTTAGGATCGAGTAACC
CATGAACAATTTGCTGTTCTCATGGAACCTTTCTCCACTTCGGTCTTCAAAGTTCTCATTTGAATATTTGCTACTACCACCAAGATCTC
ACTAATCGCTGCTCCATATAGGCTCACGCCAATACCTTCTAGGCAACAGATCACGCCCTCCCTACTCATCAAAGCCTCGCATTTGCTCTGA
TGGTTGAGTATCGGCACACGCTTTCAGCGCTTACATTTTACGGGCTAGTTTTCATTCGCGAGGTGAGTTGTTACACACTCTTACGCGGA
TTCTAACTTCCATAGCCACCGTCTCTGCTGTCCGATGAAACCAACACCTTTTGTGGTATCTGATGAGCGTGCATTTGGGCGCCTTATCT
CAACGTTAGGTTTCATCCCTCATCGCCAGTTCTGCTTACCAAAAATGGCCCAACTCAAGAGCACTGCGTCTTCCCGAGAGTTTCAATTA
AGTAAACTCCGCGGCTCTTACCAATTTAAAGTTTGAGAATAGGTGCAAGTTCTTAGGACTCCCGAGTCTTCAATCAATTCGCTTTTACC
TAATAAAAGTCCGTTGCTTGTCTTGTCTTCCGTGAGAGAAATCTCGGAGGGAACAGCTACTAGATGAGTTGATTTAGTCTTTCCGCCCT
ACACTCAAATTTGACGAACGATTTGACAGCTCAGTATCGCTACGAGCTTCCACCAGAGTTTCCCTTGCGTTACCCCTATTTCAAGCGTAG
TTCACCATCTTTTCGGGTCTTAACAATTAAGCTCTTCCCTCGAACCTTTCGCGGAGACTCAAGGCGGGTGATGCTGCTACCTTGGCGCTT
GGCACCTGTACTCACTTTCGTTTCGCGGACGGGTTTTTCCACCTATCACTCGCTTAATTGATAGACTCCTTGGTCCGCTGTTTCAAG
ACGGGTAGTAAAGCACTTTTGACAAAAATCGCCCTTAGGCCCTCAGTCCAGTTTGAAGTTTTCCTTTGATCTGCACTGCTGCGCGG
ATCTCAGGTGACTCCTTCAATCTGAACCCATTTTGTCTTCTGACCGGTGTAGCAAGTTCTGTACCATTTTCTTACTCATCGACCTTTT
ACGTATCGACTTCGAGTGATTAGTACTTCCCTTATGCGCGGTCCAGTTTATTGCTCTTCTACAGCTTCTTCTCAACGGTTTCAA
GTCTTTTAGCCCTCTTTTCAAAGTTCTTTTTCATCTTTCTTTCGACAGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCCCGTGATATTTAGCTTTAG

AGAAGTTTATCTCCCACTTAGGGCTGCAATTCCAAACAACCCGACTCTTTGAAATCTCCCTTACACCAGCCTTCCTCTCCGACTACGG
GGTTGTCACCTCTTTGACGTCCTGTCCCAAGGAACCTATGAGAGGAGCTTAGTTCAGGTTGACCTTTAGATTACAAATCTGTTGT
GTTGCCACCTTCAGATTTTCACTTTGAGCTTTAGCCTGTTTCAGCTTACGCCATTACTGGGGCTATCCTAGTTAGTTCTTTCCCTCCGCT
ACTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAATCTTGCTTGTTCAGGTGTAGTGAGAAAAATGTAATTTTTCTATGAGTAGACATAGTGAGCA
TTCGCCTTGATGCCTGAACGAATGTTACATTACTGGAATGTGACTACTTCGTTCTGGCGGCGATTGCTCGACCACCCATCAGCTTTA
ACGAGAGAAGCTTTTGACGGCTTCAATCGCATTAAGATGCGTGATTCTTTCCACACTGAAACAAACATGAAGGTTTTTACACCTCCA
CCACTTGCCTTCAAAGATCTGATGACTCGCGGTCTGCAATTTCGATTGCGTATCGCATTTTCGCTGCGTCTTCATCGTCACGGGAAC
CTAGATATCCACCGTTGAAAGTTTTCTTTTCGTTTTTGGATGTTATCCAGATCTTAGACATATGAAAAATTTTTATTCCACTAGGTGT
GACAAATAAACCTCGAAGAAAAACGAAGTTCTCTTCGAAAGTACATAAGTTAAGGTTTGTTAATTGTGTTAATGATCCATCTGCAGGT
TCACCTACAGATACCTTGTTACGACTTCTTGTTGTTCCAAATGGTAGGGTTTACTTATTTTTCCGCACACATTGCTGTGCGAGTCCAGA
AGGTTTACCAGACCATTCTGTTACTACAAGCGACGGGCGGTGTGTACAACGGCAGGGACATAATCAACGCAAGCTGATGACTTGCAC
TACTAGAAATTCCTCGTTCAAGATCCACAATTTCCAAAGAACATATCCCTAACACGACTGGTATTAATAAGATTACCCGTACCTTCCAG
GACAGGAAATACTTTTTGCGCCAGTCATTGTAACGCGCGTGCGGCCGAGCACGTCTAGGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCTTAAAC
TTCCATTGGCTTATTGCACAATAGTCCCTCTAAGAAGTACAACCTGTTATTTACAAGCAGACTAGTTAGCAGGTTAAGGTCTCGTTTCG
TTAACGGAATTAACGAGACAAATCACTCCACCAACTAAGAAGCGGCATGCACCACCACCCAAAGAATCAAGAAAGAGCTCTCAATCTG
TCAATCGGTTCTCTGCTTTCGCGCTCGTGAGTTTCCCGGTGTTAAGTTCAGAAATTAAGCCGCAAGGTTCCACTTTCGCTGCTCAATCTCG
AATTCCTTTAAGTTTCAGACTTGCCTACCATACTTCCCCCAGAACCACAAAGACTTTGATTTCTCATACGGTGCCGACTGGACATTTAT
TCCAGCGGATCCCGAGTCGGTATAGTTTATAGTTAAGACTAGCAGGTATCTGATCGTCTTTGATCCCTTAACCTTTTCGTTCTTGATTA
ATGAAACATCTTTGGCAATGCTTTTCGCATTAGTTAGTCTTAATAAATCCAAGAATTTACCTCTGACTATTAATACTAATGCCC
CCAATGCTCCCTATTCAATCATTAACCAATCCAAGAACCTTAGCAGTTAGTCTATTCCATTATTCCATGATTTCCATGATTTCCGG
CTAAACCTGCTCGGAACACTCTAATTTTTTACAGTAAATGTTTACTCCCTAAGTCGAACCAAGTGAAGGCCGATTTTAGTTTGCAA
ACGTATGTCCAGTTTACACGACGAATCGAATGAACCTGAACAGAGTTCAACTACGAGCTTTTTAAGTGAACAACTTTAATATAC
GCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGCTGCTGGCACCATGACTTGCCTTCAATTGTTCTTCGCTAAGAGATTTACACTGTTTCTCATTT
CAATTGCGTAGAAGCTTAAGTTTCCAGCTTGTCTTCTGCTAGCTCCCTGAATTAGGATTGGCCAATTTTCTTCCCTGCTGCG
CGAACCGTAGTTGTAGTAGCGGTTTCTCAGGCTCCTTCTCCGAATCGAACCTAATTCCTCGTTACCCGTGACTGCCATGGTAGTCC
AATACACTACCATCGAGAGCTGATAGGGCAGAACTTAGATGATTTATCGAGGTAAACCTCGATCCGATCAGTTACTTTGATTCATCT
CAATCACATTGCTGCGATTGGTCTAATATCTAATAAATACGTTCCGGTCGCGAGACACGGAATTTAAGCATGTATTAGCCCAACAAT
TAGCTCGGTTATCCCATGTAATCTTTAATTATCAAATAAACTATAACTGTTTTAATGAGCCATTGCGAGTTTCCGCTGTTCAATCTGAA
CTGGCACATGCATGGGTTAATATTTAAGACAAGCATATGTAAGTGGCAGGATCAACCAGGTTACTATCTCTCAAATTTGCTCGCTATT
TTCGGATTTGATCTTCCAAAGCTTGCTCATTTTTTGAATAGTGTTCCAAAGGTTGGTTACAAAAGATTAAATAGTTCATCGAGAA
CTGACGCGTTGTAATAGATCAGTACTCAGCTATATCGTTAGATTAAAGCTTTATACATAGATCCCGCATCGTTTCGTTTACTATTAGTT
TCTTCTAGTTGCTAAATCTTCGAAGGCACATGAGAAAACCTCTATCGCATCTCTTCGACTCTAGTCAACTTTGTTGCTAGCTGTAA
TAACATCTGCGATTTTACCGATTTTATAACAGTACTAGCGTGTGCGTTATTTGTAACAATATCTGCATAGATATCGATACAACAAGT
TCACTGGGAAAGTTTTCTGCGAAGCTTTGCGAGTGAATTTACAGCCTTCATGAAAATTTCAAGTCAGGCCATTTGCTCTAATACGAGCT
TAATCCAGAAAAACCTTCAACAGACCTCAGCGGCCATCGACTAAAAGCCGAAGCCATAGAGAAAAACGCTGCTCAGTTAGCGCTTC
ATTATCGGTTATCTTAAGTTGTTGCCAAAGGAATCTTACTGAAGCTCAACTGAGCTGATATTTTATTTTGTAGTCGAGAAATTTTCC
CTTCTTAAATATGCATTTTTTACCCCTGATATTATTTTTATTTTTTTTGGCCAAAGAATTTTTCTCAAAGTCAAAAAAGTTCGGAAGG
TTTACTATTTTTGTTTTTTTTTTTGGCCAAAAAAGACTCTGCCAAAATTTTCAATCCCTTGTAATTTTTTTCAGTTTTTCATTATTTT
TTCATTTTTTTCATTTTTTCGCTATTTTTTCACTAAGTCTAATTTAATTTAGAGCTGATTTTAAGCTAAATTTTAAAGTGGCTCTGCTGAA
CTTTTGTAGTGCTCCACTCATTTTTTAAAGCGAGTCTGCTTCAATTTTGTAGTGAGTCCACTCATTTTTTGTAGCGCAATCCGCTTAATTT
TCTGTGAGTCCACTTATTTTTGTTTAACTCCGCGAATATTAAGCGAGTCCGCTTAATTTTTTGTAGTGCTCCACTCATTTTTTAAAGTGA
GTTCACTTAATTTTTTGTAGTACTCCACTCATTTTTATGCGAGTCCACTTAAATATTGAGCGAGTCCGCTCATTTTTTGTAAAGTGGC
TTCACACAAAATCTAAGCGCAATCTCAAAATTTCTCCTAAATCATTTTTTTCATTTTTTAAATTTTTTCTAAGTCTTTTTTCACTTTTT
GAAATTTTTTCTTAAGTCTTTTTTTTTTTCATTTTTTTCAGAAATTTTGTAGTTTACTATTTTTGTTTTTTTTTGGCCAAAAAATATCTAATGAGCA
TAATGAGCAATTTTCAAAATCAATATTTTTAATCTAGATAAACTTTTTCTTTAAGTCTCTTTTATAACTCTTTATTTAATCAAAAA
AATTTATTTGAATGTAATTTAATCAAAATGAATAAATGAATGATAAATGTTTTTACATATAAAAATGATATACGATGCT
GTTAAATGTTTTATGTTTTTTTTATATATGTTTTATTTAATTTTACTAGCATTTAAATGATTAAAAAATATAAAATAAATTTTACTT
TTCATGATTTTATTTATATAAATTTCTCTAAGTCTTTTTTACTCTTTTTTGTAGTTTTTCTCTAAGCTTTTTTCTAAGCTTTTTTCTGTC
TTTTTCTAAGTCTTTTTTCAACTCTCAAAAAAGTATTTTTTACTATTTTTGTTTTTTTTTGGCCAAAAAATATCTAATGAGCA
ATTTTTCAAAATCAATATTTTTAATCTAGATAAACTTTTTCTTTAAGTTATCTTTATAAAGTCTTTATTTTACCATACCAAAAAAAGT
TTTTTGTGAATGAAAAATTTAATAAATGAATAAATGAATTTGATAAATGTTTTTACATAAAAAAACTATTTACTCTTTATCTCT
AAAATCTTTTACTTTTATTTATAAAGTTTTTACTTTAAATTTCTAGCATTTAAATGTATAAAAAAAGGAAATCTTCTTTGTC
ATTTTGTAGTCTTTTTCTTTAAAAATTTAATAATTTCTTAAATTTACCTCTTAAAAAATATTTTATCATTTTAAAAATCATATATTTT
ATTAAAAAAGTGTTTTTAAGTGAAATGAATTAATTCATTTTAAATTTACTAGCATTAAGTAGTCAAATAGCTAAAAATATGTAATA
TTTTCTCATTTTTTGAACCTATTTTGCTTGAATTTGTAAATTTGTAAATTTTATCTAATTTAAAAACATTTTACAACATAAAAAAC
AAATATTTTTTGTTTTTAAATACTATTTTGCTAGTTTATTAGAATTAATAAATTAATTTCTATTTGCTACATTTTCCACAGTGAATTAGCAGAA
TATAAACATCTAATTTCTATCTACTCAAATTTAAATTTTAAACCAATTTATCTCAATTTTAAAGTTATTTTGAAGGTAAATTTCAA
CAACATAGTGTGAAGGCTATAAACTAACAACAAAAAGCAAAAAACCGTACGAGCTATACGTGTAGCATGACCCGGGTAAATTAAG
TGCAAGCAAACTTAAAAATATATAAATGAAAAAATACTAAAAATTAACAATTCCTTAAATTTATATTTGTCAGATATTTTAGCTATG
TAATTTGCAAGCAATTTTGTTTACAAAACATGAATTAATAAACTAAAAAATATTCATTATATAAATTAAAAAAGGAACTTTTAAACA
AAATATCTTAATTTCTATATTAATTTATTAATTTTACTTTAAAGAAAAAGAGAAAACTTCTAAATCAAAATTAATTTAATAGAAGT
TTTTAATCTATCTAAATAGTAATAATGTTATATTTGAATAATATAAATTTATCAATAAATAAATACATTTTAGCAAAATATTTATTT
TTATATTTCTGCTGATAATTAAGTGAGTGTTATAGCTAATTTTTTAAATTTAAAAATATTTTTAAAAAATTTGGTTGTTGGTTGTTG
ATAGATAAATTAATTTTGTAAAGTTTAGTTTATAATCAATTTTTTTTAAATCTTTCTAAAAATTAATAAAGATTTTGTAAATCTTCC
TTTTCTTATTTGCTATTAATAATCAATTTATTCATAAAGGATATTTAATAATTTAGAAACATTTTACTGATTTCTAAAATTCCTTTG
TTATTAATAAATACACTTCAATTAATAAATAAATAAATTTCCAACAATTTCTATCAGAAATTTTTTTCGCTTTAAACAGCTAAAAAGAA
ATTTGATCAAAAAATAAATCAATTAATTAATAAATAAATAAATAAATCTCAACAAAAATCTTCAAAAAAGCGACTCAACAAAAAT
ATTAATAAAGTTTACAAAAATTTCTGGAATAAATAAAGGATTCGAAGGAATGGTAGTTTAAACATGTTTCCCTACTATTTCTTTATCTAGA
TTATTCGACAACGCTATGTTAAGAGCTCACAGATTACACCAATTAGCTTTCGACACTTACCAAGAATTCGAAGAAGCTTACATTCTCA
AAGAACAAAAATACTCTTTCTACAAAACCTTCAAACTTCTTTATGCTTCTCTGAATCTATTCTACTCCTTCTAACAGAGAAGAAAC
TCAACAAAAATCTAATCTAGAAATTAAGAATTTCTTTATTAATTAATCAATCTTGGTTAGAACCTGTTCAATTCCTTAAGATCTGTT
TTCGCTAACTCTTTAGTTTACGGTGCTTCTGACTCTAACGTTTACGCTATTATAAAGACTTAGAAGAAGGATTTCAAACTTTAATGG
GTAGATTAGAAGACGGTTCTCCTAGAACTGGTCAAAATTTTCAACAACTTACTCTAAATTCGACACTAACTCTCACAACGACGACGC
TTTATTAATAAATACTAGGTTTATTACTGCTTCAGAAAAGACATGGACAAAGTTGAACTTTCTTTAAGAATTGTTCAATGCAGATCT
GTTGAAGGTTCTTGCCTTTCTGA

ATTATATATAAAATTAATTTTTAGTGTATTATATTAACATTAAAGCACCACCAAAAAACGTTTAATATACTACTATAAAAAATAAATTTATTC
CCAAATTTGACTAAAACTATTATTTTACAACTCATTGTGATATATATTTTATGTCAATTTATTTTTTTTAACTTTCTAAAAAATAAATTC
CTCTTCCATACATGTTAGCTCTTAAAAATTTGTCTGCAAAATCAATAATAATTTTTTTTGGCATTTAAATTTTCAAATTTTCTT
GGAATAATGCGAGGATTCGCAATTTGGCGGCCATTTTCGATATACAATTTATTTCTAAAAAATATTTAAAAAATAAAAAATAAGGGTTT
TGAATAACTCCTTTAATTTAAATACACATTTTAAATTTTTTTTAGCTCTTTAAATATTTCATAAAAAATAAAAAATACTAATAA
ATAAATAAAAAAGATAAATGATTAAAGGTAATAATCTGAATAAGAAAAAACATAATAGAGTACTTTATTTTTATATCTACTATTTT
ATATCTTGAAGCAAAACCTTTTTTATATATCTTAAAAATATGTGATCGTTTATTCATTTTCTTTAAATTTCAAATATATTGTA
AAAAAGATGACATGTTTTTAAAGAAAAACATGAATATAAAAAATAGATAAATCAATTTATTTATTTATTAATATATAAGCTGCTC
AAAACATAGCTCATTTCATCAATTATAATATGTGAATCATTAAATTTTCAAATATTACTCATTATTTAGGCTATCATTATTTTTTAT
TTCAATTTCTCGTTTCTATTATTTTAAATATAAGTTGTGATTTCTGAAATTTTGTGTCATGAATTTATGTAAATCTTTTATTTCT
GAAAAAATAATAAATTTGATTGACTCATGATTAAATCTGAGTCAACCTAACTAAATTTTCAAATTTCTTCTTAAATATAGAT
GTGATCTTGAATCTCTCTTGAATATAAAGTAATTTTTTATATTTCTGATATAATTTCTAGTACGTGATTACGATTATACAATGA
TCCATATAAAAAATGTAATAGTGTATATATATATATTCGCTTTTTTATTTCTTTATATAATTTAAAAAATAAAAAATTTAATA
AAGCTCTAATAAAAAATAAATAATACATAAATCAATAAAAATGATTGAACAGAGTGTTTACACGCTGGTTCTCCGCGCGCTGGGCT
GAAAGACTTTTCGGTATGACTGGGCTCAACAACCACTCGTTGCTGTGATGCGCGCTCTCCGCTTTCTGCTCAAGGTGCTGCTG
TTCTTTTCGTCAAGACCGACCTTTCTGGTGGCCTTAATGAACCTCAAGATGAAGCTGCCGCTCTTTCTGGCTTGCACCACCGGCTGT
TCCTTGGCTGCTGTCTTGACGTTGTCACCTGAAGCCGCTAGAGACTGGCTCTTTTAGGTGAAGTCCCGCTCAAGATCTTCTTTCT
TCTCACTTGTCTCTGCCGAAAAAGTTTCTATCATGGCTGATGCTATGCGTCGCTCTTCATACCTTGTATCCGCTACCTGCCCTTTCCG
ACCACAAGCCAAACATCGTATCGAAGCTGCTCGTATCTGATGGAAGCCGCTCTTGTCATCAAGATGATCTTGACGAAGACATCA
AGGTCTTGCCCTGCGCAACTTTTCCGAGACTTAAGGCCGCTATGCCGACGCTGAAGATCTTGTGCTACCCATGGTGATGCCTG
TTACCCAATATCATGTTGAAAAATGTCGTTTTCTGGTTTCATCGACTGTGGTCGCTTGGTGTGCGCGACCGTTATCAAGATATTG
CCTTAGCTACCCGCTGATATTCTGAAGAATTTGGTGGTGAATGGGCTGACCGTTTCTCTGTCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATT
TCAACGTATCGCTTTATCGTCTTTTGAAGAAATCTTCTGAGATCTTAAATAAAAATCAATATATTTTACAACCTTTTCATAT
AAAAATAAATATATATAAAAAATTAATTTTTAGTGTATATATTAACATTAAGCACCACAAAAACGTGTTAATATACACTATAAAAA
TATAATTTATTTCAAATTTGACTAAAAATCATTATTTTACAACTCATTGTATATATATTTTATGTCAATTTTTTTTAACTTTTCTAA
AAAAAATAATTTCTCTTTCACATACATGTTAGCTCTTAAAAATTTGTCTGCAAAATCAATAATAATTTTTTTTGGCATTTAAATTTT
CAAATTTTCTTGGAAAAATCGAGTCGACTATCTGACCGATGCAAGCTTGGCGTATCATGTCATAGCTGTCTTCTGTGTGAAAT
GTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACACATT
AATTGCGTTGCGCTCTACGCGCGCTTTCCAGTCGGGAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGC
GGTTTTCGCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGTGCCTCGCTCGCTTCCGCTCGCGCGAGCGGATCAGCTCACT
CAAGCGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATACGGGATACGCGAGGAAGAACATGTGAGCAAAAGCCGAGCAAAAGGCCGGAACCG
TAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCTTACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGA
AACCCGACAGGATATAAAGATACCGAGCGTTTCCCTCGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCCGACCTGCCGCTTACCGGAT
ACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCCGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTACCGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGTTGAGGTGCTTCCGCTC
CAAGCTGGGCTGTGTGACGAAACCCCGTTTCAAGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACATTCGTTTGTAGTCCAAACCGGTAAGA
CAGCACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGAGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGT
GGCCTAATCAGGCTACACTAGAAAGACAGATTTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAGAGTTGGTAGCTC
TTGATCCGGCAACAAACACCGCTGGTAGCGGTGTTTTTTTGTTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAA
GATCTTTTATCTTTTCTACGGGCTGTGACGCTCAGTGAAGCAAAACACGTTAAGGATTTTGTCTGATGAGATTATCAAAAAGGA
TCTTCACCTAGATCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATG
CTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTTCATCCATAGTTGCTGACTCCCGCTCGTGTAGATATAACTACGAT
CGGGAGGGGCTTACCATTCTGGCCCACTGTGCAATGATACCGCGAGCCACGCTACCCGCTCCAGATTATTCAGCAATAAACCCAGC
CAGCCGGAAGGCGCAGGAGCAGAAAGTGTCTGCAACTTTTCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTTTGTGCGGGAAGCTAGAGTAAG
TAGTTGCGCAGTTAATAGTTTGGCGAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTC
AGCTCCGCTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCTCTCGGCTCTCCGATCGTTG
TCAGAAGTAAGTTGGCGCAGTGTATCTACTCATGTTTATGGCAGCATGCAATAATCTCTTACTGTCTATGCCATCCGCTAAGATGCTT
TCTGTGACTGGTGTGACTACAACCAAGTCAATCTGAGAATAGTGTATGCGCGCAGCAGGATGTCTCTTGGCCGCGCTCAATACGGGAT
AATACCGCGCCATAGCAGAACTTTAAAGTGTCTCATTTGGAAGACGTTCTTCCGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGT
TGAGATCCAGTTTCGATGTAAACCACTCGTGACCCCACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTTCTGGGTGAGCAAAAA
AGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAGGGAATAAGGGCAGCAGGAATGTGAATCTTACTATCTATCTCTCTTTTCAATATTTGAAGC
ATTTATCAGGTTATGTCTCATAGCGGATACATATTTGAATGATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCAATTTCCCG
GAAAAGTGCCACCTGACGCTAAGAAACCATTTATTCATGACATTAACTATAAAAAATAGGCGTATCACAGGCGCTTTCGTCTCG
GCTTTTCGGTATGACGGGTGAAAACTCTGACACATCAGCTCCCGGAGCGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGA
AACGCCCGCTCAGGCGCGCTCAGCGGTTGCGGGGTGTGGGCTGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGC
ACCATATCGCGTGTAAATACCGCAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATAGGCGCAATTCGCCATCAGGCTGCGCACTGTTG
GGAAGGGCGATCGGTGCGGGCTCTTTCGTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAAACGCCA
GGGTTTCCCGACTCAGACGTTGTAAACGACGGCGAGTGAATCTGAGCTCATAGTTACCGAATTTCTACGATCTGCTGAGATACCG
CCGCTCTCTTAGATTATCTCATCTCCCTTATTTTTTACTTCTGCTGGGTTGTTAACTCTTTAAGAAATTTTATTTATTTTGAAT
TGTTTAAATTTTATTTTGTAACTTTAGTAAATTTTTTCTTTTCTACTCCACTGGGTTTAAATCTTAGAGATTTTTATTT
TTATCAATAAATTTATGAACCTATTAACAAAAACAAAAACAAAGTTAAAAAATACTCAATAGATTGCTAATAAGATGCAAGCAGCT
ATGAGCAATTTTCTCATTGTGAAAGCTTCAATCACTGCTATAAATAAATATAAATCAATATAAAAAATGTTAAAGTTTATGT
TATTTGTTAGTAAAAAATGAATAGTTGTGTTTAAAGCTGATTAAGTCTTTATGATGATATGTTAAAGTTACGCTTAAAAATATG
CTTTTACGAGAATGAGCTTAGCTAAATTTTTTCTCAAGATAAATTTTTTATGCAAAATGAATGAAAAAATTTAGTATTTTAT
AAAAATTTCTTCAATCAAAATTTTACCACCTTATCAATTTATTTTTTTTTTGTGACTAAAGCAGTCCAGAGCTTTTCTCTAAAGTTGA
ATTTTATTAACAATGCCACTTTTATAGAAAAATTTGCATGGATTTCTGGGCTCCAATGGAATAATTTGCGAAAGTGGAATTTGAATG
AAAAAGTGAATGAAAAATTAAGTAAAAATTTTGTCTTATAAATGAATGAAAAATTTAAACAGCAAAATGAATGAAAAATCTTTG
CATTTTAAACAAATTTTCAATCAAAATTTTCAACCACTTATCAATACTTTTTTTTTTCCCGAGCCGCTCAAAAGACCTTATTTT
GTTTTCTTAAAGTTGACTTTTATTAAGAAACAAATGAATGAAAAATCTTTGTATTTTAAACAAATTTTCTTCAAAATTTTCAAC
CACTTATCAATATATTTTTTTTAAAGTCTGCTGACGCTAATATTTCTTCTTAAAGTTGACTTTTATAGAAAGCAAAATGAATGA
AAAAATCTTTGATTTTAAACAAATTTTCTTCAATCAAAATTTTCAACCACTTATCAATATTTTGTGGGACCAACCAAGACCTAA
GATTTGATTTAAAAAGTTGACTTTTTTCAAGAAAAACCACTTATAGATAAATCTTTTTTACCAGGCTGTGCAATGAATAATTT
GCTAAAGTGGATTTGAATAAAAAATTTTTTGGGTGTAATAAATGCGCTAACTACGCTTAGATTTTAACTTTATCCCACTTTAATTTCA
AGCGTAAAAATAAAAAATCCACACAAAAATTAAGTGAAATTTGATGCAAAAAATTTCACTAAAAATTTAATCAATAAATATGTAATAA
GTTGATCTCTATAAATTTAGATTTTGCATTTTAAAGCTTATAAGAAATTTTAAATTAACGCGGAAGCTTCAATTTTAGATAAAAT
TTTATTAATCATCATTAATTTCTTGAAGAAACCTTTTATTTATGATCTTTTAAACAAAAACCTTCTAAGAGTTTATTTTGAATG

AAAACTTATAAAAAATTTATGAAACTACAAAAATAAAATTTTTAATTAAATAAATTTTGATAAGAACTTCAATCTTTGACTAGCTT
AGTCATTTTTGAGATTTAATTAATATTTTATGTTTATTCATATATAAACTATTCAAATATTATAGAATTTAAACATTTTAACATCTT
AATCATTGATAAATAACCAAAAAATCAAAGTATTACATCAATAAATAACTTTTACTCAATGTCAAAGAAATTATTATAGGGCCCGTAAC
TGCTGCTGGAATTACACATGGCATGGATGAATTATACAAAGGTACCGTCTTCTGAGGTACCGTTATCTAAATGAACAACACTTAAATA
AATATAAATTAAAGAACGTACTTATATTTAAATAAATCTCGAAATTTCTAATTACTATTATTTTTATTTTTATACTTATGTCAAAC
AATACATAGACATCATATGGATTACACAACATAAAGTATTGGAGTAATAAACACTACGCGCCCCAGGGCCGTCGTTTTCAACGTCGTGA
CTGGGCAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACC
GATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAAATTGTAAGCGTTAATATTATAGAATTTAAACATTTTAACATCTT
AATCATTCATAAATACTAAAAATCAAAGTATTACATTCATAAATAACTTTTACTCAATGTCAAAGAAATTATTGGGGTTGGGGTT
GGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGG
TTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGG
GGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGAAAA
CAGCATTGAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTGAGGTGAAAAATATTGTTGATGCGCGGGATCGGCCTAGGCGGCCCGCATCCTCGGGG
ACACCAAATATGGCGATCTCGGCCTTTTCGTTTCTTGGAGCTGGGACATGTTTGCCATCGATCCATCTACCACCAGAACGGCCGTTAG
ATCTGCTGCCACCGTTGTTTCCACCGAAGAACCACCGTTGCCGTAACCACCACGACGGTTGTTGCTAAGAAGCTGCCACCGCCACGG
CCACCGTTGTAGCCCGCGTTGTTGTTATTGTAGTTGCTCATGTTATTTCTGGCACTTCTTGGTTTTCTCTTAAAGTGAGGAGGAACAT
AACCATTCTCGTTGTTGTCGTTGATGCTTAAAT



>pTtAc2-6xHis-hGH

TTGCACTTGTTCGCTCAGTTTCAGCCATAATATGAAATGCTTTTCTTGTGTGTTCTTACGGAATACCACTTGCCACCTATCACCACAACCT
AACTTTTTTCCCGTTCCTCCATCTCTTTTATATTTTTTTTCTCGATCGAGTTCAAGAGAAAAAAGAAAAAGAAAAAGAAAAAGG
AAAGCGCGCTCGTTTCATAGAAAAAGAAAAATTGCGGGAAAGAGACTGTGTTATGACTTCCCTGACTAATGCCGTGTTCAAACGATACCT
GGCAGTGACTCCTAGCGCTCACCAAGCTCTTAAAACGAGAATTAAGAAAAAGTCGTCATCTTTCGATAAGTTTTTCCCACAGCAAAGC
AATAGTAGAAAAAAACAATGGGAAACGTTGAATGAAGACAAAGCGTCGTGGTTTAAAGGAAATACGCTCACGTACATGCTAGGGAAC
AGGACCGTGCAGCGGATCGGCCTAGGCGGCGCGATCCCGCGCATCAACAATATTTTCACTGAATCAGGATATCTTCTAATACCTG
AATGCTGTTTTTCCACCCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAAC
CCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCA
ACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCC
CAACCCCAACCCCAACCCCAATAATTTCTTTGACATTGAGTAAAAGTTATTTATTGAATGTAATACTTTGATTTTGTAGTTATTTATGA
ATGATTAAGATGTTTAAATGTTTAAATTTCTATAATATTGAAAAAGGAAGAGATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCC
TTTTTTCGCGCATTTTGCCTTCCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAG
TGGGTTACATCGAATCGGATCTCAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAA
AGTTCGTCTATGTGGCGCGTATTATCCCGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGT
GTTGAGTACTACCAAGATACTCGAGCCCAATAATTTCTTTGACTTGAAGTAAAAGTATTTATTGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
TATTTATCAATGATTAAAGATGTTAAATGTTTAAATTTCTATAATATTTTGAATAGTTTATATATGAATAAACATAAAATATTAATTAA
ATCTCAAAAAATGACTAAGCTAGTCAAGAGATTGAAGTCTTTATCAAAATATTTTAAATAAAAAATTTTATTTTTTGTAGTTTTTATAAA
TTTTTATAAGTTTTTTCATTCAAAAATAAACTTTTAGAAGGGTTTTTGTGTATAAAAGATCAATAAATAAAATGTTTTTCAAGAAATTA
TAAATGATTAATAATTTTTTATCTAAAAATGAAGCTTCGCGTTTTTAAATTTTCAATTTTATAAAGCTTAAATGATGAAATTTTGTGTT
ATTATAGAGATCAACCATTTTTACATATTTTATGAATTAAATTTTAGTGAAATTTTTGCATCAATTTCCACTTAATTTTTGTGTGGGA
TTTTTATTTTTACGCTTGAAATTAAGTGGGATAAAGTTAAATCTAAGCGTAGTTTAGCGCATTTTTTACACGCAAAAAAATTTTTAT
TCAAATCCACTTTTAGCAAATTTATTCATTGGACAAGCCGTGGTAAAAAAGAGATTTATCTAATAAAGTGGTTTTCTTGAAAAAAGTGA
CTTTTAAATCAATCTTTAGTCTTTTTGGTGTGGTCAAAAAAAGATTTGATAAGTGGGTGAAATTTGATGAAATTTTGTGTTTGTGTT
AAATACAAAGATTTTTTTCATTCATTTTGCTTCTTAATAAAAGTCAACTTTTAGGAAAGAATATTAGCCTGCAGGCAGGACTTAAAAAA
AATATATTGATAAGTGGGTGAAATTTTGAATGAAAAATTTTGTATAAATACAAAGATTTTTTTCATTCATTTTGTTCCTAATAAAAGT
CAACTTTTAGGAAAAACAATATAGGTCTTTGACGGCTGGAGAAAAAAGTATTGATAAGTGGGTGAAATTTTGAATGAAAAATTTTGT
TAAATGCAAAAGATTTTTTCATTCATTTTGCTTGTTTTAAATTTTTCATTTTATAAAGCAAAATTTTACTTTTAAATTTTTTACATTC
ACTTTTTTCATTCAAATCCACTTTTCGCAATTTTTCCATTGGAGCCCCAGGAAATCCATGCAAAATTTTCTATAAAAGTGGCATTGTAA
TAAATTTCAACTTTTAGAGAAAGGCTCTGGGACTGCTTTAGTCACAAAAAATAAATTTGATAAGTGGGTAAAATTTGAATGAAGAA
TTTTTATAAAATACTAAAATTTTTTCATTCATTTTGCAATAAAAAATTTACTTTGAGAAAAAATTTAGCTAAGCTCATTCTGCGTA
AAAAGCATAATTTTAAAGCGTAACTTTTAACATATCATGCATAAAGACTTATATCAGCTTAAACACAACATTTCAATTTTTTTTACTAAC
AAATAACATAAAACTTTAACATTTTTAATATTGATTTATAATTTATTTATAAGCAGTTGATTGAAGCTTTCCAAATGAGAAAAATTGC
CTCATAGCTGCTTTGCATCTTATTAGCAAATCTATTGAGTTTTTTTTAACTTTGTTTTGTTTTGTTTTAATGAGTTCATAAATTATTT
GATAAAATGTAAATCTCTAAGTATTTAATAACCCAGTGAGTAAAAAAGGAAAAAATTTACTAAAGTTAAACAAAATTAATATAAA
CAAAATGATTTTAAAGGTTTCTTAAAGAGGTTAAACAACCCCAAGCAAGTAAAAAATAAAGGGAGATGAGATAAATCTAAGGAGAC
GGGCTGAATCTCAGCAGATCGTAGAAATTTCTACTCTCATGCTTACAATACCCGTTCCATGTTAAGTCGTCTACAAAAGATTTACGTAG
ATGATAATTTGGAATACGATTAGCAGTTAAGGTCAAGCTTTTTTCGCTCTTCCCGCTCTACCTTTCCGAATTAATTTTTTATTTTTTT
CGTTTTATCATCACACTTAGACATTGCTTTCCAGCATGGATTCTGACTTAGAGGCCTTCAGTCATAATCCAACAGATGGTAGCTTCACG
GCATTTGCTTTTTGAGACAACCGTATTTACCAATTATCTGATTAAGTGTTCCTCTCGTACTAACTTAATTTGTCGCAACATCGTT
TCATCAGTAGGGTAAAACTAACCTGTCTCACGACGGTCTAAGCCCAGCTCACGTTCCCTATTAGCGGGTGAACAATCCGACACCGTTG
TGAATTTCTGCTTCACATGATAGGAAGAGCCGACATCGAAGGATCAAAAAGCAACGTCGATATGAATCTTTGGCTGCCACAAGCCAGT
TATCCCTGTGGTAACTTTTCTGACACCTCTAGCTTAAACTTTGTAAGTTTAAAGGATCGATAGGCCACGCTTTTCGCGGTTGTATTCC
TACTGAAATGTTTCCCGTGAGCTTTTACCTTTTGTCTTACCTGAGATTTCCGTTCTCACTGAGCTTGTGCTTTTAAACAGCTCGCT
TATGGTTTAAACAGGCATTTCCGCCCCAGACAACTCCCCCCTAACCATGTCTTCGCAAAATCAGTCAATAAATGACCTTAATCTTAGA
ACTGGTTTGCACCAGTCTTTTCTTCAGGAAATAAGCAAAATGACTAGCTGGGTAGTGGTTTTACAGGATCGATTGCTCTCCCACCTAG
GCTATACCCACGTTGCCATTTACAAAAGTTAGACTAGAGTCAAGCTCAACAGGGTCTTCTTTCCCGCTGATTATTCTAAGCCCGTTT
CCTTATGCTTTTTGAGTTCCTAGATAGATAGGACAGTGAATCTTCCGTTTCCGTTTCCGTTTCCGTTTCCGTTTCCGTTTCCGTTTCCG
ATTTGGCTACCTTACGAGTACTCCAAAATAATCAATATACTTTTCGCATACAAATTAGTTCCAGCGGCTCCAGTGTTCATCACTTC
ATCCGCTAGCTCCCATTAAAGGAGAGGTCCGACTATATCTTTATGAGAAAGAATACATCTTCCCGACCCGACATTTAGTCTGTGAATGCA
TCCATATCAACAGAGATCTGTTGACTTAGGACTTGGCTGCGTGGTTAGGACCATGTCCGTCAGCTTATTACCATAACCTTTTGCAAG
CCATCTCAAAAGTTTCCCGTGAGACTTGGTACTGAACTGACCTGTGATGACCTTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCG
AATCTATTGGTTTAAAGACTAGCTACCAGGTGCATGCCTGATAACTTTTCCCTCCAAAGGTAATAATTGCTATTTAGAGAGTCATAGT
TACTCCGCGCTTTTACCGCGCTTGGTTGAATTGCGTCACTTTGACATTCAGAGCACTGGGCAGAAATCACATTGTGTCTACACCTGT
TGAGGCGGCTCACAATGCTTTGTTTTTATTAACAGTCGGATTACCTTTGTCCGCTTCAGTTCTGAGTTGATCGTTAATTGTATAAAGA
CGGCCGAAACCTACCTTGCAAATTCATCGTTTCGCAAGTCTATCAGCATGTTGCCACACTAACAAACAAGCTTGGATATCATTTACAAAG
CCTTTATACCCGATCTCTCAGAGCCAATCCTTTATCCCGAAGTTACGGATCCAATTTGCCGACTTCCCTTATCTACATTTGTTCTATGGAC
CAGAGGCTGTAAACCTTGGAGACCTGATGCGGTTATGGGTAGCAACTGGCGTGAAATTATGTCTCCCCCAGATTTTCAAGGGTCATCA
GGCGCGCAACTGACAGCTCTTAGGGTGAGCTGCTCTGCCATACATACAGCCGATATCTCTGGATAATCCAATTTTCATGGCCATAGTAT
GTTAAAAAAGAAAAAGATAACTCTTCCAGTGACACCTGCTGAGTGTTCCTGGGTTTTCTTTGCGTTACCGCTATACCCAGCTCCAGCTTGAG
GAATATTAACCTCATTTCCCTTTTGACAACGAAACGAATGTCTTCTGTATTGCAAGGAGTTAACCTATGTCTTAGGATCGAGTAACC
CATGAACAATTTGCTGTTCTCATGGAACCTTTCTCCACTTCGGTCTTCAAAGTCTCATTTGAATATTTGCTACTACCACCAAGATCTC
ACTAATCGCTGCTCCATATAGGCTCACGCCAATACCTTCTAGGCAACAGATCACGCCCTCCCTACTCATCAAAGCCTCGCATTTGCTCTGA
TGGTTGAGTATCGGCACACGCTTTCAGCGCTTTCATTTTACGGCTAGTTTTCATTCGCGAGGTGAGTTGTTACACACTCTTACGCTGA
TTCTAACTTCCATAGCCACCGTCTCTGCTGTCCGATGAAACCAACACCTTTTGTGGTATCTGATGAGCGTGCATTTGGGCGCCTTATCT
CAACGTTAGGTTTCATCCCTCATCGCCAGTTTCTGCTTACCAAAAATGGCCCAACTCAAGAGCACTGCGTTCTTCCCGAGAGTTTATTA
AGTAAACTCCGCGGCTCTTACCAATTTAAAGTTTGAATAAGTTCGAAGTTCTTAGGACTCCCGAGTCTTCAATCATTTTCGTTTACC
TAATAAAAGTGGTTTCTGCTTGTCTTGTCTTCCGTGAGAGAAATCTCGAGGGAACAGCTACTAGATGGTTGATTAGTCTTTCGCCCT
ACACTCAAATTTGACGAACGATTTGACAGCTCAGTATCGCTACGAGCTTCCACCAGAGTTTCCCGTGGCTTACCCCTATTTCAAGCGTAG
TTCACCATCTTTTCGGGTCTTAACAATTAAGCTCTTCCCTCGAACCTTTCGCGGAGACTCAAGGCGGGTGATGCTGCTACCTTGGCGCTT
GGCACCCTGTACTCACTTTCGTTTCGCGGACGGGTTTTTCCACCTTATCACTCGCTTAATTGATAGACTCCTTGGTCCGCTGTTTCAAG
ACGGGTCAAGTAGAAGCAATTTTGACAAAAATCGCCCTTAGGCCCTCATGCTCCAGTTTGAAGTTTTCCTTTGATCTGCACTGCTGCGG
ATCTCAGGTGACTCCTTCAATCTGAACCCATTTTGTCTTCTGACCGGTGTAGCAAGTCTGTGATACATTTCTTACTCATCGACCTTTT
ACGTATCGACTTCGAGTGATTAGTACTTCCCTTATGCGCGGTCCAGTTTATTGCTCTTCTACAGCTTCTTCTCAACGGTTTCAA
GTCTTTTAGCCCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCTTTCGAGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCCCGTGATATTTAGCTTTAG

AGAAGTTTATCTCCCACTTAGGGCTGCAATTTCCAAACAACCCGACTCTTTGAAATCTCCCTTACACCAGCCTTCCTCTCCGACTACGG
GGTTGTCACCTCTTTGACGTCCTGTCCCAAGGAACCTATGAGAGGAGCTTAGTTCAGGTTGACCTTTAGATTACAAATCTGTTGT
GTTGCCACCTCAGATTTTCACTTTGAGCTTTAGCCTGTTTCAGTCTGCCATTACTGGGGCTATCCTAGTTAGTTCTTTCCCTCCGCTT
ACTGATATGCTTAAGTTTCAGCGGGTAATCTTGCTTGTTCAGGTGTAGTGAGAAAAATGTAATTTTTCTATGAGTAGACATAGTGAGCA
TTCGCCTTGATGCCTGAACGAATGTTACATTACTGGAATGTGACTACTTCGTTCTGGCGGCGATTGCTCGACCACCCATCAGCTTTA
ACGAGAGAAGCTTTTGACGGCTTCAATCGCATTAAGATGCGTGATTCTTTCCACACTGAAACAAACATGAAGGTTTTTACACCTCCA
CCACTTGCGTTCAAAGATCTGATGACTCGCGGTCTGCAATTCGCATTGCGTATCGCATTCGCTGCGTCTTCATCGTCACGGGAAC
CTAGATATCCACCGTTGAAAGTTTTCTTTTCGTTTTGGATGTTATCCAGATCTTAGACATATGAAAAATTTTTATTCCACTAGGTGT
GACAAATAAACCTCGAAGAAAAACGAAGTTCTCTTCGAAAGTACATAAGTTAAGGTTTGTTAATTGTGTTAATGATCCATCTGCAGGT
TCACCTACAGATACCTTGTTACGACTTCTTGTTGTTCCAAATGGTAGGGTTTACTTATTTTTCCGCACACATTGCTGTGCGAGTCCAGA
AGGTTTACCAGACCATTCTGTTACTACAAGCGACGGGCGGTGTGTACAACGGCAGGGACATAATCAACGCAAGCTGATGACTTGCAC
TACTAGAAATTCCTCGTTCAAGATCCACAATTTCCAAAGAACATATCCCTAACACGACTGGTATTAATAAGATTACCCGTACCTTCCAG
GACAGGAAATACTTTTTGCGCCAGTCATTGTAACGCGCGTGCGGCCGAGCACGTCTAGGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCTTAAAC
TTCCATTGGCTTATTGCACAATAGTCCCTCTAAGAAGTACAACCTGTTATTTACAAGCAGACTAGTTAGCAGGTTAAGGTCTCGTTTCG
TTAACGGAATTAACGAGACAAATCACTCCACCAACTAAGAAGCGGCATGCACCACCACCCAAAGAATCAAGAAAGAGCTCTCAATCTG
TCAATCGGTTCTCTGCTTTCGCGCTCGTGAGTTTCCCGGTGTTAAGCTGAACATTAAGCCGCAAGTTCCACTTCCATGCTGATGTTCCGTC
AATTCCTTTAAGTTTCAGACTTGCGTACCATACTTCCCCCAGAACCACAAAGACTTTGATTTCTCATACGGTGCCGACTGGACATTTAT
TCCAGCGGATCCCGAGTCGGTATAGTTTATAGTTAAGACTACGACGCTATCTGATCGTCTTTGATCCCTAACTTTTCGTTCTTGATTA
ATGAAACATCTTTGGCAATGCTTTTCGCATTAGTTAGTCTTAATAAATCCAAGAATTTACCTCTGACTATTAATACTAATGCCC
CCAATGCTCCCTATTCAATCATTAACCAATCCAAGAACCTTAGCCTTAGTCTATTCCATTTAGTCTATTCCATTTAGTCTATTGCTCGG
CTAAACCTGCTCGGACACCTCAATTTTTTACAGTAAATGTTTACTCCCTAAGTCGAACCAAGTGAAGGCCGATTTTAGTTTGCAA
ACGTATGTCCAGTTTACACGACGAATCGAAATGAACCTGAACAGAGTTCAACTACGAGCTTTTTAACTGCAACAACCTTTAATATAC
GCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGCTGCTGGCACCATGACTTGCCTTCCAAATGTTCTCTCGCTAAGAGATTTACACTGTTTCTCATTT
CAATTCGGTAGAAGCTGAAGTTTCCAGCTTGCTATTTCTTCTGACTCCCTGAATTAGGATTGGCCAAATTTTCTCTCCGTGCTGCG
CGAACCGTAGTTGTAGTAGCGGTTTCTCAGGCTCCTTCTCCGGAATCGAACCTAATTCCTCGTTACCCGTGACTGCCATGGTAGTCC
AATACACTACCATCGAGAGCTGATAGGGCAGAACTTAGATGATTTATCGAGGTAAACCTCGATCCGATCAGTTACTTTGATTCATCT
CAATCACATTGCTGCGATTGGTCTAATATCTAATAAATACGTTCCGGTCGCGAGCACGGAATTTAAGCATGTATTAGCCCAACAAT
TAGCTCGGTTATCCCATGTAATCTTTAATTATCAAATAAACTATAACTGTTTTAATGAGCCATTGCGAGTTTCCGCTGTTCAATACGAA
CTGGCACATGCATGGGTTAATATTTAAGACAAGCATATGTAAGTGGCAGGATCAACCAGGTTACTATCTCTAAAATTTGCTCGCTATT
TTCGGATTTGATCTTCCAAAGCTTGCTCATTTTTTGAATAGTGTTCAAAAGGTTGGTTTACAAAAGATTAAATAGTTTCATCGAGAA
CTGACGCGTTGTAATAGATCAGTACTCAGCTATATCGTTAGATTAAAGCTTTATACATAGATCCCGCATCGTTTTCGTTTACTATTAGTT
TCTTCTAGTTGCTAAAATCTTCGAAGGCACATGAGAAAACCTGATCGCATCTCTTCGACTCTAGTCAACTTTGTTGCTAGCTGTATAA
TAACATCTGCGATTTTACCGATTTTATAACAGTACTAGCGTGTGCGTTATTTGTAACAATATCTGCATAGATATCGATACAACAAGTG
TCACTGGGAAAAGTTTCTGCGAAGCTTTCGAGTGAATTTACAGCCTTCATGAAAATTTCAAGTCAGGCCATTTGCTCTAATACGAGCT
TAATCCAGAAAAACCTTCAACAGACCTCAGCGGCCATCGACTAAAAGCCGAAGCCATAGAGAAAAACGCTGCTCAGTTAGCGCTTC
ATTATCTGAGTGCCCTCACTCATTTTTTGAAGCGAGTCTGCTTCAATTTTGAAGTGAAGTCAACTCATTTTTTGAAGCGAGTGAATTT
CTTCTTAAATATGCATTTTTTACCCCTGATATTATTTTTATTTTTTTTGGCCAAAGAATTTTTCTCAAAGTCAAAAAAGTTCGGAAGG
TTTACTATTTTTGTTTTTTTTTTTGGCCAAAAAAGACTCTGCCAAAATTTTCAATCCCTTGTAATTTTTTCAAGTTTTTCAATCATTTT
TTCATTTTTTTTCAATTTTCGCTATTTTTTCACTAAGTCTAATTTAATTTAGAGCTGATTTTAAGCTAAATTTTAAAGTGGCTCTGCTGAA
CTTTTGTAGTGCCCTCACTCATTTTTTAAAGCGAGTCTGCTTCAATTTTGAAGTGAAGTCAACTCATTTTTTGAAGCGAGTGAATTT
TCTGTGAGTCCACTTATTTTTGTTTAACTCCGCGAATATTAAGCGAGTCCGCTTAATTTTTTGAAGTGGCTCCACTCATTTTTTAAAGTGA
GTTCACTTAATTTTTTGTAGTACTCCACTCATTTTTATGCGAGTCCACTTAAATATTGAGCGAGTCCGCTCATTTTTTGTAAAGTGGC
TTCACACAAAATCTAAGCGCAATCTCAAAATTTCTCCTAAATCATTTTTTCAATTTTAAAGTCTTTTTTCACTTTTTT
GAAATTTTTTGTAGTCTTTTTTTTTTCAATTTTTTCAAAATTTTCAAGTTTACTATTTTTGTTTTTTTTTGGCCAAAAAATATCTAATGAGCA
TAATGAGCAATTTTCAAAATCAATATTTTTAATCTAGATAAACTTTTTCTTTAAGTCTCTTTTATAACTCTTTATTTAATCAAAAA
AATTTATTTTGAATGTAATTTTAACTAAAAATGAATAAATGAATGATAAATGTTTTTACATATAAAAAATGATATACGATGCT
GTTAAATGTTTTATGTTTTTTTTATATATGTTTTATTTAATTTTACTAGCATTTAAATGATTAAAAAATATAAAATAAATTTACTTT
TTCATGATTTTAAATTTTATAAATTTCTCTAAGTCTTTTTTACTCTTTTTTGTAGTTTTTCTCTAAGCTTTTTTCAAGTCTTTTTT
TTTTTCTAAGTCTTTTTTCAACTCTCAAAAAAGTGAATTTTTTACTATTTTTGTTTTTTTTTGGCCAAAAAATATCTAATGAGCA
ATTTTTCAAAATCAATATTTTTAATCTAGATAAACTTTTTCTTTAAGTTATCTTTATAAAGTCTTTATTTTACCATACCAAAAAAAGT
TTTTTGTGAATGAAAAATTTAATAAATGAATAAATGAATTTGATAAATGTTTTTACATAAAAAATATTTACTCTTTATCTCT
AAAACATTTTCTTTTATTTATAAATGTTTTTACTTTAAATTTCTAGCATTTAAATGTATAAAAAAAGGAAATCTTCTTTGTC
ATTTTTAGATGCTTTTTCTTTAAAAATTTAACTAATTTCTTAAATTTACCTCTTAAAAAATATTTTATCATTTTAAAAATCATATATTTT
ATTAAAAAAGTGTGTTTTAAAGTGAAATGAATTAATTCATTTTAAATTTACTAGCATTAAGTAGTCAAATAGCTAAAAATATGTAATA
TTTTCTCATTTTTTGAACCTATTTTGCTTGAAAAATTTGTAATTTTGAATTTTATCTAATTTAAAAACATTTTACAACATAAAAAAC
AAATATTTTTTGTAAAAATCAATTTTGCTAGTTTATGAGATTAATAAATTAATTTCTATTTGCTACATTTTCACGAGTGAATTAAGCAGAA
TATAAACATCTAATTTCTATCTACTCAAATTTAAATTTTAAACCAATTTATCTCAATTTTAAAGTTATTTTGAAGGTAAATTTCAA
CAACATAGTGTGAAGGCTATAAACTAACAACAAAAAGCAAAAAACCGTACGAGCTATACGTGTAGATGACCCGGGTAAATTAAG
TGCAAGCAAACTTAAAAATATATAAATGAAAAATACTAAAAATTAACAATTCCTTAAATTTATATTGTGAGATATTTTAGCTATG
TAATTTGCAAGCAATATTTGTTTACAAAACATGAATTAATAAACTAAAAAATATTCATTATATAAATAAAAAAGGAACTTTTAAACA
AAATATCTTAATTTCTATATTAATTTATTAATTTTACTTTAAAGAAAAAGAGAAAACTTCTAAATCAAAATTAATTTAATAGAAGT
TTTTAATCTATCTAAATAGTAATAATGTTATATTTGAATAATATAAATTTATCAATAAATAAATACATTTTAGCAAAATATTTATTT
TTATATTTCTGCTGATAATTAAGTGAGTGTATAGCTAATTTTTTAAATTTAAAAATATTTTTAAAAAATTTGGTTGTTGGTTGTG
ATAGATAATTAATTTTGAAGTTTTAGTTTATAATCAATTTTTTTTAAATCTTTCTAAAAATTAATAAAGATTTTTTAAATCTTTCC
TTTTCTTATTTGCTATTAATAATCAATTTATTCATAAAGGATATTTAATAATTTAGAAACATTTTACTGATTTCTAAAATTCCTTTG
TTATTTAAAAATACACTTCAATTAATAAAAAATAAAATTTCCAACAATTTCTATCAGAAATTTTTTTCGCTTTAAACAGCTAAAAAGAA
ATTTGATCAAAAAATAAATCAATTAATTAATAAAAAACAAAAAACCTCTCAACAAAAATCTTCAAAAAGCGACTCAAAACAAATA
ATTAAGAAAGTTTACAAAAATTTCTGGAAAAATAAAGCTGAAGGAATGGTAGGTTAAACATG

CACCATCACCATCACCATTCCCT
ACTATTCCCTTTATCTAGATTATTCGACAACGCTATGTTAAGAGCTCACAGATTACACCAATTAGCTTTTCGACACTTACCAAGAATTTCG
AAGAAGCTTACATTCCATAAGAACAAAAATCTCTTTCTTACAAAACCTTCAAACTCTTTTATGCTTCTCTGAATCTATTCCTACTCC
TTCTAACAGAGAAGAACTCAACAAAAATCTAACTTAGAATTTTAAAGAAATTTCTTTATTTAATTTCAATCTTGGTTAGAACCTGTT
CAATTTCTTAAGATCTGTTTTTCGCTAAGTCTTTAGTTTACGGTGCTTCTGACTCTAACGTTTACGACTTATTAAGAAGCTTAGAAGAAG
GTATTCAAACCTTAATGGGTAGATTAGAAGACGGTTCTCCTAGAAGTGGTCAAATTTTCAAACAACTTACTCTAAATTCGACACTAA
CTCTCACAACGACGAGCTTTATTAATAAACTACGGTTTATTATACGTCTCAGAAAAGACATGGACAAAGTTGAAACTTTCTTAAGA
ATTGTTCAATGCAGATCTGTTGAAGGTTCTTTCGGTTTCTGAGGCGCGGATCCTTAAATTAATAAATTCATATATATTTTACAACT

TTCATATAAAATAAATATATTATATATAAAATTAATTTTTAGTGTATTATATTAACATTAAAGCACCAAAAAACGTGTTAATATACTAC
TATAAAATATATATTTATCCAAATTGACTAAAATCATTATTTTACAACCTCATTGTATATATATTTTATGTCAATTATTTTTTTTAAAC
TTTCTAAAAAATAATCCTCTTCACATACATGTTAGCTCTTAAAAATTTGCTGCAAAATCCAATAATAATATTTTTTTTGCCATTA
AATTTTCAAATTTTTTACTGGAAAAATGACGCGATCGCATTGGCCGGCCATTTCGATATACAATTTATTTCTAAAAAATAATTA
AAAAAATAATAAGGGTTTTGAATAACTCCTTTAATTTAAATACACATTTTTAAATTTTTTTTTTAGCTCTTTAAATATTCATAAAAAATA
AAAAATAACTAACTAAAAATAAATAAAAAAGATAATAATGATTAAAGGTATAATACTGAATAAGAAAAACATAATAGAGTACTTATTT
TTTATATCACATTTTTTAATATCTTGAAAGCAAACTTTTTTATATATCTTAAAAATATATTGTATCGTTTATTC AATTATTTTCTTTA
AATTTCAAATATATTGATAAAAAAGATGACATGTTTTTTAAAGAAAACATGAAATATAAAAAATAGATAAATATCAATTATTTTATTTAT
TAAATATATAAGCTGCTCAAAACATAGCTCATTCATCAATTATAATATGTGAATCATTAATTTTCAAATATTACTCATTTATTTAGGC
TATCATTTATTTTTATTTTCAATTATCCGTTTCTATATATTTTTAATATTAAGTTGTGATTCTTGAATTTTGTGTGCATGAATTATTT
GTAATCTTTTTATTTCTGATAAAAAATAAAATGATTGACTCATGATTAAATCATGAGTCAACCTAACTAAATTTTCAAATCTTT
CTATTTCTAAAAATATAGATGTTGATTCTTGAATCTCTCTGAAATATAAAGTAATTTTTTATATTTCTGATATAAATCTTAGCTACGTGAT
TCACGATTTATACAATGATCCATATAAAAAATGTAATAGTGTATATATATATATTTCTGCTTTTTTATTCTTTATATAATTTAAAAA
AATTAAAAAAATTTAATAAAGCTCTAATAAAATAAAATAAATACTAACTTAAAAATAATGATTGAACAAGATGGTTTACACGCTGGT
TCTCCCGCGCTTGGGTGCAAGAGCTTTTCGGTTATGACTGGGCTCAACAACCATCGGTTGCTCTGATGCCGCGCTCTCCGCTCTTT
CTGCTCAAGGTCGCTGTTCTTTTCGTC AAGACCGACCTTTCTGCGCCCTTAATGAACCTCAAGATGTAAGGCCGTGGGCTCCGCTCTTG
GCTTGCCACCACCGGTGTTCTTTCGCTGCTGCTCTTGACGTTGTCACTGAAGCCGGTAGAGACTGGCTCTTTTAGGTGAAGTCCCC
GGTCAAGATCTTCTTTCTTCTCACCTTGCTCCTGCCGAAAAAGTTTCTATCATGGCTGATGCTATGCGTCGCTTTCATACCCCTTGATC
CCGCTACCTGCCCTTTTCGACCACCAAGCCAAACATCGTATCGAAGCTGCTCGTACTCGTATGGAAGCCGGCTTGTGCGATCAAGATGA
TCTTTACAGAACGATTAAGTCTTGCCCTGCCGAACTTTGCGCCGCTTACGAGCTTAAGGCCGTGATGCCGCGCTCTGCTGCTGCT
ACCCATGGTGATGCTTACCCAAATATCATGGTTGAAAAATGGTCGTTTTTCTGGTTTCATCGACTGTGGTCGCTTGGTGTCGCCG
ACCGTTATCAAGATATTGCCTTAGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAAGCTGGTGGTGAATGGGCTGACCGTTTCCCTGTCTTTACGG
TATCGCCGCTCCCGATTCTCAACGTATCGCCTTCTATCGCTCTTTGACGAATCTTCTGAGATCCTTAAATTAATAATCAATAT
ATTTTACAGACTTTTATATAAAATAAATATATATATAAATTAATTTATTTAGTGTATTATATTAACATTAAGCAAGAAAAAATCGTGT
TAATATACTACTATAAAATATAATTTATTCCAAATTGACTAAAATCATTATTTTACAACCTCATTGTATATATATTTTATGTCAATTA
TTTTTTTTTAACCTTTCTAAAAAATAAATTTCTCTTCACATACATGTTAGCTCTTAAAAATTTGTCTGCAAAATCCAATAATAATATTTT
TTTTTGGCATTAAATTTTCAAATTTTTTACTGGAAAAATGCAGTCGACTATCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC
TGTTTTCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAATTCCACACACACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTCCGCTAATG
AGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTTCAGTCGCGGAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGC
CAACGCGCGGGGAGAGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCCGCTCGGTGCTGCGCTGCGCG
GAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAGAACAATGTGAGCAAAAGGCCA
GCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCCTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGC
TCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGA
CCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCCTTTCGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCT
GGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATATCGTCTT
GAGTTATCAACAAAAGGATCTTACCTAGATCTTTTAAATTTAAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATAGTAAAGCTTGT
CAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGG
AAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGGCGAGA
AAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTACGTTAAGGGATTTTGGTCA
TGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCTTTTAAATTTAAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATAGTAAAGCTTGT
GTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTATCCATAGTTGCGCTGACTCCCCGTC
GTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATT
TATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTG
CCGGGAAGCTATTTCCCGAAAGTGCACCTGACGCTCTAAGAACCATATTATCATGACATTAACCTATAAAATGAGCGGTATCAC
GAGGCCCTTTTCGCTCTCGCGCTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAA
GCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGCTGGCTTAACATATGCGGCATCAGAGC
AGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCCATTGCCCAT
CAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGCTTCTCGTATTACCGCAGCTGCGGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGA
TTAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCATAGGTACCGAATTTCTAC
GATCTGCTGAGATTACGCCGCTCTCCTTAGATTTATCTCATCTCCCTTTATTTTTTACTTCTGCTGGGGTTGTTAACCTCTTTAAGAA
ATTTTTTTTATTTTGATTTGTTTAAATTTAATTTTGTTTAACTTTAGTAAATTTTTTCTCTTTTCTACTCCACTGGGGTTATTAATA
CTTAGAGATTTTTTATTTTTTCAAAATAATTTATGAACCTCATTTAAACAAAAACAAAGTAAAAAATACTCAATAGATTGCTA
ATAAGATGCAAGCAGCTATGAGGCAATTTTTCTCATTTGGAAGGCTTCAATCAACTGCTTATAAATAAATTAATAATCAATATTA
AATGTTAAAGTTTTATGTTATTTGTTAGTAAAAAATGAATAGTTGTGTTAAGCTGATATAAGTCTTTATGCATGATATGTTAAAA
GTTACGCTTAAAAATTATGCTTTTTACGCAGAAATGAGCTTAGCTAATTTTTTCTCAAAGTAAATTTTTTTTAAATGCAAAATGAATGAA
AAAATTTTAGTATTTTAAAAAATTTCTCATCAAAATTTTACCACCTATTAATTTATTTTCTTGACTAAAGACGATCCAGGCT
CTTTTCTCTAAAAAGTTGAATTTTATTAACAATGCCACTTTTATAGAAAAATTTGCGATGGATTTCCTGGGGCTCCAATGGAAAAATTC
GAAAGTGGATTTTGAATGAAAAAGTGAATGTAAAAATTAAGTAAAAATTTGCTTTTAAAAATGAATGAAAAATTTAAAAACAAGCAAAA
TGAATGAAAAAATCTTTGCATTTTAAACAAAAATTTTCATTCAAAATTTTACCACCTTTATCAATAACTTTTTTTTTTCCCCAGCCCGT
CAAAAGACCTTATTTGTTTCTTAAAGTTGACTTTTTTAAAGAAACAAATGAATGAAAAATCTTTGTTATGACAAAGATTT
TTCATTCAAAAATTTTACCACCTTATCAATATATTTTTTTTTAAGTCCCTGCCTGCAGGCTAATATCTTTTCTTAAAGTTGACTTTTAT
AAGAAGCAAAATGAATGAAAAATCTTTGTATTTTAAACAAATTTTTCATTCAAAATTTTACCACCTTATCAATATTTTTTTTTGGGAC
CAACCAAAAAGACCTAAAGATTTGATTTAAAAAGTTGACTTTTTTCAAGAAAAACCTTTATAGATAAATCTCTTTTACCACGGC
TGTGCTCAATGAATTTGCTAAAGTGGATTGAATAAAAAATTTTTTGGCTGTAATAAATGCGCTAACTACGCTAGATTCTTTAACTT
TATCCCACTTTAATTTCAAGCGTAAAAATAAAAAATCCACACAAAAATTAAGTGGAATTTGATGCAAAAAATTTCACTAAAAATTTAAT
CAATAAATATGAAAAATGGTTGATCTCTATAATTTATGAGATTGCAATTTAAGGCTTATAAGAAATTTTAAATTAACGGCGAAG
CTTCATTTTTAGATAAAATTTATTAATCATCATTAATTTCTTGAAAAACATTTTATTTATTGATCTTTTATAACAAAAAACCTTCTA

AAAGTTTATTTTGAATGAAAACTTATAAAAAATTTATGAAAACCTACAAAAATAAAATTTTAAATTTAAATAATTTTGATAAGAACT
TCAATCTTTGACTAGCTTAGTCATTTTGGAGATTTAATTAATATTTTATGTTTATTCATATATAAACTATTCAAAATATTATAGAATT
TAAACATTTTAAACATCTTAATCATTGATAAAATAACCAAAAAATCAAAGTATTACATCAATAAAATAACTTTTACTCAATGTCAAAGAAAT
TATTATAGGGCCCGTAACTGCTGCTGGAATTACACATGGCATGGATGAATTATACAAAGGTACCGTCTTCTGAGGTACCCCTTATCTAA
ATGAACAACACTTAAATAAATATAAATTAAGAACGTACTTATATTTAAATAAATCTCGAAATTTTCTAATTACTATTATTTTATTT
TTTATACTTATGTCAAACAATACATAGACATCATATGGATTACACAACATAAAAGTATTGGAGTAATAAACACTACGCGCCCCAGGGCCG
TCGTTTTCAACGTCGTGACTGGGCAAACCCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCGAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAAT
AGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAATTTGTAAGCGTTAATATTATAGAATT
TAAACATTTTAAACATCTTAATCATTCAATAAATAACTAAAAATCAAAGTATTACATTCATAAATAACTTTTACTCAATGTCAAAGAAA
TTATTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGG
TTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGG
GGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTT
GGGGTTGGGGTTGGGAAACAGCATTCAAGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAAGTGAAAATATTGTTGATGCGCGGGATCGGCCTAGG
CGGCCCGCATCTCGGGGACACCAATATGGCGATCTCGGCCTTTTCGTTTCTTGAGCTGGGACATGTTTGCCATCGATCCATCTAC
CACCAGAACGCCGTTAGATCTGCTGCCACCGTTGTTTCCACCGAAGAACCACCGTTGCCGTAACCACCACGACGGTTGTTGCTAAAG
AAGCTGCCACCGCCACGGCCACCGTTGTAGCCGCCGTTGTTGTTATTGTAGTTGCTCATGTTATTTCTGGCACTTCTTGGGTTTCCCTC
TTAAGTGAGGAGGAACATAACCATTCTCGTTGTTGTCGTTGATGCTTAAAT



>pTtAC2-PLA22-hGH

TTGCACTTGTTCGCTCAGTTTCAGCCATAATATGAAATGCTTTTCTTGTGTGTTCTTACGGAATACCACTTGCCACCTATCACCACAACCT
AACTTTTTTCCCGTTCCTCCATCTCTTTTATATTTTTTTTCTCGATCGAGTTCAAGAGAAAAAAGAAAAAGCAAAAGAAAAAAGG
AAAGCGCGCCTCGTTTCATAGAAAAAGAAAAATTGCGGGAAAGAGACTGTGTTATGACTTCCCTGACTAATGCCGTGTTCAAACGATACCT
GGCAGTGACTCCTAGCGCTCACCAAGCTCTTAAAACGAGAATTAAGAAAAAGTCGTCATCTTTCGATAAGTTTTTCCCACAGCAAAGC
AATAGTAGAAAAAAACAATGGGAAACGTTGAATGAAGACAAAGCGTCGTGGTTTAAAGGAAATACGCTCAGCTACATGCTAGGGAAC
AGGACCGTGACGCGGATCGGCCTAGGCGGCGCGATCCCGCGCATCAACAATATTTTCACTGAATCAGGATATCTTCTAATACCTG
AATGCTGTTTTTCCACCCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAAC
CCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCA
ACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCC
CAACCCCAACCCCAACCCCAATAATTTCTTTGACATTGAGTAAAAGTTATTTATTGAATGTAATACTTTGATTTTGTAGTTATTTATGA
ATGATTAAGATGTTAAATGTTTAAATTTCTATAATATTGAAAAAGGAAGAGATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCC
TTTTTTCGCGCATTTTGCCTTCCTGTTTTGCTCACCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAG
TGGGTTACATCGAATCGGATCTCAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAA
AGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGT
GTTGAGTACTACCAAGATACTCGAGCCCAATAATTTCTTTGACTTGAAGTAAAAGTATTTATTGATGAGTAAAAGTATTTATTGATCTTTGGT
TATTTATCAATGATTAAGATGTTAAATGTTTAAATTTCTATAATATTTTGAATAGTTTATATATGAATAAACATAAAATATTAATTA
ATCTCAAAAAATGACTAAGCTAGTCAAGAGATTGAAGTTCTTATCAAAATATTTTAAATAAAAAATTTTATTTTTTGTAGTTTTTATAAA
TTTTTATAAGTTTTTTCATTCAAAAATAAACTTTTAGAAGGGTTTTTGTGTATAAAAGATCAATAAATAAAATGTTTTTCAAGAAATTA
TAAATGATCAATAAATTTTATCTAAAAATGAAGCTTCGCGTTTTTAAATTTTCAATTTTATAAAGCTTAAATGATGAAATCTTTGTTA
ATTATAGAGATCAACCATTTTTACATATTTTATGAATTAAATTTTAGTGAAATTTTTGCATCAATTTCCACTTAATTTTTGTGTGGGA
TTTTTATTTTTACGCTTGAAATTAAGTGGGATAAAGTTAAATCTAAGCGTAGTTTAGCGCATTTTTTACACGCAAAAAAATTTTTAT
TCAAATCCACTTTTAGCAAATTTATTCATTGGACAAGCCGTGGTAAAAAAGAGATTTATCTAATAAAGTGGTTTTCTTGAAAAAAGTGA
CTTTTAAATCAAAATCTTTAGTCTTTTTGGTGTGGTAAAAAAGATTTGATAAGTGGGTGAAATTTTGAATGAAAAATTTTGGTTA
AAATACAAAGATTTTTTCATTCATTTTGTCTTCTAATAAAAGTCAACTTTTAGGAAAGAATATTAGCCTGCAGGCAGGACTTAAAAAA
AATATATTGATAAGTGGGTGAAATTTTGAATGAAAAATTTTGTATAAATACAAAGATTTTTTCATTCATTTTGTTCCTAATAAAAGT
CAACTTTTAGGAAAAACAATATAGGTCTTTGACGGCTGGAGAAAAAAGTATTGATAAGTGGGTGAAATTTTGAATGAAAAATTTTGT
TAAATGCAAAAGATTTTTTCATTCATTTTGTCTGTTTTTAAATTTTCAATTTTATAAAGCAAAATTTTACTTTTAAATTTTTTACATTC
ACTTTTTTCATTCAAATCCACTTTTCGCAATTTTTCCATTGGAGCCCCAGGAAATCCATGCAAAATTTTCTATAAAAGTGGCATTGTAA
TAAATTTCAACTTTTAGAGAAAGGCTCTGGGACTGCTTTAGTCACAAAAAATAAATTTGATAAGTGGGTAAAATTTGAATGAAGAA
TTTTTATAAAATACTAAAATTTTTTCATTCATTTTGCATTAAAAAATTTACTTTGAGAAAAAATTTAGCTAAGCTCATTCTGCGTA
AAAAGCATAATTTTAAAGCGTAACTTTTAACATATCATGCATAAAGACTTATATCAGCTTAAACACAACATTTCAATTTTTTTTACTAAC
AAATAACATAAAACTTTAACATTTTTAATATTGATTTATAATTTATTTATAAGCAGTTGATTGAAGCTTTCCAAATGAGAAAAATTGC
CTCATAGCTGCTTTGCATCTTATTAGCAAATCTATTGAGTTTTTTTTTAACTTTGTTTTGTTTTGTTTTAATGAGTTCATAAATTATTT
GATAAAATGTAAATCTCTAAGTATTTAATAACCCAGTGAGTAAAAAAGGAAAAAATTTACTAAAGTTAAACAAAATTAATATAAA
CAAAATGCAAAATTTTAAAGCGTAACTTTTAAAGAGGTTAAACAACCCAGCAGAAAGTAAAAAATAAAGGGAGATGAGATAAATCTTAAGGAGAC
GGGCTGAATCTCAGCAGATCGTAGAAATTTCTACTCTCATGCTTACAATACCCGTTCCATGTTAAGTCGTCTACAAAAGATTTACGTAG
ATGATAATTTGGAATACGATTAGCAGTTAAGGTCAAGCTTTTTCGCTCTTCCCCGCTCTACCTTTCCGAATTTAATTTTTTATTTTTTT
CGTTTTATCATCACACTTAGACATTGCTTTCCAGCATGGATTCTGACTTAGAGGCCTTCAGTCATAATCCAACAGATGGTAGCTTCACG
GCATTTGCTTTTTGAGACAACCGTATTTACCATTATCTGATTGAAGTGTTCCTCTCGTACTAATTAATCTGTCGCAACATCTGCTT
TCATCAGTAGGGTAAAACTAACCTGTCTCACGACGGTCTAAGCCCAGCTCACGTTCCCTATTAGCGGGTGAACAATCCGACACCGTTG
TGAATTTCTGCTTCACATGATAGGAAGAGCCGACATCGAAGGATCAAAAAGCAACGTCGATATGAATCTTTGGCTGCCACAAGCCAGT
TATCCCTGTGGTAACTTTTCTGACACCTCTAGCTTAAACTTTGTAAGTTTAAAGGATCGATAGGCCACGCTTTTCGCGGTTGTATTCC
TACTGAAATGTTTTCCCTGAGACTTTGGTACTGAAACGCTTTGTACCTTTGACCTTTCCGTTCTCACTGAGACTTTCGAGCGCTGCGT
TATGGTTTAAACAGGCATTCCGCCCCAGACAACTCCCCCCTAACCATGTCTTCGCAAAATCAGTCAATAAATGACCTTAATCTTAGA
ACTGGTTTGCACCAGTCTTTTCTTCAGGAAATAAGCAAAATGACTACGTGGGTAGTGGTTTTACAGGATCGATTGCTCTCCCACCTAG
GCTATACCCACGTTGCCATTTACAAAAGTTAGACTAGAGTCAAGCTCAACAGGGTCTTCTTTCCCGCTGATTATTCTAAGCCCGTTT
CCTTATGCTTTTTGAGTTCGCTAGATAGATAGGACAGTGAATCTCAATTAATCCATTCATGCGCGCTACCTAATGACGATCAGCGG
ATTTGGCTACCTTACGAGTACTCCAAAATAATCAATATACTTTTCGCATACAAATTAGTTCCAGCGGCTCCAGTGTTCATCACTTC
ATCCGCTAGCTCCCATTAAAGGAGAGGTCCGACTATATCTTTATGAGAAAGAATACATCTTCCCCGACCGACATTTAGTCTGTGAATGCA
TCCATATCAACAGAGATCTGTTGACTTAGGACTTGGCTGCGTGGTTAGGACCATGTCCGTCAGCTTATTACCATAACCTTTGCAAG
CCATCTCAAAAGTTTTCCCTGAGACTTTGGTACTGAAACGCTTTGTACCTTTGACCTTTCCCGCAATTTGACGGTGTGCTTTTAAACCGCATGC
AATCTATTGGTTTAAAGACTAGCTACCAGGTGCATGCCTGATAACTTTTCCCTCCAAAGGTAATATTGCTATTTAGAGAGTCAATAGT
TACTCCGCGCTTTTACCCGCGCTTGGTTGAATGCGTCACTTTGACATTTCAGAGCACTGGGCAGAAATCACATTGTGTCTACCTGT
TGAGGCGGCTCACAATGCTTTGTTTTATTAAACAGTCGGATTACCTTTGTCCGCTTCAGTTCTGAGTTGATCGTTAATTGTATAAAGA
CGGCCGAAACCTACCTTGCAAATTCATCTTCGCAAGTCTATCAGCATGTTGCCACACTAACAAACAAGCTTGGATATCATTTACAAAG
CCTTTATACCCGATCTCTCAGAGCCAATCCTTTATCCCGAAGTTACGGATCCAATTTGCCGACTTCCCTTATCTACATTGTTCTATGGAC
CAGAGGCTGTAAACCTTGGAGACCTGATGCGGTTATGGGTAGCAACTGGCGTGAAATTATGTCTCCCCCAGATTTTCAAGGGTCATCA
GGCGCGCAACTGACAGCTCTTAGGGTGAGCTGCTCTGCCATACATACAGCCGATATCTCTGGATAATCCAATTTTATGGCCATAGTAT
GTTAAAAAAGAAAAAGATAACTCTTCCAGTGACACCTGCTGAGCTTTCCGGGTTTTCTTTGCGTTACCGCTATACACAGCTCCAGCTTGAG
GAATATTAACCTCATTTCCCTTTTGACAACGAAACGAATGTCTTCTGTATTGCAAGGAGTTAACCTATGTCTTAGGATCGAGTAACC
CATGAACAATGCTGTCTCTATGGAACCTTCTCCACTTCGGTCTTCAAAGTCTCATTTGAATATTGCTACTACCACCAAGATCTC
ACTAATCGCTGCTCCATATAGGCTCACGCCAATACCTTCTAGGCAACAGATCACGCCCTCCCTACTCATCAAAGCCTCGCATTTGCTCTGA
TGGTTGAGTATCGGCACACGCTTTCAGCGCTTTCATTTTACGGGCTAGTTTTCATTCGCGAGGTGAGTTGTTACACACTCTTACGCGGA
TTCTAACTTCCATAGCCACCGTCTCTGCTGTCCGTATGAACCAACACCTTTTGTGGTATCTGATGAGCGTGCATTTGGGCGCCTTATCT
CAACGTTAGGTTTCATCCCTCATCGCCAGTTCTGCTTACCAAAAATGGCCCAACTCAAGAGCACTGCGTCTTCCCAGAGGTTTCAATTA
AGTAAACTCCGCGGCTCTTACCAATTTAAAGTTTGAATAAGTGTGCAAGTTCTTAGGACTCCCGAGTCTTCAATCATTTCCGTTTACC
TAATAAAAGTCCGTTTCTGCTTTGCTTCTGCTTACCTGAGAGAAATCTCGGAGGAAACAGCTACTAGATGAGTTGATAGTCTTTCCGCCCT
ACACTCAAATTTGACGAACGATTTGACAGCTCAGTATCGCTACGAGCTTCCACCAGAGTTTCCCTTGCGTTTACCCCTATTCAAGCGTAG
TTCACCATCTTTCCGGTCTTAACAATTAAGCTCTTCCCTCGAACCTTTCGCGGAGACTCAAGCGGGGTGATGTGCTACCTTGGCGCTT
GGCACCTGTACTCACTTTCGTTTCGCGGACGGGTTTTTCCACCTTACTCACTCGCTTAATTGATAGACTCCTTGGTCCGCTGTTTCAAG
ACGGGTAGTGAAGCACTTTTGACAAAAATCGCCCTTAGGCCCTCATGCTCCAGTTTGAAGTTTTCCTTTGATCTGCACTGCTGCGG
ATCTCAGGTGACTCCTTCAATCTGAACCCATTTTGTCTTCTGACCGGTGTAGCAAGTTCTGTACCATTTTCTTACTCATCGACCTTTT
ACGTATCGACTTCGAGTGATTAGTACTTCCCTTATGCGCGCTCCAGTTTATTGCTCTTCTACAGCTTCTTCTCAACGGTTTCAA
GTCTTTTAGCCCTCTTTTCAAAGTTCTTTTTCATCTTTCTTTCGACAGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCCCGGTGATATTTAGCTTTAG

AGAAGTTTATCTCCCACTTAGGGCTGCAATTCCAAACAACCCGACTCTTTGAAATCTCCCTTACACCAGCCTTCCTCTCCGACTACGG
GGTTGTCACCTCTTTGACGTCCTGTCCCAAGGAACCTATGAGAGGAGCTTAGTTTTAGGTTGACCTTTAGATTACAAATCTGTTGT
GTTGCCACCTCAGATTTTCACTTTGAGCTTTAGCCTGTTTCAGCTTACGCCATTACTGGGGCTATCCTAGTTAGTTTTCTCCCGCT
ACTGATATGCTTAAGTTTCAGCGGGTAATCTTGCTTGTGTTTTCAGGTGTAGTGAGAAAAATGTAATTTTTCTATGAGTAGACATAGTGAGCA
TTCGCCTTGATGCCTGAACGAATGTTACATTACTGGAATGTGACTACTTCGTTCTGGCGGCGATTGCTCGACCACCCATCAGCTTTA
ACGAGAGAAGCTTTTGACGGCTTCAATCGCATTAAGATGCGTGATTCTTTCCACACTGAAACAAACATGAAGGTTTTTACACCTCCA
CCACTTGCCTTCAAAGATCTGATGACTCGCGGTCTGCAATTTCGATTGCGTATCGCATTTTCGCTGCGTCTTCATCGTCACGGGAAC
CTAGATATCCACCGTTGAAAGTTTTCTTTTCGTTTTTGGATGTTATCCAGATCTTAGACATATGAAAAATTTTTATTCCACTAGGTGT
GACAAATAAACCTCGAAGAAAAACGAAGTTCTCTTCGAAAGTACATAAGTTAAGGTTTGTTAATTGTGTTAATGATCCATCTGCAGGT
TCACCTACAGATACCTTGTTACGACTTCTTGTTGTTCCAAATGGTAGGGTTTACTTATTTTTCCGCACACATTGCTGTGCGAGTCCAGA
AGGTTTACCAGACCATTCTGTTACTACAAGCGACGGGCGGTGTGTACAACGGCAGGGACATAATCAACGCAAGCTGATGACTTGCAC
TACTAGAAATTCCTCGTTCAAGATCCACAATTCCAAAGAACATATCCCTAACACGACTGGTATTAATAAGATTACCCGTACCTTCCAG
GACAGGAAATACTTTTTGCGCCAGTCATTGTAACGCGCGTGCGGCCGAGCACGTCTAGGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCTTAAAC
TTCCATTGGCTTATTGCACAATAGTCCCTCTAAGAAGTACAACCTGTTATTTACAAGCAGACTAGTTAGCAGGTTAAGGTCTCGTTTCG
TTAACGGAATTAACGAGACAAATCACTCCACCAACTAAGAAGCGGCATGCACCACCACCCAAAGAATCAAGAAAGAGCTCTCAATCTG
TCAATCGCTTCTCTGCTTTCGCGCTCGTGAGTTTCCCGGTGTTAAGCTTAAGCCGCAAGTTCCACTTCCATGCTGCTGATGTTCCGTC
AATTCCTTTAAGTTTCAGACTTGCGTACCATACTTCCCCCAGAACCACAAAGACTTTGATTTCTCATACGGTGCCGACTGGACATTTAT
TCCAGCGGATCCCGAGTCGGTATAGTTTATAGTTAAGACTACGACGCTATCTGATCGTCTTTGATCCCTTAACCTTTCGTTCTTGATTA
ATGAAACATCTTTGGCAATGCTTTTCGCATTAGTTAGTCTTAATAAATCCAAGAATTTACCTCTGACTATTAATACTAATGCCC
CCAATGCTTCCCTATTCAATCATTAACAAATCCAAGAACCTTAGCCAGTTAGTCTTATTCATTTCTAGTCTTCCATGCTGCTGCTGGG
CTAAACCTGCTTGGACACTCTAATTTTTTTCACAGTAAATGTTTACTCCCTAAGTCGAACCAAGTGAAGGCCGATTTTAGTTTGCAA
ACGTATGTCCAGTTTTCACACGACGAATCGAATGAACCTGAACAGAGTTCAACTACGAGCTTTTTAAGTGAACAACCTTTAATATAC
GCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGCTGCTGGCACCATGACTTGCCTTCCAAATTGTTCTTCGCTAAGAGATTTACACTGTTTCTCATTT
CAATTCGGTAGAAGACGTAAAGTTTCCAGCTTGTCTTCTGCTTCTGCTTCCCTGCTTCCGCAATTTAGGATTTAGGCAATTTCTCTCCGTCG
CGAACCGTAGTTGTAGTAGCGGTTTCTCAGGCTCCTTCTCCGGAATCGAACCTAATTCCTCGTTACCCGTGACTGCCATGGTAGTCC
AATACACTACCATCGAGAGCTGATAGGGCAGAACTTAGATGATTTATCGAGGTAAACCTCGATCCGATCAGTTACTTTGATTCATCT
CAATCACATTGCTGCGATTGGTCTAATATCTAATAAATACGTTCCGGTCGCGAGCACGGAATTTAAGCATGTATTAGCCCAACAAT
TAGCTCGGTTATCCCATGTAATCTTTAATTATCAAATAAACTAATACCTGTTTAAATGAGCCATTGCGAGTTTCCGCTGTTCAATACGAA
CTGGCACATGCATGGGTAAATATTTAAGACAAGCATATGTAAGTGGCAGGATCAACCAGGTTACTATCTCTCAAATTTGCTCGCTATT
TTCGGATTTGATCTTCCAAAGCTTGCTCATTTTTTGAATAGTGTTCACAAAGGTTGGTTTACAAAGATTAAATAGTTTCATCGAGAA
CTGACGCGTTGTAATAGATCAGTACTCAGCTATATCGTTAGATTAAAGCTTTATACATAGATCCCGCATCGTTTTCGTTTACTATTAGTT
TCTTCTAGTTGCTAAATCTTCGAAGGCACATGAGAAAACCTCTATCGCATCTCTTCGACTCTAGTCAACTTTGTTGCTAGCTGTATAA
TAACATCTGCGATTTTACCGATTTTATAACAGTACTAGCGTGTGCGTTATTTGTAACAATATCTGCATAGATATCGATACAACAAGTG
TCACTGGGAAAGTTTCTGCGAAGCTTTCGAGTGAATTTACAGCCTTCATGAAATTTTCAGTCAGGCCATTTGCTCTAATACGAGCCT
TAATCCAGAAAAACCTTCAACAGACCTCAGCGGCCATCGACTAAAAGCCGAAGCCATAGAGAAAAACGCTGCTCAGTTAGCGCTTC
ATTATCTGTTTCTTGGTTGCCCCAAAGGAATCTTACTGAAGCTCAACTGAGCTGATATTTTATTTTGTAGTCGGAGATTTTCC
CTTCTTAAATATGCATTTTTTACCCCTGATATTATTTTTATTTTTTTTGGCCAAAGAATTTTTCTCAAAGTCAAAAAAGTTCGGAAGG
TTTACTATTTTTGTTTTTTTTTTTGGCCAAAAAAGACTCTGCCAAATTTTCAATCCCTTGTAATTTTTTCAGTTTTTCATTATTTTT
TTCATTTTTTTCATTTTTTCGCTATTTTTTCACTAAGTCTAATTTAATTTAGAGCTGATTTTAAGCTAAATTTTTAAGTGGCTCTGCTGAA
CTTTTGTAGTGGCTCCACTATTTTTTAAAGCGAGTCTGCTTCAATTTTGTAGTGAGTCCACTCATTTTTTTCAGCTTCCGCTTAAATTT
TCTGTGAGTCCACTTATTTTTGTTTAACTCCGCGAATATTAAGCGAGTCCGCTTAATTTTTTGTAGTGGCTCCACTCATTTTTAAGTGA
GTTCACTTAAATTTTTTAGTGACTCCACTCATTTTTATGCGAGTCCACTTAAATATTTGAGCGAGTCCGCTCATTTTTTGTAAAGTGGC
TTCACACAAAATCTAAGCGCAATCTCAAAATTTCTCCTAAATCATTTTTTCATTTTTTAAATTTTTTCTAAGTCTTTTTTCACTTTTT
GAAATTTTTTGTAAAGTCTTTTTTTTTTTCATTTTTTTCAAAAATTTTCAAGTTTACTATTTTTGTTTTTTTTTGGCCAAAAAATATCTAATGAGCA
TAATGAGCAATTTTCAAAATCAATATTTTTTAATCTAGATAAACTTTTTCTTTAAGTCTCTTTTATAACTCTTTATTTAATCAAAAA
AATTTATTTGAATGTAATTTAATCAAAATGAATAAATGAATGAAATGATAAATGTTTTTACATATAAAAAATGATATACGATGCT
GTTAAATGTTTTATGTTTTTTTTTATATATGTTTTATTTAATTTTACTAGCATTTAAATGATTAAAAAATATAAAATAAATTTACTTT
TTCATGATTTTATTTATATAAATTTCTCTAAGTCTTTTTTATCTTTTTTGTAGTTTTTCTCTAAGCTTTTTTCTAAGCTTTTTTCTGTC
TTTTTCTAAGTCTTTTTTCAACTCTCAAAAAAGTGATTTTTTACTATTTTTGTTTTTTTTTGGCCAAAAAATATCTAATGAGCA
ATTTTTCAAAATCAATATTTTTAATCTAGATAAACTTTTTCTTTAAGTTATCTTTATAAAGTCTTTATTTTACCATACCAAAAAAAGT
TTTTTGTGAATGAAAAATTTAATAAAATGAATAAATGAATTTGATAAATGTTTTTACATAAAAAAACTATTTACTCTTTATCTCT
AAAACATTTTACTTTTATTTATAAATGTTTTTACTTTAAATTTCTAGCATTTAAATGTATAAAAAAAGGAAATCTTACTTTGCTC
ATTTTTAGATGCTTTTTCTTTAAAAATTTAATAATTTCTTAAATTTACCTCTTAAAAAATATTTTATCATTTTAAAAATCATATATTTT
ATTAATAAAGTGTTTTTAAGTGAAATGAATTAATTCATTTTAAATTTACTAGCATTAAGTAGTCAAATAGCTAAATATGTAATA
TTTTCTCATTTTTTGAACCTATTTTGCTTGAAATTTGTAAATTTGTAAATTTTATCTAATTTAAACATTTTACAACATAAAAAAC
AAATATTTTTTGTTTTTAAATACTATTTTGCTAGTTTATAGATTTAAATTAATTTCTATTTGCTACATTTTCACGAGTGAATTAGCAGAA
TATAACATCTAATTTCTATCTACTCAAATTTAAATTTTAAACCAATTTATCTCAATTTTAAAGTTATTTTGAAGGTAAATTTCAA
CAACATAGTGCTGAAGGCTATAAACTAACAACAAAAAGCAAAAAACCGTACGAGCTATACGTGTAGCATGACCCGGGTAAATTAAG
TGCAAGCAAACTTAAAAATATATAAATGAAAAATACTAAATTAACAATTCCTTAAATTTATATTTGTCAGATATTTTAGCTATG
TAATTTGCAAGCAATATTTGTTTACAAAACATGAATTAATAAACTAAAAAATATTCATTATATAAATTAAAAAAGGAACTTTTAAACA
AAATATCTTAATTTCTATATTAATTTATTAATTTTACTTTAAAGAAAAAGAGAAAACTTCTAAATCAAAATTAATTTAATAGAAGT
TTTTAATCTATCTAAATAGTAATAATGTTATATTTGAATAATATAAATTTATCAATAAATAAATACATTTTAGCAAAATATTTATTT
TTATATTTCTGCTGATAATTAAGTGAGTGTTATAGCTAATTTTTTAAATTTAAAAATATTTTTAAAAAATTTGGTTGTTTGGTTTGTG
ATAGATAAATTAATTTTGAAGTTTTAGTTTATAATCAATTTTTTTTAAATCTTTCTAAATTAATAAGATTTTTTAAATCTTTCC
TTTTCTTATTTGCTATTAATAATCAATTTATTCATAAAGGATATTTAATAATTTAGAAACAAATTTACTGATTTCTAAAATTCCTTTG
TTATTAATAAATACACTTCAATTAATAAAAAATAAAATTTCCAACAATTTCTATCAGAAATTTTTTTCGCTTTAAACAGCTAAAAAGAA
ATTTGATCAAAAAATAAATCAATTAATTAATAAAAAACAAAAAACACTCTCAACAAAAATCTTCAAAAAAGCGACTCAACAAAAAT
ATTAATAAAGTTTACAAAAATTTCTGGAAAAATAAAAGCTGAAGGAATGGTAGTTTAAACATGAACCAAGACTTTTAGCTTTA

GTGTTGTTTTAGCTTTAACTGCTACTACTTTAGTTGCTTTCCCTACTATTCTTTATCTAGATTATTCGACAACGCTATGTTAAGAG
CTCACAGATTACACCAATTAGCTTTTCGACACTTACCAAGAATTCGAAGAAGCTTACATTCCTAAAGAACAAAAATACCTTTCTTACA
AAACCCCTCAAACCTCTTTATGCTTCTCTGAATCTATTTCTTCTCTTCTAACAGAGAAGAACTCAACAAAAATCTAAGTTAGAAATTA
TTAAGAAATTTCTTTATTTAATTTCAATCTTGTTTGAACCTGTTTCAATCTTAAAGATCTGTTTTTCGCTAAGCTTTTAGTTTACGGT
CTTCTGACTCTAACGTTTACGACTTATTAAGAGACTTAGAAGAAGGTATTCAACTTTAATGGGTAGATTAGAAGACGGTTCTCCTAG
AACTGGTCAAAATTTTCAACAACTTACTCTAAATTCGACACTAAGTCTCACAACGACGACGCTTTATTAATAAAGTACGGTTTATTA
TACTGCTTCAGAAAAGACATGGACAAAGTTGAAACTTTCTTAAAGAAATGTTTCAATGCAGATCTGTTGAAGGTTCTTTCGCTTTCTGA

[illegible]

>pTtAC2-PLA-6xHis-hGH

TTGCACTTGTTCGCTCAGTTTCAGCCATAATATGAAATGCTTTTCTTGTGTGTTCTTACGGAATACCACTTGCCACCTATCACCACAACCT
AACTTTTTTCCCGTTCCTCCATCTCTTTTATATTTTTTTTCTCGATCGAGTTCAAGAGAAAAAAGCAAAAAGAAAAAGG
AAAGCGCGCCTCGTTTCATAGAAAAAGAAAAATTGCGGGAAAGAGACTGTGTTATGACTTCCCTGACTAATGCCGTGTTCAAACGTACCT
GGCAGTGACTCCTAGCGCTCACCAAGCTCTTAAAACGAGAATTAAGAAAAAGTCGTCATCTTTCGATAAGTTTTTCCCACAGCAAAGC
AATAGTAGAAAAAAACAATGGGAAACGTTGAATGAAGACAAAGCGTCGTGGTTTAAAGGAAATACGCTCACGTACATGCTAGGGAAC
AGGACCGTGACGCGGATCGGCCTAGGCGGCGCGATCCCGCGCATCAACAATATTTTCACTGAATCAGGATATCTTCTAATACCTG
AATGCTGTTTTTCCACCCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAAC
CCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCA
ACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCC
CAACCCCAACCCCAACCCCAATAATTTCTTTGACATTGAGTAAAAGTTATTTATTGAATGTAATACTTTGATTTTATGTTATTTATGA
ATGATTAAAGATGTTAAATGTTTAAATTTCTATAATATTGAAAAAGGAAGAGATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCC
TTTTTTCGCGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAG
TGGGTTACATCGAATCGGATCTCAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAA
AGTTCTGCTATGTGGCGCGTATTATCCCGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGT
GTTGAGTACTACCAGATCTCGAGCCCAATAATTTCTTTGACTTGAAGTAAAAGTATTTATTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
TATTTATCAATGATTAAAGATGTTAAATGTTTAAATTTCTATAATATTTTGAATAGTTTATATATGAATAAACATAAAATATTAATTAA
ATCTCAAAAAATGACTAAGCTAGTCAAGAGATTGAAGTTCTTATCAAAATATTTTAAATAAAAAATTTTATTTTTTGTAGTTTTTCATAAA
TTTTTATAAGTTTTTTCATTCAAAAATAAACTTTTAGAAGGGTTTTTGTGTATAAAAGATCAATAAATAAAATGTTTTTCAAGAAATTA
TAAATGATCAATCAATTTTTTTCATTCATTTTGTCTGTTTTTAAATTTTTCATTCATTTTATAAAGCAAAATTTTACTTTTAAATTTTTTACATT
ATTATAGAGATCAACCATTTTTACATATTTTATGAATTAAATTTTAGTGAAATTTTTGCATCAATTTCCACTTAATTTTTGTGTGGGA
TTTTTATTTTTACGCTTGAAATTAAGTGGAATAAGTTAAATCTAAGCGTAGTTTAGCGCATTTTTTACACGCAAAAAAATTTTTAT
TCAAATCCACTTTTAGCAAATTTATTCATTGGACAAGCCGTGGTAAAAAAGAGATTTATCTAATAAAGTGGTTTTCTTGAAAAAAGTTAA
CTTTTAAATCAATCTTTAGTCTTTTTGGTTTGGTGCAAAAAAATTTGATAAGTGGGTGAAATTTGATGAAACATTTTGGTTA
AAATACAAAGATTTTTTCATTCATTTTGTCTTCTAATAAAAGTCAACTTTTAGGAAAGAATATTAGCCTGCAGGCAGGACTTAAAAAA
AATATATTGATAAGTGGGTGAAATTTTGAATGAAAAATTTTGTATAAATACAAAGATTTTTTCATTTCATTTTGTCTTCTAATAAAAGT
CAACTTTTAGGAAAAACAATATAGGTCCTTGACGGCTGGAGAAAAAAGTATTGATAAGTGGGTGAAATTTTGAATGAAAAATTTTGT
TAAATGCAAAAGATTTTTTCATTCATTTTGTCTGTTTTTAAATTTTTCATTCATTTTATAAAGCAAAATTTTACTTTTAAATTTTTTACATT
ACTTTTTTCATTCAAATCCACTTTTCGCAATTTTTTCATTGGAGCCCCAGGAAATCCATGCAAAATTTTCTATAAAAGTGGCATTGTAA
TAAATTTCAACTTTTAGAGAAAGGCTCTGGGACTGCTTTAGTCACAAAAAATAAATTTGATAAGTGGGTAAAATTTGAATGAAGAA
TTTTTATAAAATACTAAAATTTTTTCATTCATTTTGCATTAAAAAATTTACTTTGAGAAAAAATTTAGCTAAGCTCATTCTGCGTA
AAAAGCATAATTTTAAAGCGTAACCTTTTAACATATCATGCATAAAGACTTATATCAGCTTAAACACAACATTTCAATTTTTTTTACTAAC
AAATAACATAAAACTTTAACATTTTTAATATTGATTTATAATTTATTTATAAGCAGTTGATTGAAGCTTTCCAAATGAGAAAAATTGC
CTCATAGCTGCTTTGCATCTTATTAGCAAATCTATTGAGTTTTTTTTTAACTTTGTTTTGTTTTGTTTTAATGAGTTCATAAATTATTT
GATAAAATGTAAATCTCTAAGTATTTAATAACCCAGTGAGTAAAAAAGGAAAAAATTTACTAAAGTTAAACAAAATTAATATAAA
CAAAATGCAATTTTAAAGCGTAACCTTTTAAAGAGGTTAAACAACCCAGCAGAAAGTAAAAAATAAAGGGAGATGAGATAAATCTAAGGAGAC
GGGCTGAATCTCAGCAGATCGTAGAAATTTCTACTCTCATGCTTACAATACCCGTTCCATGTTAAGTCGTCTACAAAAGATTTACGTAG
ATGATAATTTGGAATACGATTAGCAGTTAAGGTCAAGCTTTTTTCGCTCTTCCCGCTCTACCTTTCCGAATTAATTTTTTATTTTTTTT
CGTTTTATCATCACACTTAGACATTGCTTTCCAGCATGGATTCTGACTTAGAGGCCTTCAGTCATAATCCAACAGATGGTAGCTTCACG
GCATTTGCTTTTTGAGACAACCGTATTTACCAATTATCTGATTAAAGTGTTCCTCTCGTACTAATTAATTTTCTGCGAACATCTGCTT
TCATCAGTAGGGTAAAACTAACCTGTCTCACGACGGTCTAAGCCCAGCTCACGTTCCCTATTAGCGGGTGAACAATCCGACACCGTTG
TGAATTTCTGCTTCACATGATAGGAAGAGCCGACATCGAAGGATCAAAAAGCAACGTCGATATGAATCTTTGCTGCCACAAGCCAGT
TATCCCTGTGGTAACTTTTCTGACACCTCTAGCTTAAACTTTGTAAGTTTAAAGGATCGATAGGCCACGCTTTCCGCGGTTGTATTCTC
TACTGAAATGTTTCCCTGAGACTTTGGTACTGAACTGTGATGAGTTTCCGTTCTCAGTCAAGATTTCCGTTCTCAGTCAAGCTGCGCT
TATGGTTTAAACAGGCATTCCGCCCCAGACAACTCCCCCCTAACCATGTCTTCGCAAAATCAGTCAATAAATGACCTTAATCTTAGA
ACTGGTTTGCACCAGTCTTTTCTTCAGGAAATAAGCAAAATGACTAGCTGGGTAGTGGTTTTACAGGATCGATTGCTCTCCCACCTAG
GCTATACCCACGTTGCCATTTACAAAGTTAGACTAGAGTCAAGCTCAACAGGGTCTTCTTTCCCGCTGATTATTCTAAGCCCGTTT
CCTTATGCTTTTTGAGTCTGATAGATAGGACAGTGAATCTTCCGTTTCCGTTTCCGTTTCCGTTTCCGTTTCCGTTTCCGTTTCCGTT
ATTTGGCTACCTTACGAGTACTCCAAAATAATCAATATACTTTTCGCATACAAATTAGTTCCAGCGGCTCCAGTGTTCATCACTTC
ATCCGCTAGCTCCCATTAAAGGAGAGGTCCGACTATATCTTTATGAGAAAGAATACATCTTCCCGACCCGACATTTAGTCTGTGAATGCA
TCCATATCAACAGAGATCTGTTGACTTAGGACTTGGCTGCGTGGTTAGGACCATGTCCGTCAGCTTATTACCATAACCTTTTGCAAG
CCATCTCAAAAGTTTCCCTGAGACTTTGGTACTGAACTGTGATGAGTTTCCGTTTCCGTTTCCGTTTCCGTTTCCGTTTCCGTTTCCGTT
AATCTATTGGTTTAAAGACTAGCTACCAGGTGCATGCCTGATAACTTTTCCCTCCAAAGGTAATAATTGCTATTTAGAGAGTCATAGT
TACTCCGCGCTTTACCCGCGCTTGGTTGAATTGCGTCACTTTGACATTCAGAGCACTGGGCAGAAATCACATTGTGTCTACACCTGT
TGAGGCGGTCACAATGCTTTGTTTTATTAAACAGTCGGATTACCTTTGTCCGCTTCAGTTCTGAGTTGATCGTTAATTGTATAAAGA
CGGCCGAAACCTACCTTGCAAATTCATCTTCGCAAGTCTATCAGCATGTTGCCACACTAACAAACAAGCTTGGATATCATTTACAAAG
CCTTTATACCCGATCTCAGAGCCAATCCTTTATCCCGAAGTTACGGATCCAATTTGCCGACTTCCCTTATCTACATTGTTCTATGGAC
CAGAGGCTGCTAACCTTGGAGACCTGATGCGGTTATGGGTAGCAACTGGCGTGAAATTATGTCTCCCCCAGATTTTCAAGGGTCATCA
GGCGCGCAACTGACAGCTCTTAGGGTGAGCTGCTCTGCCATACATACAGCCGATATCTCTGGATAATCCAATTTTCATGGCCATAGTAT
GTTAAAAAAGAAAAGATAACTCTTCCAGTGACACCTGCTGAGTGTTCCTGGGTTTTCTTTGCGTTACCGCCTATACCACGTCACGCTTGAG
GAATATTAACCTCATTTCCCTTTTGACAACGAAAACGAATGTCTTCTGTATTGCAAGGAGTTAACCTATGTCTTAGGATCGAGTAACC
CATGAACAATTGCTGTCTCATGGAACCTTCTCCACTTCGGTCTTCAAAGTTCTCATTTGAATATTTGCTACTACCACCAAGATCTC
ACTAATCGCTGCTCCATATAGGCTCACGCCAATACCTTCTAGGCAACAGATCACGCCCTCCTACTCATCAAAGCCTCGCATTTGCTCTGA
TGGTTGAGTATCGGCACACGCTTTCAGCGCTTTCATTTTACGGGCTAGTTTTCATTCGCGAGGTGAGTTGTTACACACTCTTACGCGGA
TTCTAACTTCCATAGCCACCGTCTGCTGTCCGTATGAACCAACACCTTTTGTGGTATCTGATGAGCGTGCATTTGGGCGCCTTATCT
CAACGTTAGGTTTCATCCCTCATCGCCAGTTTCTGCTTACCAAAAATGCGCCAACTCAAGAGCACTGCGTTCTTCCCGAGAGTTTATTA
AGTAAACTCCGCGGCTCTTACCAATTTAAAGTTTGAGAATAGGTGCAAGTTCTTAGGACTCCCGAGTCTTCAATCATTTTCGTTTACC
TAATAAAAGTCCGTTGCTTGTCTTGTCTTCCGTGAGAGAAATCTCGGAGGAAACAGCTACTAGATGGTTGATTAGTCTTTCCGCCCT
ACACTCAAATTTGACGAACGATTTGACAGCTCAGTATCGCTACGAGCTTCCACCAGAGTTTCCCTTGCTTCAACCGTAG
TTCACCATCTTTCCGGTCTTAACAATTAAGCTCTTCCCTGCAACCTTTCGCGGAGACTCAAGCGGGTGATGTGCTACCTTGGCGCTT
GGCACCTGTACTCACTTTCGTTTTCGCGGACGGGTTTTTCCACCTTATCACTCGCTTAATTGATAGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAG
ACGGGTGAGTGAAGCACTTTTGACAAAAATCGCCCTTAGGCCCTCATGCTCCAGTTTGAAGTTTTCCTTTGATCTGCACTGCTGCGG
ATCTCAGGTGACTCCTTCAATCTGAACCCATTTTGTCTTCTGACCGGTGTAGCAAGTTCTGTACCATTTTCTTACTCATCGACCTTTT
ACGTATCGACTTCGAGTGATTAGTACTTCCCTTATGCGCGGTCCAGTTTATTGCTCTTCTACAGCTTCTTCTCAACGGTTTCAA
GTCTTTTAGCCCTCTTTTCAAAGTTCTTTTTCATCTTTCTTTCGACAGTACTTGTTCGTATCGGTCTCCCGTGATATTTAGCTTTAG

AGAAGTTTATCTCCCACTTAGGGCTGCAATTCCAAACAACCCGACTCTTTGAAATCTCCCTTACACCAGCCTTCCTCTCCGACTACGG
GGTTGTCACCCCTCTTTGACGTCCTGTCCCAAGGAACCTATGAGAGGAGCTTAGTTCAGGTTGACCCCTTAGATTACAAATCTGTTGT
GTTGCCACCTTCAGATTTTCACTTTTGAAGCTTTAGCCTGTTTCACTTACGCCATTACTGGGGCTATCCTAGTTAGTTCTTTCCCTCCGCT
ACTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAATCTTGCTTGTGTTTTCAGGTGTAGTGAGAAAAATGTAATTTTTCTATGAGTAGACATAGTGAGCA
TTCGCCTTGATGCCTGAACGAATGTTACATTACTGGAATGTGACTACTTCGTTCTGGCGGCGATTGCTCGACCACCCATCAGCTTTA
ACGAGAGAAGCTTTTGACGGCTTCAATCGCATTAAGATGCGTGATTCTTTCCACACTGAAACAAACATGAAGGTTTTTACACCTCCA
CCACTTGCCTTCAAAGATCTGATGACTCGCGGTCTGCAATTCGCATTGCGTATCGCATTTTCGCTGCGTCTTCATCGTCACGGGAAC
CTAGATATCCACCGTTGAAAGTTTTCTTTTCGTTTTTGGATGTTATCCAGATCTTAGACATATGAAAAATTTTTATTCCACTAGGTGT
GACAAATAAACCTCGAAGAAAAACGAAGTTCTCTTCGAAAGTACATAAGTTAAGGTTTGTTAATTGTGTTAATGATCCATCTGCAGGT
TCACCTACAGATACCTTGTTACGACTTCTTGTTGTTCCAAATGGTAGGGTTTACTTATTTTTCCGCACACATTGCTGTGCGAGTCCAGA
AGGTTTACCAGACCAATTCGTTACTACAAGCGACGGGCGGTGTGTACAACGGCAGGGACATAATCAACGCAAGCTGATGACTTGCAC
TACTAGAAATTCCTCGTTCAAGATCCACAATTCCAAAGAACATATCCCTAACACGACTGGTATTAATAAGATTACCCGTACCTTCCAG
GACAGGAAATACTTTTTGCGCCAGTCATTGTAACGCGCGTGCAGGCGGAGCAGTCTAGGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCTTAAAC
TTCCATTGGCTTATTGCACAATAGTCCCTCTAAGAAGTACAACCTGTTATTTACAAGCAGACTAGTTAGCAGGTTAAGGTCTCGTTTCG
TTAACGGAATTAACGAGACAAATCACTCCACCAACTAAGAAGCGGCATGCACCACCACCCAAAGAATCAAGAAAGAGCTCTCAATCTG
TCAATCGGTTCTCTGCGCTCGTGAGTTTCCCGGTGTTAAGTGAACATTAAGCCGCAAGGTTCCACTTCCGCTGTTCAATCTGTTCCGTC
AATTCCTTTAAGTTTACAGACTTGCCTACCATACTTCCCCCAGAACCACAAAGACTTTGATTTCTCATACGGTGCCGACTGGACATTTAT
TCCAGCGGATCCCGAGTCGGTATAGTTTATAGTTAAGACTAGCAGGTATCTGATCGTCTTTGATCCCTTAACCTTTCGTTCTTGATTA
ATGAAACATCTTTGGCAATAGCTTTTCGCATTAGTTAGTCTTAATAAATCCAAGAATTTTACCTCTGACTATTAATACTAATGCCC
CCAATGCTCCCTATTCAATCATTAACCAATCCAAGAACCACTTAGTCTTATTCATTTAGTCTTATTCATTTAGTCTTATTCATTTAGTCTG
CTAAACCTGCTTGGACACACTCTAATTTTTTACAGTAAATGTTTACTCCCTAAGTCGAACCAAGTGAAGGCCGATTTTAGTTTGCAA
ACGTATGTCCAGTTTACACGACGAATCGAATGAACCTGAACAGAGTTCAACTACGAGCTTTTTAAGTGAACAACTTTAATATAC
GCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGCTGCTGGCACCATGACTTGCCTTCAATTTGTTCTCGCTAAGAGATTTACACTGTTTCTCATTT
CAATCGCGTATCCCATGTAATCTTTAATTATCAAATAAACTAATGTTTATTAATGAGCCATTCGCAAGTTTCGCTGTTCAATCTGTT
CGAACCGTAGTTGTAGTAGCGGTTTCTCAGGCTCCTTCTCCGAATCGAACCTAATTTCTCGTTTACCCGTGACTGCCATGGTAGTCC
AATACACTACCATCGAGAGCTGATAGGGCAGAACTTAGATGATTTATCGAGGTAAACCTCGATCCGATCAGTTACTTTGATTCATCT
CAATCACATTGCTGCGATTGGTCTAATATCTAATAAATACGTTCCGGTCGCAAGGACACGGAATTTAAGCATGTATTAGCCCAACAAT
TAGCTCGGTTATCCCATGTAATCTTTAATTATCAAATAAACTAATGTTTATTAATGAGCCATTCGCAAGTTTCGCTGTTCAATCTGAA
CTGGCACATGCATGGGTTAATATTTAAGACAAGCATATGTAAGTGGCAGGATCAACCAGGTTACTATCTCTCAAATTTGCTCGCTATT
TTCGGATTTGATCTTCCAAAGCTTGCTCATTTTTTGAATAGTGTTCCAAAGGTTGGTTTACAAAGATTAAATAGTTCATCGAGAA
CTGACGCGTTGTAATAGATCAGTACTCAGCTATATCGTTAGATTAAGCTTTATACATAGATCCCGCATCGTTTTCGTTTACTATTAGTT
TCTTCTAGTTGCTAAATCTTCGAAGGCACATGAGAAAACCTGATCGCATCTCTTCGACTCTAGTCAACTTTGTTGCTAGCTGTATAA
TAACATCTGCGATTTTACCGATTTTATAACAGTACTAGCGTGTGCGTTATTTGTAACAATATCTGCATAGATATCGATACAACAAGTG
TCACTGGGAAAGTTTCTGCGAAGCTTTCGAGTGAATTTACAGCCTTCATGAAAATTTCAAGTCAGGCCATTTGCTCTAATACGAGCT
TAATCCAGAAAAACCTTCAACAGACCTCAGCGGCCATCGACTAAAAGCCGAAGCCATAGAGAAAAACGCTGCTCAGTTAGCGCTTC
ATTATCGGTTATCTTAACTGTTGTTGCCAAAGGAATCTTACTGAAGCTCAATTCGAGCTGATATTTTATTTTGGTCCGAGATTTTCC
CTTCTTAAATATGCATTTTTTACCCCTGATATTATTTTTATTTTTTTTGGCCAAAGAATTTTTCTCAAAGTCAAAAAAGTTCGGAAGG
TTTACTATTTTTGTTTTTTTTTTTGGCCAAAAAAGACTCTGCCAAATTTTCAATCCCTTGTAATTTTTTCAAGTTTTTCAATTTATTT
TTCATTTTTTTTCAATTTTCGCTATTTTTTCACTAAGTCTAATTTAATTTAGAGCTGATTTTAAGCTAAATTTTAAAGTGGCTCTGCTGAA
CTTTTGTAGTGCTCCACTCATTTTTTAAAGCGAGTCTGCTTCAATTTTGTAGTGAGTCCACTCATTTTTTGGCAGATCCGCTTAATTT
TCTGTGAGTCCACTTATTTTTGTTTAACTCCGCGAATATTAAGCGAGTCCGCTTAATTTTTTGTAGTGCTCCACTCATTTTTTAAAGTGA
GTTCACTTAATTTTTTGTAGTACTCCACTCATTTTTATGCGAGTCCACTTAAATATTGAGCGAGTCCGCTCATTTTTTGTAAAGTGGC
TTCACACAAAATCTAAGCGCAATCTCAAAATTTCTCCTAAATCATTTTTTCAATTTTAAATTTTCTAAGTCTTTTTTCACTTTTT
GAATTTTTTGTAGTCTTTTTTTTTTCAATTTTTTCAAAATTTTCAAGTTTACTATTTTTGTTTTTTTTTGGCCAAAAAATATCTAATGAGCA
TAATGAGCAATTTTCAAAATCAATATTTTTAATCTAGATAAACTTTTTCTTTAAGTCTCTTTTATAACTCTTTATTTAATCAAAAA
AATTTATTTGAATGTAATTTAATCAAAATGAATAAATGAATGATAAATGTTTTTACATATAAAAATGATATACGATGCT
GTTAAATGTTTTATGTTTTTTTTATATATGTTTTATTTAATTTTACTAGCATTTAAATGATTAAAAAATATAAAATAAATTTTACTT
TTCTATGATTTTATTTATATAAATTTCTCTAAGTCTTTTTTATCTTTTTTGTAGTTTTTCTCTAAGCTTTTTTCTAAGCTTTTTTCTG
TTTTTCTAAGTCTTTTTTCAACTCTCAAAAAAGTATTTTTTACTATTTTTGTTTTTTTTTGGCCAAAAAATATCTAATGAGCA
ATTTTTCAAAATCAATATTTTTAATCTAGATAAACTTTTTCTTTAAGTTATCTTTATAAAGTCTTTATTTTACCATACCAAAAAAGT
TTTTTGTGAATGAAAAATTTAATAAATGAATAAATGAATTTGATAAATGTTTTTACATAAAAAAATTTTACTCTTTATCTCT
AAAACATTTTACTTTTATTTATAAATGTTTTTACTTTAAATTTCTAGCATTTAAATGTATAAAAAAGGAATACTTTTATCTGTC
ATTTTTAGATGCTTTTTCTTTAAAAATTTAATAATTTCTTAAATTTACCTCTTAAAAAATATTTTATCATTTTAAAAATCATATATTT
ATTAAAAAAGTGTGTTTTAAAGTGAAATGAATTAATTCATTTTAAATTTACTAGCATTAAGTAGTCAAATAGCTAAAAATATGTAATA
TTTTCTCATTTTTTGAACCTATTTTGCTTGAAATTTGTAATTTTGAATTTTATCTAATTTAAAAACATTTTACAACATAAAAAAC
AAATATTTTTTGTAAAAATCAATTTTGTAGTTTATTAAGATTTAAATTAATTTCTATTTGCTACATTTTCAACAGTGAATTAAGCAGAA
TATAAACATCTAATTTCTATCTACTCAAATTTAAATTTTAAACCAATTTTACTCAATTTTAAAGTTATTTTGAAGGTAAATTTCAA
CAACATAGTGTGAAGGCTATAAACTAACAACAAAAAGCAAAAAACCGTACGAGCTATACGTGTAGCATGACCCGGGTAAATTAAG
TGCAAGCAAACTTAAAAATATATAAATGAAAAAATACTAAAAATTAACAATTCCTTAAATTTATATTTGTGAGATATTTTACGTATG
TAATTTGCAAGCAATATTTGTTTACAAAACATGAATTAATAAACTAAAAAATATTCATTATATAAATAAAAAAGGAACTTTTAAACA
AAATATCTTAATTTCTATATTAATTTATTAATTTTACTTTAAAGAAAAAGAGAAAACTTCTAAATCAAAATTAATTTAATAGAAGT
TTTTAATCTATCTAAATAGTAATAATGTTATTTGAATAATATAAATTTATCAATAAATAAATACATTTTAGCAAAATATTTATTT
TTATATTTCTGCTGATAATTAAGTGAGTGTTATAGCTAATTTTTTAAATTTAAAAATATTTTTAAAAAATTTGGTTGTTGTTGTTG
ATAGATTAATTAATTTTGAAGTTTTAGTTTATAATCAATTTTTTTTAAATCTTTCTAAAAATTAATAAGATTTTTTAAATCTTTCC
TTTTTCTTATTTGCTATTAATAATCAATTTATTCATAAAGGATATTTAATAATTTAGAAACATTTTACTGATTTCTAAAAATCTTTTG
TTATTTAAAAATACACTTCAATTAATAAAAAATAAAATTTCCAACAATTTCTATCAGAAATTTTTTTCGCTTTAAACAGCTAAAAAGAA
ATTTGATCAAAAAATAAATCAATTAATTAATAAAAAACAAAAAACATCTCAACAAAAATCTTCAAAAGCGACTCAACACAAAT
ATTAATAAGTTTACAAAAATTTCTGGAAAAATAAAGCTGAAGGAATGGTAGTTTAAACATGAAGCAAGACTTTAATTTAGCTTTTA
GTGTTGTTTTAGCTTTAAGTGTACTACTTTAGTTGCTTTTTTACCATCACCATCACCATTTCCCTACTATTCCCTTTATCTAGATTAT
TCGACAACGCTATGTTAAGAGCTCACAGATTACACCAATTAGCTTTGACACTTACCAAGAATTTCGAAGAAGCTTACATTCCTAAAGA
ACAAAAATACCTTTCTTACAAAACCTCAAACTTCTTTATGCTTCTCTGAATCTATTCCTACTCCTTCTAACAGAGAAGAACTCAA
CAAAAACTCAACTAGAAATTTAAGAATTTCTTTATTTATTAATCTTTGGTTGTAAGACCTGTTCAATTTCTAAGATCTGTTTTG
CTAAGTCTTTAGTTTACGGTGCTTCTGACTCTAAGCTTTACGACTTTAATAAAGACTTAGAAGAAGGTATTCAAACCTTTAATGGGTAG
ATTAGAAGACGGTTCTCCTAGAACTGGTCAAATTTTCAACAACCTTACTCTAAATTCGACACTAATCTCACAACGACGACGCTTTA
TTAAAAAAGTACGGTTTATTATACTGCTTCAGAAAAGACATGACAAAGTTGAACTTTCTTAAAGAATTGTTCAATGCGATCTGTTG

AAGGTTCTTGC GGTTCTGA GCGCGCGGATCCTTAAATTAAAAATTC AATATATATTTACAACTTTCATATAAAAATAATATATTA
TATAAAATTAATTTTTAGTGTATTATATTAACATTAAAGCACCACAAAAACGTGTTAATATACTACTATATAAAATATAATTTATTCCAA
ATTGACTAAAAATCATTATTTTACAACTCATTTGTATATATATTTTATGTCAATTATTTTTTTTAACTTTCTAAAAAAAATTCCTCT
TCACATACATGTTAGCTCTTAAAAAATTTGTCTGCAAAATCCAATAAATATTTTTTTTGGCCATTAAATTTTCAAAATTTTACGTGGAA
AAATGCAGCGATCGCATTGGCCGGCCATTTTCGATATACAATTTATTTCTAAAAAATATTTAAAAATAAAAAATAATAAGGGTTTTGAA
TAACTCCTTTAATTTAAATACACATTTTAAATTTTTTTTTAGCTCTTTAAATATTCATAAAAAATAAAAAATACTAACTAAAAATAA
ATAAAAGATAAATGATTAAAGGTATAATACTGAATAAGAAAAACATAATAGAGTACTTATTTTTTATATCACTATTTTTAATAT
CTTGAAAGCAAACTTTTTTATATATCTTAAATATATTTGTATCGTTTATTTCAATTATTTTTCTTAAATTTCAAAATATATTGATAAAA
AAGATGACATGTTTTTTAAAGAAAACATGAAATATAAAATAGATAAATATCAATTATTTTATTTATTAATATATAAGCTGCTCAAAA
CATAGCTCATTCATCAATTATAATATGTGAATCATTAATTTTCAAAATATTACTCATTTATTTAGGCTATCATTTATTTTTATTTTCA
ATTATCCGTTTCTATTATATTTTAATATTAAGTTGTGATCTTGAATTTTGTGTCATGAATTATTTGTAATCTTTTTATTTCTGATA
AAAAATAAAATTTGACTCATGATTTAAATCATGATGCAACCTCAACTAATTTTTCAAAATCTTCTTATTTCAAAATATAGATGTGA
TTCTTGAATCTCTCTTGAATATAAAGTAATTTTTTATATTTCTGATATAATTTCTAGCTACGTGATTCACGATTTATACAATGATCCA
TATAAAATAATGTAAATAGTGTATATATATATATTCGTCTTTTTTATCTTTATATATAATTTAAAAAATTAAAAAATTTAATAAAGC
TCTAATAAAATAAATAATACTAACTTAAATAATGATTGAACAAGATGGTTTACACGCTGGTTCTCCCGCCGCTGGGTCGAA
GACTTTTTCGGTTATGACTGGGCTCAACAAACCATCGTTGGCTTGTGTCGCGCGCTCTCCGCTCTTCTGTGTGAAATTTGTTCT
TTTCTGTCAGACCGACCTTTCTGGTGCCCTTAATGAACCTCAAGATGAAGCTGCCCGCTCTTCTTGGCTTGCCACCACCGGTGTTCT
TGCGCTGCTGTCCCTTGACGTTGTCACTGAAGCCGGTAGAGACTGGCTCTTTTAGGTTGAAGTCCCGGCTCAAGATCTTCTTTCTTCTC
ACCTTGCTCCTGCCGAAAAAGTTTCTATCATGGCTGATGCTATGCGTCGTCTTCATACCCTTGATCCCGCTACCTGCCCTTTTCGACCA
CCAAGCCAAACATCTCGAAGCTGCTCGTACTCGTATCGATGCAACCTCAACTTGTGTCGATCAAGATGATTTCTTCAAAATATAGATGTGA
CTTGCCCTTCCGCAACTTTTCGCCAGACTTAAGGCCCGTATGCCCGACGGTGAAGATCTTGTGCTCACCATGGTGATGCTGCTTAC
CCAATATCATGGTTGAAATGGTCGTTTTTCTGGTTTCATCGACTGTGGTCGCTTGGTGTGCGCCGACCGTTATCAAGATATTGCCCTT
AGTACCCCGTGATATTGCTGAAGAAGTTGGTGGTGAATGGGCTGACCGTTTCTTGTCTCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCTCAA
CGTATCTGCTCTATCGCTCTTCTTGACGAATTTCTTCTGAGATTTCTTCAATTTAAAAATTC AATATATATTTTACAAATTTTATATAAAA
TAAATATATTATATAAAAATTAATTTTTAGTGTATTATATTAACATTTAAAGCACCACAAAAACGTGTTAATATACTACTATAAAAAATA
ATTTATTTCCAAATTGACTAAAAATCATTATTTTACAACTCATTTGTATATATATTTTATGTCAATTATTTTTTTTAACTTTCTAAAAAA
AAAAATTCCTCTTCACATACATGTTAGCTCTTAAAAATTTGTCTGCAAAATCAATAAATATTTTTTTTTTGGCCATTAAATTTTCAAA
TTTTTCTGGAAAAATGCAAGCTGACTATCTGCAAGCATGCAAGCTTTGGCGTAAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTTGTTA
TCCGCTCACAAATTCACACAAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATT
GCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTT
TGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAA
GGCGGTAAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAA
AAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACC
CGACAGGACTATAAAGATACAGGCGTTTTCCCGCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCGGACCTGCGCTTACCGGATACCT
GTCCGCTTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGATAGGTGCTTCGCTCCAAG
CTGGGCTGTGTGACGGAACCCCGCTTCAGCCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCAACCCGCTGAAGACAG
ACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCC
TAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGA
TCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATC
CTTTGATCTTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCAAGTTAAGGGATTTTGGTCAATGAGATTACAAAAAGGATCTT
CACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTA
ATCAGTGAGGACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTCAATCCTAGTTGCCGTGACTCCCGCTCGTGTAGATAACTACGATACGGG
AGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGC
CGGAAGCGGTGAGAACCGCAAGTGGTCTCGCACTTTATCCGCTTATCCAGTCTATTAATTTGTTAGGAGTTCGCGGAGCTTATGAGT
TCGCCAGTTAATAGTTTGGCGAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTACGCT
CCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGCTAG
AAGTAAGTTGGCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTTCTTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCT
GTGAGCTGTTAGTCTTACCAACAGTCATTTCTGAGAATAGTTGTGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGC CGCGCTCAATACGGGATTA
CCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATCATTTGGAACCGTTCTTCCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACC GCTGTTGAG
ATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAAGCA
AGGCAAAATGCGCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACTCTTCTCTTCAATATATTGAAGCATTT
ATCAGGTTATTTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTTTGA AAAATAAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTTCCCGAAA
AGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTTATATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGT
TTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGAGCGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAG
CCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTA CTAGAGAGTGCACCA
TATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCCCATCAGCGCCATTTCGCCATTACGGCTGCGCACTGTTGGGAA
GGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGCGGATTAAGTTGGGTAAACGCCAGGGT
TTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCATAGGTACCGAATTTCTACGATCTGCTGAGATTACGCCCGT
CTCCTTAGATTTATCTCATCTCCCTTTATTTTTTACTTCTGCTGGGGTGTGTAACCTCTTTAAGAAATTTTTTTTATTTTGAATTTGTT
TAATTTAATTTTGTTTAACTTTAGTAAATTTTTTCTTGTGTTTTCACCTCCACTGGGGTTATTAATACTTAGAGATTTTTTATTTTTAT
CAAAATAATTTATGAACCTATTAAAAACAAAACAAAACAAAGTTAAAAAAAACCTCAATAGATTTGCTAATAAGATGCAAGCAGCTATGA
GGCAATTTTTCTCATTGGAAGCTTCAATCAACTGCTTATAAATAAATTATAAATCAATATTA AAAATGTTAAAGTTTTATGTTATT
TGTTAGTAAAAAATGAATAGTTGTGTTTAAAGCTGATATAAGTCTTTATGCATGATATGTTAAAAAGTTACGCTTAAAAATATTGCTTT
TTACGCAGAAATGAGCTTAGCTTAAATTTTTTCTCAAGTAATTTTTTTTATGCAAAATGAATGAAAAATTTTAGTATTTTTATAAAA
ATTCTTCAATTCAAATTTTACCACCTTATCAATTTATTTTTTTTTTGTGACTAAAGCAGTCCCAGAGCCTTTTCTCTAAAGTTGAATTT
TATTAACAATGCCACTTTTATAGAAAAATTTTGCATGGATTTCTGGGGCTCCAATGGA AAAATGCGAAAGTGGATTTTGAATGAAAA
AGTGAATGTA AAAATTAAGTAAAAATTTTGCTTTATAAAATGAATGAAAAATTA AAAACAAGCAAAATGAATGAAAAATCTTTGCATT
TTAACA AAAATTTTCTATCAAAATTTTCAACCACTTTATCAATAACTTTTTTTTTTCCCGCAGCCGCTCAAAAGCCCTATTATTTGTTT
TCCTAAAGTTGACTTTTATTAAGAAACAAAATGAATGAAAAAATCTTTGTATTTTAAACAAAATTTTTCTATTCAAATTTTCAACCACT
TATCAATATATTTTTTTTTTAAAGTCTGCTGCAGGCTAATATTTCTTTCTTAAAGTTGACTTTTATTAAGAACCAAAATGAATGAAAA
ATCTTTGTATTTTAAACAAATTTTTCATTCAAATTTTCAACCACTTATCAATATTTTTTTTTTGGGACCAACCAAAAGACCTAAAGATT
TGATTTAAAGTTGACTTTTTTCAAGAAAAACCTTTATAGATAAATCTCTTTTTTACCACGGCTGTCCAATGAATAAATTTGTCTA
AAGTGGATTTGAATAAAAATTTTTTGGCGTGA AAAATGCGCTAAACTACGCTTAGATTTTAACTTTATCCCACTTTAATTTCAAGCG
TAAAAATAAAAAATCCACACAAAAATTAAGTGAAATTTGATGCA AAAATTTCACTAAAAATTTAATTCATAAATATGTA AAAATGGTT
GATCTCTATAATTTATGAGATTTGCATTATTTAAGGCTTATAAGAAATTTTAAATTAACGCGGAAGCTTCATTTTTAGATAAAATTTA

TTAATCATCATTAATTTCTTGAAAAACATTTTATTTATTGATCTTTTATAACAAAAACCCTTCTAAAAGTTTATTTTGAATGAAAA
ACTTATAAAAAATTTATGAAAACACAAAAATAAAATTTTAAATTAAAAATAATTTTGATAAGAACTTCAATCTTTGACTAGCTTAGTC
ATTTTTGAGATTTAATTAATATTTTATGTTTATTCATATATAAACTATTCAAAATATTATAGAATTTAAACATTTTAACATCTTAATC
ATTGATAAAATAACCAAAAAATCAAAGTATTACATCAATAAAATAACTTTTACTCAATGTCAAAGAAATTTATATAGGGCCCGTAACTGCT
GCTGGAATTACACATGGCATGGATGAATTATACAAAGGTACCGTCTTCTGAGGTACCCCTTATCTAAATGAACAACACTTAAATAAATA
TAAATTAAAGAACGTACTTATATTTTAAATAAATCTCGAAATTTTCTAATTACTATTATTTTATTTTATTTTATACTTATGTCAAACAATA
CATAGACATCATATGGATTCAACAATAAAAGTATTGGAGTAATAAACACTACGCGCCCCAGGGCCGTCGTTTTCAACGTCGTGACTGG
GCAAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATC
GCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAATTTGTAAGCGTTAATATTATAGAATTTAAACATTTTAACATCTTAATC
ATTCATAAAATAACTAAAAATCAAAGTATTACATTCAATAAAATAACTTTTACTCAATGTCAAAGAAATTTATTGGGGTTGGGGTTGGGG
TTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGG
GGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTT
GGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTT
ATTCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTACAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCGGGATCGGCCTAGGCGGCCGCGATCCTCGGGGACAC
CAAATATGGCGATCTCGGCCTTTTCGTTTCTTGGAGCTGGGACATGTTGCCATCGATCCATCTACCACCAGAACGGCCGTTAGATCT
GCTGCCACCGTTGTTTCCACCGAAGAACCACCGTTGCCGTAACCACCACGACGGTTGTTGCTAAAGAAGCTGCCACCGCCACGGCCAC
CGTTGTAGCCGCCGTTGTTGTTATTGTAGTTGCTCATGTTATTTCTGGCACTTCTTGGTTTTCTCTTAAGTGAGGAGGAACATAACC
ATTCTCGTTGTTGTCGTTGATGCTTAAAT



EK-13. Vejetatif Biyolistik Silah Transformasyonu Protokolü

Rekombinant vektörlerin *T. thermophila* vejetatif hücrelerine transformasyonu aşağıda verilen protokolün takip edilmesi ile gerçekleştirilir (Çalışeki, M Dereli, S. ve Arslanyolu, M 1502F092 BAP, 2018; yayınlanmamış veri).

DNA'nın Lineer Hale Getirilmesi

- Her bir transformasyon aşaması için aktarılacak vektörden yaklaşık 1-4 µg kullanılır.
- Genom entegrasyonu için vektör restriksiyon enzimi ile lineer hale getirilerek jelden veya reaksiyon tüpünden saflaştırılır
- Elde edilen plazmit 2 µg/µl konsantrasyonunda olacak şekilde dH₂O ile çözülür.

Altın Partiküllerinin Vektör DNA'sı ile Birleştirilmesi

Transforme edilecek vektörün transforme edilebilmesi için altın ile kaplanması gerekmektedir. Bu işlem için sırasıyla:

- 4 µL (4-12 µg) lineer DNA
- 40 µL 2.5 M CaCl₂
- 16 µL Spermidin

Eklenerek tüpte karıştırılır. Her eklemenin ardından ~3 saniye vortekslenir. Tüm bileşenler eklendikten sonra, 4°C'de 10 dakika çalkalanır.

DNA/altın karışımının ateşleme için hazırlanması:

1. Partiküller, 4 santigrat derecede 10.000 6 saniye santrifüj edilerek çöktürülür ve süpernatant pipetlenerek uzaklaştırılır.
2. Altın partikülleri %70'lik 100 µL etanol ile yıkanır, hafif spinlenerek süpernatant uzaklaştırılır.
3. %100'lük 100 µL etanol ile yıkanır, spin atılır ve süpernatant uzaklaştırılır.
4. 40 µL %100'lük etanol içinde pipetlenerek çözülür.
5. Her atışta bu partiküllerin 10 µl'si makro tutucu üzerine eklenerek kullanılmaktadır.

Hücrelerin Hazırlığı

1. Her bir transformasyon için 50 ml SPP'de hücre büyütülmelidir.
2. Hücre yoğunluğu 2.10^5 hücre/ml olduğunda hücreler açlık tamponuyla yıkanarak, 50 ml tamponda açlığa alınır.
3. Hücreler az 6 saat açlığa alınarak transformasyona hazır hale getirilir.
4. 2.10^5 hücre/ml yoğunluğundaki, 50 ml aç hücreler (veya konjugatif), konik dipli bir tüpte 1100 g'de 3 dakika santrifüj edilerek toplanır
5. Süpernatant uzaklaştırılır ve 500 µl 10 mM Tris-HCl içerisinde çözülür.
6. 4 adet dairesel "Whatmann 50" filtre kâğıdı 4 petri tabağının (100 mm) her birine yerleştirilir ve 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) ile nemlendirilir.
7. Hücreler filtre kâğıdının ortasından başlanarak ¾'lük kısmına kadar yayılır.

Ateşleme:

1. Cihazın iç yüzeyi %70'lik alkolle temizlenir.
2. İzopropanol içerisinde bir tane 900 PSI rupture disk ıslatılır.
3. Rupture disk retining cap içine yerleştirilir ve bu da partikül bombardıman aparatına monte edilir.
4. Macrocarrier tutucuya önce stopping screen, ardından da DNA kaplı partikülleri içeren makrotaşıyıcı (aşağı bakacak şekilde) yerleştirilir ve kilitleme halkasıyla sağlamlaştırılarak tablaya (mikrotaşıyıcı ateşleme birimi) monte edilir.
5. İçinde hücrelerin bulunduğu bir 100 mm petri tabağı, kapağı açık şekilde en alt seviyeye yerleştirilir.
6. Helyum tankında 1100 psi basınç ayarlanır.
7. Cihazın Vac tuşuna basılır ve 26.5-27 Hg'ye kadar vakum çekilir çekilmez Vac tuşu Hold'a (alt kademe) alınır ve vakum vanası kapatılır.
8. Fire tuşuna basılı tutulup atış gerçekleştirildikten sonrası fire tuşu bırakılır.
9. Hücrelerin üzerine 10 ml 30 °C NEFF besiyeri eklenir ve diğer ateşlemeler 30 °C'de nem çemberi kurulmuş kaplar içerisinde inkübasyona bırakılır.

EK-14. Transformant *T. thermophila* Hücrelerinin Seleksiyonu

Tez çalışmasının ilk aşamalarında gerçekleştirilen seleksiyonlarda kullanılan paramomisin ve kadmiyum klorür oranları ve zaman bağlı değişimleri gösteren tablo aşağıda verilmiştir.

Tablo EK-14.1. Transformant *T. thermophila* hücrelerinin seleksiyonu için kullanılan alternatif seleksiyon metodu

Seleksiyon Zamanları	Paramomisin (µg)	CdCl ₂ (µg)
0. Gün	100	0.5
1.Gün	100	1
3.Gün	300	1
5.Gün	600	0.75
7.Gün	1000	0.5
9.Gün	2000	0.25
11.Gün	2500	0.1

*11. günde hücreler Petri kaplarından cam tüplere aktarılmıştır.

*Seleksiyon sonrası 300 µg Paramomisin ve 0.1 µg CdCl₂ devam etmektedir.

EK-15. *T. thermophila* Genomik DNA İzolasyonu ve Analizi

Transformant *T. thermophila* hücrelerinde vektörün ve klonlanan gen dizilerinin varlığının tespit edilmesi için kültüre edilen hücrelerden Genomik DNA izolasyonları Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, A1120) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonrası rehidrasyon 4 °C’de gece boyunca uygulanmıştır. Spektrofotometrik yöntemlerle DNA konsantrasyonu öğrenilerek, klonlanan dizilerin dış primerleri kullanılarak izole edilen genomik DNA örnekleriyle birlikte PZR kurulmuştur ve sonuçlar analiz edilmiştir.

EK-16. Takılı ve Takısız hGH Gen dizileri içeren TtAC2 vektörü bulunduran *T. thermophila* hücrelerinin ısı şoku indüklemesi

Logaritmik faza kadar (2 gün) inkübe edilen hücrelerin santrifüjü öncesinde 38°C’de su banyosunda hücre kültürü hacminde NEFF besiyeri (veya Tris-HCL pH: 7.5) ısıtılır. Santrifüj sonrası süpernatantı uzaklaştırılarak pelleti alınan hücrelerin üzerine dikkatlice 38°C’de ısıtılmış NEFF besiyeri dökülerek pellet çözündürülür, sonrasında hücreler erlene (en az 100 ml’lik erlen, geniş hacimli olmalı) aktararak 38°C’lik su banyosunda ısı şoku uygulamasına devam edilir. GFP-hGH füzyon proteinlerinde 30 dk veya 1 saat aralıklarla Olympus IX53 inverted mikroskop (DP80 Monokrom kamera) kullanılarak floresans ışık altında GFP ışıması gözlemler yapılmıştır. Diğer takılı ve takısız hGH üretimlerinde ise ısı şoku uygulaması boyunca hücrelerin canlılıkları kontrol edilmiştir.



Şekil EK-16.1. *T. thermophila* Hücrelerinin Isı Şoku İndüklemesi (BioRender ile hazırlanmıştır).

Isı şoku indüksiyonu sonrası hücreler tekrardan konik santrifüj tüpüne aktararak 1500x g’de 3 dakika boyunca santrifüj edilir. Süpernatant uzaklaştırılır ve hücre pelleti Tris-HCl tamponu (pH: 7.5) ile çözülerek yıkama işlemi yapılır ve aynı şartlarda santrifüj işlemi gerçekleştirilir. Elde edilen hücre pelleti +4 °C’de kuru buz üzerinde saklanarak direk olarak toplam protein izolasyonu için kullanılabilir veya -86 C’de muhafaza edilebilir.

EK-17. İndüklenmiş *T. thermophila* Hücrelerinden Hücre Patlatma ile Protein İfade Analizi

Hücre patlatma yöntemi ile toplam protein izolasyonu yapılmaksızın hızlı bir şekilde protein analizi yapılması için ısı şoku indüklemesi sonrasında hücre pelletinin Tris-HCl ile yıkanması aşamasında 50.000 – 250.000 hücre olacak şekilde kültür alınarak mikrosantrifüj tüplere aktarılır ve santrifüj işlemi gerçekleştirilir. Santrifüj sonrası hücreler Tris-HCl ile tekrardan çözülerek SDS-PAGE yükleme tamponu (5x) ile karıştırılır (Son konsantrasyon 1x SDS-PAGE yükleme tamponu). SDS-PAGE kuyularına toplamda en az 20.000 hücre yüklenecek şekilde örnekler hazırlanır. GFP içeren füzyon proteinlerinin GFP filtresiyle ışımaya görüntülerinin elde edilmesi için proteinlerin doğal şartlarda jel kuyularına yüklenebilmesi amaçlanır. Bu nedenle proteinlerin üç boyutlu yapısını bozabilen herhangi bir denatüre edici kimyasal SDS-PAGE yükleme tamponuna eklenmemektedir. Ayrıca yüksek sıcaklıkta hücrelerin patlatılması da proteinlerin yapılarını bozacağı için bu işlem de gerçekleştirilmemektedir.

Proteinlerin denatüre edilerek analizi yapılması için SDS-PAGE yükleme tamponuna %5 konsantrasyon olacak şekilde B-merkaptoetanol eklenir ve 37°C’de 5 dakika boyunca inkübasyon yapılır. Tüm protein analizi işlemlerinde örnekler +4°C’de kuru buz üzerinde saklanır.

EK-18. İndüklenmiş *T. thermophila* Hücrelerinden Protein İzolasyonu

Lizis/Bağlanma tamponu hazırlanışı:

0,78 gr $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (M_A : 156.01) dH_2O 'da çözülerek 50 ml'lik 100 mM NaH_2PO_4 stoğu elde edilir. 14,52 gr NaCl (M_A : 58.44) dH_2O 'da çözülerek 50 ml'lik 5M NaCl stoğu hazırlanır. 0.0175 PMSF (M_A : 174,19) isopropanolle çözülerek 1ml 100mM PMSF stoğu oluşturulur ve -20°C 'de saklanır.

Lizis/Bağlanma tamponu için kimyasallar	Stok Konsantrasyon	1 ml hacim	10 ml hacim	Lizis/Bağlanma tamponu final konsantrasyon
NaH_2PO_4 pH: 8	100 mM	500 μl	5ml	50 mM
NaCl	5M	60 μl	600 μl	300
Triton X-100	-	10 μl	100 μl	%1
PMSF	100 mM	20 μl	200 μl	2mM
İmidazol	-	0,00068 gr	0,0068 gr	10 mM
PİK	100x	10 μl	100 μl	1x
dH_2O	-	4 μl	4ml	-

Tablo EK-18.1. SFTX lizis tamponu hazırlanışı. PMSF ve Triton X-100 lizis tamponuna en son eklenirler. Öncesinde lizis tamponunun pH'sı 8 olup olmadığı kontrol edilir. Lizis tamponuna istenildiğinde 1X PİK ve 10mM imidazol eklemesi yapılabilir. Histidin takısız protein üretimlerinde imidazol eklenmemektedir. PİK olarak 100x Protease Inhibitor Coctail (Cell Signaling Technology, 5871S) kullanılmaktadır.

Toplam protein izolasyonu aşamaları:

1. Tüm saflaştırma aşamaları kuru buz üzerinde ve sıcaklığı $+4^\circ\text{C}$ 'ye ayarlanmış soğutmalı cihazlarda gerçekleştirilir.
2. Isı şoku indüklemesi sonrasında toplam 25 milyon hücre içeren kültür 1500 x g'de 3 dakika boyunca santrifüjlenir ve sonrasında pellet Tris-HCL pH: 7.5 ile yıkanır, tekrar santrifüj işlemi yapılarak son pellet elde edilir.
3. Pellet kuru buz üzerinde muhafaza edilir, üzerine 3 ml SFTX100 lizis tamponu eklenir (25 milyon hücreye 3 ml lizis/bağlanma tamponu).
4. 15 dakika boyunca ara ara vorteksleme veya pipetleme ile pellet lizis tamponunda çözülür ve inkübe edilir.
5. Lizatlar 1.5ml'lik mikrosantrifüj tüplere aktarılır üzerlerine 0,01250 gr $0.2\ \mu\text{m}$ 'lik çelik boncuk (714 tane $0.2\ \mu\text{m}$ 'lik çelik boncuk, 1 çelik boncuk=0,0000175 gram) eklenir. $0.2\ \mu\text{m}$ 'lik çelik bilyeler eklenerek 'bead beater' cihazında (Bullet Blender, Next Advance) 7. seviye hızda 5 dakika boyunca fiziksel parçalamaya uğratılır.
6. 13.000 rpm'de $+4^\circ\text{C}$ 'de soğutmalı santrifüjde 20 dakika boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirilir.

7. Elde edilen süpernatant yeni mikrosantrifuj tüplere aktarılır ve toplam çözünür protein olarak saklanır.
8. Kalan pellet 250 µl lizis/bağlanma tamponu (Triton X-100 içermeyen) ile tekrardan çözülür ve toplam pellet olarak adlandırılarak saklanır.
9. SDS-PAGE analizi için 80 µl protein örneği 20 µl 5x SDS-PAGE yükleme boyası ile karıştırılır. İstenildiğinde -20 °C’de saklanır. Doğal şartlarda protein analizi çalışmalarında SDS-PAGE yükleme boyası B-merkaptetanol içermez, denatüre şartlarda ise 200 mM B-merkaptetanol eklenir ve 37 °C’de 5 dakika inkübasyon gerçekleştirilir.
10. Kalan toplam çözünür protein örneklerden 1.5’er ml toplam çözünür protein Ni-NTA saflaştırmasına alınır kalan proteinler -86 °C’de saklanır.

EK-19. Dış Ortam Proten Örneklerinin Konsantrasyonu

Dış ortam protein örnekleri ultrafiltrasyon tüpleri (Amicon Ultra 15K- 10,000 MWCO) kullanılarak konsantre edilmiştir. Bu ultrafiltrasyon tüpleri 10 kDA ve üzerinde büyüklüklerdeki proteinleri filtresinde tutarak santrifüj ile diğer 10 kDA küçük proteinlerle birlikte tamponları uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Swing rotorlu santrifüjde +4 derecede 4000 x g’de santrifüj işlemleri gerçekleştirilir.

EK-20. SDS-PAGE ve SDS-PAGE Yükleme Boyasının Hazırlanması

Poliakrilamid jel hazırlığında kullanılacak olan solüsyonlar taze olarak deney öncesinde hazırlanır. %12'lik ayrıştırma ve %5'lik paketleme jeli SDS-PAGE analizlerinde kullanılmıştır (Tablo 7). Tez çalışmasında alternatif olarak BioRAD TGX™ FastCast™ Acrylamide Solutions kiti kullanılarak jeller (%10 ayrıştırma, %5 paketleme) hazırlanıp SDS-PAGE çalışmaları yapılmıştır.

Tablo EK-21.1. SDS-PAGE analizi için poliakrilamid jel hazırlanması. Jel solüsyonları hazırlanırken en son APS ve TEMED eklenir. Analizlerde 1.0mm aralığı olan camlar ve 1.0 mm kalınlığı olan taraklar kullanılır. Önce %12 ayrıştırma jeli hazırlanarak hazırlanan cam düzeneğe eklenir ve üzeri dH₂O ile tamamlanarak jelin düz sınır oluşturacak şekilde polimerize olması beklenir. Daha sonrasında %5'lik paketleme jeli solüsyonu eklenir ve taraklar düzeneğe yerleştirilerek, jelin polimerasyonu beklenir. Hazırlanan düzene elektroforez tankına artı ve eksi kutuplara uygun olacak şekilde yerleştirilir.

Kimyasallar	%12 ayrıştırma jeli (10ml)	%5 paketleme jeli (10ml)
29:1 Akrilamid/Bis	4 ml	1.7 ml
Jel Tamponu	2.5 ml 1.5M Tris-HCl pH: 8.8	2.5 ml 0.5M Tris-HCl pH: 6.8
%g/h Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	0.1 ml	0.1 ml
10% Amonyum Persülfat (APS)	50 µl	50 µl
Tetrametiletildiamin (TEMED)	5 µl	10 µl
dH ₂ O	3.4 ml	5.7 ml

Toplamda 2 jel hazırlanır, birisi coomassie boyama işlemine alınır diğeri de Western Blot analizi için kullanılır. 5x SDS-PAGE yükleme tamponu ile karıştırılmış protein örnekleri, poliakrilamid jel kuyularına 1-25 µl olacak şekilde eklenir. Tez çalışmasında deney gruplarının yanı sıra pozitif kontrol olarak sfGFP pozitif kontrolü ve Humatrope 8mg ticari ürün olan büyüme hormonu pozitif kontrol proteini kullanılmıştır. Ticari protein belirteci olarak da PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoScientific, #26619) (ThermoScientific, #26619) kullanılmaktadır. Jeller paketleme jeline kadar 60 V sonrasında ise jel 80 V olacak şekilde 2-3 saat boyunca koşturulur sonrasında BioRad Gel Doc EZ (BioRAD, #1708270) görüntüleme cihazında, cihazın mavi tablası kullanılarak GFP ışına analizi yapılmaktadır. Görüntü alındıktan sonra jel coomassie boyası ile 1 saat boyunca karıştırmalı tablada oda sıcaklığında inkübe edilir ve gece boyu dH₂O kullanılarak de-staining işlemi gerçekleştirilir, BioRad cihazının beyaz tablası kullanılarak coomassie görüntülemesi gerçekleştirilir.

Tablo EK-21.2. 5x SDS-PAGE yükleme tamponu hazırlanması. %5'lik olacak şekilde 0.4 ml DTT veya B-merkaptetanol denatüre edici ajan olarak tampona eklenebilir.

5x SDS-PAGE yükleme tamponu
1 ml 0.5M Tris-HCL pH: 6.8
1.6 ml %10 SDS
0.4 ml %10 Bromfenol mavisi
0.8 ml %99 Gliserol
3.9 ml dH ₂ O

EK-21. Ni-NTA ile Proteinlerin Afinitik Saflaştırılması

Ni-NTA agaroz en çok kullanılan bağlayıcı (kenetleyici) ligand olarak IMAC (immobilize metal affinite kromatografi) için satılmakta olan ticari bir üründür. Nitrotriasetik asit (NTA) dört dişli bir kenetliyicidir ve Ni²⁺ iyonlarının oluşturduğu alandaki 6 bağlanma bölgesinden 4'üne bağlanır. Geri kalan 2 bağlanma bölgesi koordinasyon bölgeleri de su molekülleri tarafından sarılır veya **histidin takılı rekombinant proteinler** ile değişim yapılabilir (Macherey-Nagel – 10/2013, Rev.04). Tez kapsamında Protino Ni-NTA agaroz ve Qiagen Ni-NTA agaroz ürünleri ile Ni-NTA saflaştırması gerçekleştirilmiştir.

Üretilen Histidin takılı proteinlerin saflaştırılmasıyla elde edilen toplam çözünür proteinler 'batch' veya 'semi-batch' protokolleri uygulanarak Ni-NTA saflaştırmasına alınmıştır.

Tablo EK-22.1. Ni-NTA agaroz saflaştırması için tamponların hazırlanışı. Tüm tamponların pH'sı NaOH kullanılarak pH:8'e denk getirilir (Macherey-Nagel – 10 / 2013, Rev. 04). Tez çalışmasında yıkama tamponunda 20mM imidazol yerine **50mM imidazol** (3.4gr/1lt) ve elüsyon tamponuna 250mM imidazol yerine **500mM imidazol** (34 gr/1lt) kullanılmaktadır.

Kimyasallar	Lizis/Bağlanma Tamponu (1lt)	Yıkama Tamponu (1lt)	Elüsyon Tamponu (1lt)
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O M _A : 156.01 g/mol	50mM NaH ₂ PO ₄ 7.80 gr	50mM NaH ₂ PO ₄ 7.80 gr	50mM NaH ₂ PO ₄ 7.80 gr
NaCl M _A : 17.54 g/mol	300mM NaCl 17.54 gr	300mM NaCl 17.54 gr	300mM NaCl 17.54 gr
İmidazol M _A : 68.08 g/mol	10mM imidazol 0.68 gr	20mM imidazol 1.36 gr	250 mM imidazol 17 gr

Optimum şartlarda Ni-NTA agaroz saflaştırması için tamponlar hazırlanırken kullanılan kimyasalların konsantrasyonlarında ve pH derecelerinde değişiklikler yapılabilir. Literatür araştırmasında, non-spesifik bağlanmaların azaltılması için **hücre lizisi** aşamasında NaCl konsantrasyonu 500mM'a kadar çıkarılabilir (üst sınır 2M) ve imidazol konsantrasyonu 20mM'a yükseltilebilir. Proteaz inhibitörlerinin de eklenmesi non-

spesifik bağlanmaları azalttığı belirtilmektedir. Yıkama aşamasında 10-50 mM arası konsantrasyonda imidazol kullanımı tavsiye edilmektedir, bu aşamada da non-spesifik bağlanmanın azaltılması için yıkama tamponu pH'sı 8'den 6.3'e kadar düşürülebilmektedir. Elüsyon aşamasında, elüsyon tamponu pH'sı 5.3-4.5 aralıklarda kullanılması ile histidin kökü imidazol atomunu protonlamasıyla histidin ile geçiş metali arasındaki bağ kesintiye uğrar. Histidin analog imidazol miktarı artırılarak etkili elüsyon işlemi yapılabilir, bu durumda 250 mM imidazol konsantrasyonundan daha fazla imidazol kullanılabilir. Yüksek miktarda imidazol içeren protein örneklerinin ısıyla kaynatılması, SDS-PAGE'den öncesi hidrolize edilmesi için asit-labil (kararsız) bağların oluşumuna neden olacağından dolayı 37°C'den fazla ısıyla örneklerin SDS-PAGE yükleme boyası ile inkübe edilmesi önerilmemektedir.

Tez çalışmasında kitlerde belirtilen standart protokollere uyum sağlanmıştır. Tamponların pH değerleri pH:8 olarak ayarlanmıştır. Yıkama tamponunda **50mM** ve elüsyon tamponunda 500mM konsantrasyonunda imidazol kullanılmaktadır. Hem 'batch' hem de 'semi-batch' Ni-NTA agaroz çalışması tez kapsamında çalışmıştır. Ni-NTA agaroz solüsyonu (slurry) %50 etanol %50 Ni-NTA agaroz içermektedir. Qiagen Ni-NTA agaroz protokolünde 4 ml protein örneği için 1 ml slurry (4:1) önerilmektedir. Tez çalışmasında 1.5 ml toplam protein çözünür proteini için 300 µl Ni-NTA slurry (150 µl boncuk = yatak hacmi) kullanılmaktadır.

Ni-NTA agaroz saflaştırması sonrasında elde edilen protein elüsyonları SDS-PAGE analizi için 10-100 µl protein örneği (10 µl) 10-100 µl 5x SDS-PAGE (40 µl) yükleme boyası olmak üzere hazırlanır. GFP içeren füzyon proteinlerinin incelenmesi için doğal koşullarda analiz yapılması gerekmektedir. Bu yüzden SDS-PAGE yükleme boyası denatüre edici kimyasal ajan içermemektedir ve hazırlanan protein örnekleri ısıtılarak denatüre edilmemektedir. Kalan protein elüsyonları -86°C'de saklanır.

Tablo 22.2.

Batch ve Semi-batch Ni-NTA agaroz saflaştırma protokolü. Protokol, Macherey-Nagel Ni-NTA agaroz protokolüne uygun olarak yazılmıştır (Macherey-Nagel – 10 / 2013, Rev. 04). Semi-batch protokolünde kalibrasyon ve bağlanma aşamaları laboratuvarımızda kullandığımız kolonlara göre optimize edilerek yeniden düzenlenmiştir. ‘Semi-batch’ protokolünde bağlanma tamponu ile kalibrasyon ve Ni-NTA agaroz-protein karışımının bağlanması aşamaları kromatografi kolonları içerisinde gerçekleşmektedir.

Aşamalar	Ni-NTA Agaroz ‘Batch’ Saflaştırma		Ni-NTA Agaroz ‘Semi-batch’ Saflaştırma
Kalibrasyon	1	Ni-NTA agaroz karışımı homojen bir şekilde nazikçe karıştırılır.	
	2	%50 Ni-NTA agaroz etanol karışımı alınır (2ml süspansiyon = 1ml Ni-NTA agaroz yatak hacmi).	
	3	500 x g’de 5 dakika boyunca santrifüj yapılır ve süpernatant uzaklaştırılır.	
	4	10 yatak hacmi bağlanma/lizis tamponu Ni-NTA agaroz üzerine kalibrasyon için eklenir.	
	5	500 x g’de 5 dakika boyunca santrifüj yapılır ve süpernatant uzaklaştırılır.	
Bağlanma	6	Toplam çözünür protein örneği nazikçe kalibre edilmiş Ni-NTA agaroz boncukları üzerine eklenir.	
	7	Protein ve Ni-NTA agaroz karışımı 30-60 dakika ya da +4°C’de gece boyu çalkamalı tablada bağlanma için yavaşça inkübe edilir. (Semi-batch saflaştırma için 10 yatak hacmi bağlanma tamponu kolona eklenerek kolon +4°C’de gece boyu bekletilir sonrasında tampon uzaklaştırılarak kolon kalibre edilir.)	
	8	500 x g’de 5 dakika santrifüj yapılır ve dikkatlice süpernatant alınarak, ‘Flow Through’ protein örneği olarak saklanır.	Protein ve Ni-NTA agaroz karışımı kolona aktarılır ve 15 dakika inkübasyon sonrası yerçekimi etkisiyle kolondan solüsyonun uzaklaşması sağlanır. Elde edilen solüsyon ‘Flow Through’ protein olarak saklanır.
Yıkama	9	10 yatak hacmi yıkama tamponu karışıma eklenir ve mikrosantrifüj tüpte yavaşça karıştırılır.	10 yatak hacmi yıkama tamponu karışıma eklenir ve kolon çıkışı kapatılarak 3 dakika inkübe edilir.
	10	500 x g’de 5 dakika santrifüj yapılır ve dikkatlice süpernatant alınarak, ‘Wash’ protein örneği olarak saklanır.	İnkübasyon sonrası yerçekimi etkisiyle yıkama solüsyonu uzaklaştırılır ve ‘Wash’ protein örneği olarak saklanır.
	11	Yıkama aşaması 2 kez tekrarlanır.	
Elüsyon	12	2 yatak hacminde (300 µl) elüsyon tamponu mikrosantrifüj tüpe eklenir. 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyon yapılır.	2 yatak hacminde (300 µl) elüsyon tamponu kolona eklenir. Kolon çıkışı kapatılarak, 30 dakika +4°C’de inkübasyon yapılır.
	13	500 x g’de 5 dakika santrifüj yapılır ve dikkatlice süpernatant alınarak ‘Elution’ protein örneği olarak saklanır.	Yerçekimi ile kolondan solüsyon uzaklaşması sağlanır, elüsyon fraksiyonları toplanarak ‘Elution’ protein örneği olarak saklanır.
	14	Elüsyon işlemi 3 kere aynı koşullarda tekrarlanır.	Elüsyon işlemi 3 kere aynı koşullarda tekrarlanır.
	15	Elüsyon aşaması 3 kez tekrarlanır.	
	16	Protein örnekleri belirli hacimlerde SDS-PAGE yükleme boyası ile karıştırılarak -20°C’de saklanır. Kalan protein örnekleri ise -86 °C muhafaza edilir (imidazol varlığında proteinler geri dönüşümsüz çökelti oluşturduklarından imidazol uzaklaştırılmalıdır.).	

EK-22. Western Blot Protokolü

Western blot deneylerinde kullanılan tamponlar taze olarak hazırlanmalıdır. 4 farklı tampon kullanılmaktadır (BioRAD bulletin_2895 ve Cold Spring Harbor protocols).

Tablo EK-22.1. Western Blot analizi için tamponların hazırlanması. Düşük hacimlerde distile su kullanılarak solüsyonlar homojen hale getirilir ve daha sonrasında yine distile su eklenerek tamponlar final hacimlerine ulaştırılır. Towbin tamponu ve Bloklama tamponu 100 ml veya daha küçük hacimlerde hazırlanır.

Tamponlar	Kimyasalların final konsantrasyonları (mM, h/h)	1 litre tampon için kimyasal miktarı (gr,lt,ml)
10x Tris-buffered salin (TBS) pH 7.5	500 mM Tris, 1500 mM NaCl	60,6 gr Tris, 87,6 gr NaCl
1x TBS tamponu pH: 7.5	50 mM Tris, 150 mM NaCl	6,06 gr Tris, 8,76 gr NaCl
1x TBS-T tamponu pH: 7.5	1x TBS, %0.05 Tween 20	1lt TBS, 0.5 ml Tween 20
1x Towbin tamponu pH: 8.3	25 mM Tris, 192 mM Glisin, %20 Metanol, %0,1 SDS (%10 SDS stok)	3.03 gr Tris, 14.40 gr Glisin, 200 ml Metanol, 10 ml SDS
1x Bloklama tamponu	1x TBS, %5 kuru yağsız süt tozu	1lt TBS, 50 gr kuru yağsız süt tozu

Western Blot için Bloklama Aşaması:

1. Western Blot işlemi için ayrılan jel distile su ile yıkanarak tampon ve SDS'den arındırılır. Yıkanmış jel taze hazırlanmış Towbin tamponu içerisine alınarak çalkalamalı tablada 30 dakika inkübe edilir.
2. Jelin tampon içerisinde genişmesi göz önünde bulundurularak son 20 dakika kala jelin ölçümleri yapılır ve ölçümlere göre PVDF membran (Millipore PSQ 0,2 µm membran) kesilir. Aynı zamanda 1 bloklama için 2 adet BioRAD kalın blot filtre kağıtlarının aynı boyutlarda kesimi yapılır. Kesilen mebranın ve filtre kağıtlarının jelin boyutlarından daha büyük olmaması gerekmektedir.
3. Jel boyutlarına göre kesilmiş PVDF membran 30 saniye boyunca %100 metanol ile aktive edilir ve 15 dakika Towbin tamponunda çalkalamalı tablo üzerinde oda sıcaklığında inkübe edilir.
4. Hem jelin hem de membranın Towbin tamponu ile inkübasyonu sonrasında, yarı kuru blotlama cihazına öncelikle ıslatılmış kalın filtre kâğıdı yerleştirilir ve üstüne sırasıyla PVDF membran, poliakrilamid jel ve diğer ıslatılmış kalın filtre kâğıdı sıkı sandviç olacak şekilde konumlanır. Her ekleme sonrasında hava kabarcıkları uzaklaştırılır.
5. Bloklama işlemi 100mA sabit 250 V 'da 45 dakika olacak şekilde gerçekleştirilir.
6. Bloklama sonunda membran ve jel nazikçe ayrılır. Bloklama verimi kontrol edilmesi için jel coomassie boyama işlemine alınır.

Bloklama Aşaması:

7. Membran bloklaması, membranın yerleştirildiği kaba 20 ml %5 yağsız kuru süt tozu içeren TBS-T tamponunun ilave edilmesi ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca çalkalamalı tablada gerçekleşir. Bloklama solüsyonu bloklama işlemi bittiğinde membranın bulunduğu kaptan uzaklaştırılır.

Birincil Antikor Uygulaması:

8. Bloklama işlemi sonrasında TBS-T solüsyonu ile membran 3 kez 5'er dakika süre ile çalkalamalı tabla üzerinde hafifçe karıştırılarak yıkanır. Her yıkama sonrasında TBS-T uzaklaştırılır.
9. Yıkama aşaması sonrasında, %5'lik süt tozu içeren 10 ml TBS-T eklenir ve üzerine birincil antikor olarak 50 µl anti-GH-1/2 poliklonal antikor (Santacruz, sc-36787) dikkatlice aktarılır ve +4 derecede gece boyu çalkalamalı tablada inkübe edilir. Tez çalışmasında 1 µl birincil antikor: 200 µl TBS-T oranında birincil antikor uygulaması gerçekleştirilmiştir.
10. Birincil antikor uygulamasından sonra antikor ve TBS-T solüsyonu temiz bir konik santrifuj tüpüne aktarılarak tekrar kullanımı için 4°C'de saklanır.

İkincil antikor uygulaması:

11. Membran üzerinde bağlanmayan antikor ve solüsyon kalıntılarının uzaklaştırılması için membran TBS-T tamponu ile 3 kez 5'er dakika boyunca yıkanır.
12. Yıkama işlemi sonrasında membran üzerine 10 ml TBS-T eklenir ve ikincil antikor olarak 1 µl Goat Anti-Rabbit IgG Antibody (GenScript, A00131) aktarılarak 1,5 saat oda sıcaklığında çalkalamalı tablada inkübasyon gerçekleştirilir. Tez çalışmasında 1 µl ikincil antikor: 10000 µl TBS-T oranında ikincil antikor uygulaması gerçekleştirilmiştir.
13. Inkübasyon sonrasında ikincil antikor içeren TBS-T solüsyonu temiz bir konik santrifuj tüpüne aktarılarak tekrar kullanım için 4°C'de saklanır.

Görüntüleme:

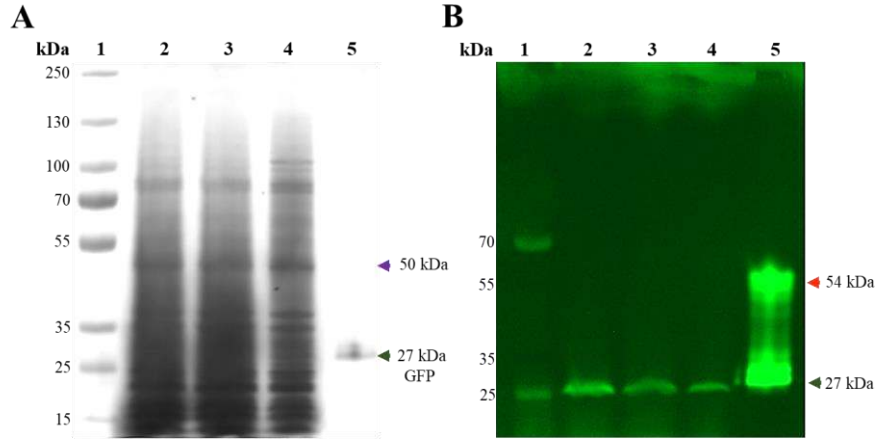
14. İkincil antikor kalıntılarının ve solüsyonların tamamen uzaklaştırılması için 2 kez 5'er dakika TBS-T ve 2 kez 5'er dakika da TBS tamponu ile membran çalkalamalı tablada hafifçe karıştırılarak yıkanır. Her yıkama sonrası tamponlar uzaklaştırılır.
15. Membran temiz yüzeyi bulan bir tablaya aktarılır üzerine daha önceden oda sıcaklığına getirilmiş TMB solüsyonu (Pierce™ TMB Substrate Kit,

ThermoScientific #34021) eklenir. Karanlık bir ortam sağlanarak 30 dakika boyunca kolorimetrik reaksiyonun oluşumu için inkubasyon gerçekleştirilir.

16. TMB inkubasyonu sonrasında membran dikkatlice distile su ile yıkanır.
17. Pozitif kontrolün varlığı membran üzerinde tespit edilerek Western Blot çalışmasının kontrolü sağlanır ve membran görüntüleri elde edilerek ortaya çıkan sonuçlar değerlendirilir.



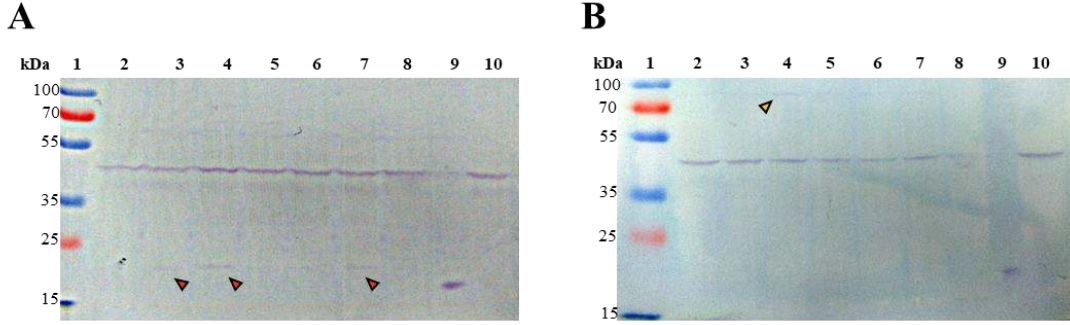
EK-23. 6xHis-sfGFP-EK.-hGH Üretiminde Kırık/Güçük Protein Üretimi Problemi



Şekil EK-23.1. pTtAC2-6xHis-sfGFP-EK.-hGH vektörlü D1, F1, H1 tek klon *T. thermophila* hücre hatlarının 6 saat ısı şoku indüklemesi sonrası hücre patlatma ile SDS-PAGE analizi. 2x SDS-PAGE boyası ile hücre patlatma gerçekleştirilmiştir ve 80 bin hücre/kuyu olacak şekilde yükleme yapılmıştır. A: Coomassie boyama görüntüsü. B: GFP ışıma görüntüsü, Gel Doc™ EZ Gel Documentation System mavi tabla kullanılmıştır (Biorad, 1708270). Kuyular A. ve B. şekilleri için de aynıdır. Kuyu 1: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoScientific, #26619), 2: D1 tek klon hücre hattı, 3: F1 tek klon hücre hattı, 4: H1 tek klon hücre hattı, 5: sfGFP pozitif kontrolü.

Hücre patlatma yöntemi ile Coomassie boyama verisinde füzyon proteinine eş yaklaşık 50 kDa büyüklüğünde kalın bir band (mor ok) görülmüştür ancak GFP ışıma görüntüsünde hedef füzyon proteini bandı saptanamamıştır ve kırık/güçük üretim olduğu düşünülen yaklaşık pozitif kontrole denk 27 kDa (yeşil ok, 54 kDa dimer GFP kırmızı ok) büyüklüğünde GFP ışıması bulunan protein bandları her klonda da görülmüştür (Şekil EK-23.1.). Çalışmanın devamında, elde edilen indüklenmiş hücrelerden toplam çözünür protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir ve bu protein örneklerinin Western Blot analizlerinde monomer ve dimer füzyon proteinleri hGH antikoru ile saptanmıştır ancak çözünür proteinlerde de aynı GFP ışıması profili görülmüştür (veri verilmemiştir). Bu sebeple, kırık/güçük üretim söz konusu olduğu için üretilen füzyon proteini üretiminde/eldesinde verim kaybı yaşandığı belirlenmiştir.

EK-24. PLA-6xHis-hGH ve PLA-hGH Üretimlerinde Sitoplazmik Protein Analizi



Şekil EK-24.1. pTtAC2-PLA-6xHis-hGH ve pTtAC2-PLA-6xHis-hGH taşıyan *T. thermophila* D5 ve C6 tek hücre klonlarının 38°C ısı şoku indüklemesi ile sitoplazmik protein üretim analizi.

A. PLA-6xHis-hGH sitoplazmik toplam çözünür proteinlerinin Western blot analizi.

Kuyu 1: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoScientific, #26619), **2:** D5.1 tek klon hücre hattı toplam çözünür protein, **3:** D5.3 tek klon hücre hattı toplam çözünür protein, **4:** D5.4 tek klon hücre hattı toplam çözünür protein, **5:** D5.5 tek klon hücre hattı toplam çözünür protein, **6:** D5.8 tek klon hücre hattı toplam çözünür protein, **7:** D5.10 tek klon hücre hattı toplam çözünür protein, **8:** Bulk hücre hattı toplam çözünür protein, **9:** Ticari ürün 22 kDa hGH pozitif kontrol proteini (Humatrope 8 mg, Eli Lilly), **10:** İndüklenmemiş D5.5 klon hücre hattı çözünür protein.

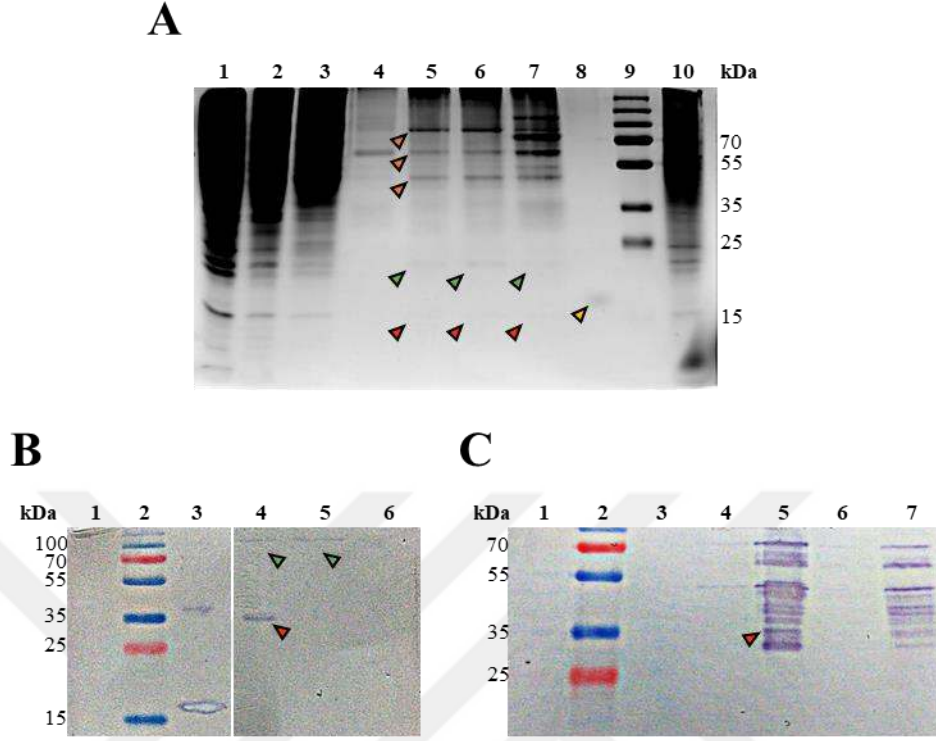
B. PLA-hGH sitoplazmik toplam çözünür proteinlerinin Western blot analizi. **Kuyu 1:** PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoScientific, #26619), **2:** C6.2 tek klon hücre hattı toplam çözünür protein, **3:** C6.4 tek klon hücre hattı toplam çözünür protein, **4:** C6.8 tek klon hücre hattı toplam çözünür protein, **5:** C6.9 tek klon hücre hattı toplam çözünür protein, **6:** C6.11 tek klon hücre hattı toplam çözünür protein, **7:** C6.12 tek klon hücre hattı toplam çözünür protein, **8:** pTtAC2-PLA-hGH vektörlü *T. thermophila* bulk hücre hattı toplam çözünür protein, **9:** Ticari ürün 22 kDa hGH pozitif kontrol proteini (Humatrope 8 mg, Eli Lilly), **10:** İndüklenmemiş C6.4 klon hücre hattı çözünür protein. 5X SDS-PAGE yükleme tamponu ile protein örnekleri karıştırılmıştır, 95°C'de 5 dk inkübasyon sonrası kuyulara protein örnekleri yüklenmiştir. Western Blot için % 12'lik ayırıştırma ve % 5'lik paketleme ile SDS-PAGE jeli hazırlanmıştır. Protein örnekleri ayırıştırma jeline gelesiyeye kadar 60 V'da daha sonra 80 V'da jel koşturulmuştur. Blotlama için 0.2 µm PVDF membran kullanılmıştır, Towbin tamponu % 0,1 SDS içermektedir ve blotlama 100mA sabit 250 V 'da 45 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. % 5'lik süt tozu içeren TBS-T ile 1 saat oda sıcaklığında membrana bloklama uygulanmıştır. Birincil anti-GH-1/2 poliklonal antikor (Santacruz, sc-367878) 1:200 oranında %5'lik süt tozu içeren TBS-T ile kullanılmış +4 derece gece boyu, ikincil antikor olarak 1:10000 HRP Konjuge Anti-Rabbit antikor (GeneScript, A00098) TBS-T ile kullanılmış oda sıcaklığında 1 buçuk saat inkübe edilmiştir. Görüntüleme TMB substratı ile 15 dakika inkübasyon sonucu gerçekleştirilmiştir (ThermoScientific, N301).

Dışarı salgılatılması hedeflenen PLA-6xHis-hGH ve PLA-hGH protein örneklerinin sitoplazmik protein analizlerine bakıldığında, Şekil EK-24.1.A.'da kırmızı oklarla gösterilen yaklaşık 22 kDa protein bantlaşması 3, 4 ve 7. kuyularda zayıf olarak görülmekteyken diğer deney gruplarında ve negatif kontrolde (10. kuyu) görülmemektedir. 44 kDa dimer protein bantlaşması da 6xHis-hGH ve hGH proteinlerinin üretiminde görüldüğü gibi bu tasarımların üretiminde görülmektedir (EK-24.1A. ve B.).

Beklenen sitoplazmik 22 kDa hGH bantlaşması PLA-hGH üretiminde saptanmamakta olup 4. kuyuda turuncu okla gösterilen yaklaşık 80-90 kDa arasında oluşan protein bantlaşmasının hGH tetrameri (88 kDa) olabileceğini düşündürmektedir. Bu protein bantlaşması diğer deney gruplarında ve ayrıca indüklenmemiş deney grubunda da görülmemesi bu düşünceyi desteklemektedir.



EK-25. 6xHis-hGH Proteinlerinin Ni-NTA Saflaştırması Sonrası Protein Analizleri



Şekil EK-25.1. pTtAC2-6xHis-hGH vektörü taşıyan *T. thermophila* B11.2 tek hücre klonunun açlık tamponunda 500 ml hacimde 38°C 6 saat ısı şoku ile sitoplazmik protein üretim analizi.

A. İndükleme sonrası B11.2 tek klon hücre hattından protein izolasyonu ile Ni-NTA saflaştırması Coomassie boyama analizi. Açlık tamponunda (Tris-HCL pH: 7.5) 500 ml hücre kültürü ile indükleme gerçekleştirildi ve protein izolasyonu ile 40 ml lizat elde edildi. 35 ml lizat Amicon Ultra-15 santrifuj filtresi (Millipore UFC901024) ile 5 ml elde edilecek kadar konsantre edildi. 4 ml protein lizatı için 1 ml Ni-NTA boncuk slurry kullanılmıştır (Ni-NTA Agarose-Qiagen, 30230). Ni-NTA (yerçekimi akışı-kolon saflaştırma) saflaştırma koşulları: **1.** yıkama: 20 mM imidazol, % 0.1 TX100, pH: 7.9, **2.** Yıkama 2: 50 mM imidazol, % 0.1 TX100, pH: 7.7. **3.** yıkama: 80 mM imidazol, % 0.1 TX100, pH: 7.5. Elüsyonlar 400 mM imidazol ile (yarım saat aralıklarla inkübasyon ile 4 farklı elüsyon) gerçekleştirildi. TX100 = Triton-X-100.

Kuyu 1: Konsantre toplam çözünür protein örneği, **2:** Ni-NTA Flow protein örneği, **3:** Ni-NTA yıkama 1 protein örneği, **4:** Ni-NTA yıkama 3 protein örneği, **5:** Elüsyon 1 protein örneği **6:** Elüsyon 2 protein örneği, **7:** Elüsyon 3 protein örneği, **8: Pozitif kontrol;** Humatrope 8 mg pozitif ticari kontrol (Humatrope, Eli Lilly), **9:** PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoScientific, #26619), **10: Negatif kontrol;** vektör içermeyen *T. thermophila* CU428 toplam çöz protein.

Merkaptoetanol içermeyen 5X SDS-PAGE yükleme tamponu ile protein örnekleri karıştırılmıştır ve direk olarak kaynatmadan kuyulara protein örnekleri yüklenmiştir. Coomassie Boyama ve Western Blot ve için % 15'lik ayrıştırma ve % 5'lik paketleme ile SDS-PAGE jeli hazırlanmıştır. Protein örnekleri ayrıştırma jeline gelesiye kadar 60 V'da daha sonra 80 V'da jel koşurulmuştur.

B. Konsantre Ni-NTA elüsyonlarının anti-hGH antikoruna ile Western Blot Analizi. Şekil EK-25.1.A. Coomassie analizindeki protein örneklerinde anti-hGH antikoruna ile yapılan Western Blot analizinde pozitif kontrol dışında protein bandı görülememiştir ve bu yüzden tüm elüsyon örneklerinden elde edilen toplam 3.5 ml Ni-NTA elüsyonları 10x konsantre edilmiştir. Aynı şekilde 10x konsantre edilen vektör içermeyen indüklenmiş *T. thermophila* CU428 hücre protein lizatı da negatif kontrol olarak eklenmiştir. Blotlama için 0.2 µm PVDF membran kullanılmıştır, Towbin tamponu % 0,1 SDS içermektedir ve

blotlama 100 mA sabit 250 V 'da 45 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. % 5'lik süt tozu içeren TBS-T ile 1 saat oda sıcaklığında membrana blokama uygulanmıştır. Birincil 'yeni' anti-GH-1 monoklonal antikoru (sc-57158) 1:100 oranında %5'lik süt tozu içeren TBS-T ile kullanılmış +4 derece gece boyu, ikincil antikor olarak 1:10000 HRP Goat Konjuge Anti-Mouse antikoru (Genescript, A00160) TBS-T ile kullanılmış oda sıcaklığında 1 buçuk saat inkübe edilmiştir. Görüntüleme TMB substratı ile 15 dakika inkübasyon sonucu gerçekleştirilmiştir (ThermoScientific, N301).

Kuyu 1: Negatif kontrol; vektör içermeyen 10x konsantre *T. thermophila* CU428 toplam çöz protein, **2:** PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoScientific, #26619), **3: Pozitif kontrol;** Humatrope 8 mg pozitif ticari kontrol (Humatrope, Eli Lilly), **4:** 10x konsantre Ni-NTA elüsyon protein örneği, **5:** Konsantre edilmemiş Ni-NTA elüsyon 1 protein örneği, **6:** Konsantre toplam çözünür protein.

C. Konsantre Ni-NTA elüsyonlarının anti-His antikoru ile Western Blot Analizi. Jel yüzdesi, jel koşturma ve Western Blot işlemleri Şekil EK26-1.B. ile aynıdır. Birincil anti-His mouse monoklonal antikoru (ThermoScientific, MA1-21315) 1:5000 oranında %5'lik süt tozu içeren TBS-T ile kullanılmış +4 derece gece boyu, ikincil antikor olarak 1:10000 HRP Konjuge Goat Anti-Mouse antikoru (Genescript, A00160) TBS-T ile kullanılmış oda sıcaklığında 1 buçuk saat inkübe edilmiştir. Görüntüleme TMB substratı ile 15 dakika inkübasyon sonucu gerçekleştirilmiştir (ThermoScientific, N301). **Kuyu 1: Negatif kontrol;** vektör içermeyen 10x konsantre *T. thermophila* CU428 toplam çöz protein, **2:** PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoScientific, #26619), **3:** Humatrope 8 mg pozitif ticari kontrol (Humatrope, Eli Lilly), **4:** Ni-NTA elüsyon konsantrasyon flow protein örneği **5:** Konsantre edilmemiş Ni-NTA elüsyon 1 protein örneği, **6:** Konsantre toplam çözünür protein.

6xHis-hGH üretimi ve saflaştırması için 500 ml olarak büyük flask kültürü hacminde ısı şoku indüklemeleri ile hücrelerden protein izolasyonu ve elde edilen isolatlardan ise optimize edilmiş Ni-NTA saflaştırması amaçlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan deney tasarımı, toplamda 40 ml çözünür protein elde edilmiştir ve 35 ml lizat Amicon Ultra-15 santrifuj filtresi (Millipore UFC901024) ile 5 ml elde edilecek kadar konsantre edilerek, 4 ml protein lizatı için 1 ml Ni-NTA boncuk slurry kullanılmıştır (Ni-NTA Agarose-Qiagen, 30230). Şekil EK-25.1.A 'da Coomassie boyama analizinde elüsyonlarda görülen 17 kDa (kırmızı ok) ve 22 kDa (yeşil ok) hGH bantları daha önceki Western Blot analizlerinde görülen bantlarla ilişkilendirilmiştir. Ancak, bu çalışmada gerçekleştirilen Western Blot analizinde herhangi bir protein bandı belirlenememiştir. Bunun sebebi yeni kullanılan anti-GH-1 monoklonal antikorunun (sc-57158) kullanım oranlarının (1:200) optimize edilmemesi olduğu düşünülmüştür. Bu sebeple elde edilen 4 farklı elüsyon örnekleri konsantre edilerek tekrardan Western Blot analizi (1:100 anti-hGH) gerçekleştirilmiştir. Şekil EK-25.1.B.'de görüldüğü üzere 17 kDa monomerin dimeri olarak düşünülen 34 kDa protein (kırmızı ok) anti-hGH tarafından saptanmıştır ve Western Blot analizinde görülmektedir. Bu band 1. kuyuda kullanılan negatif kontrol de görülmemektedir. Ayrıca farklı yapıda önceki çalışmalarda da saptanan tetramerik 22 kDa (88 kDa) olduğu düşünülen yeşil okla gösterilen protein bantlatması da

belirlenmektedir. Anti-His antikoru ile yapılan Western Blot analizinde ise kırmızı ok ucunda gösterilen 34 kDA dimer bantı görülmektedir (Şekil EK-26.C.). Histidin antikoru 5. kuyuda bulunan konsantre elüsyon ve 7. kuyuda bulunan konsantre toplam çözünür proteinlerin farklı birçok bant görülürken, bu bantlaşmalar konsantre CU428 toplam çözünür proteinlerde görülmemektedir.

Bu çalışma ile hGH'nin dimerleşme özelliği gösterdiğinden konsantre edildiğinde ortamda su molekülünün azalması ile hidrofobik etkileşimlerle dimer ve diğer -merik formlarına dönüştüğü anlaşılmıştır. *T. thermophila* proteazları tarafından kesilmesi sebebiyle de birçok hGH formunun sitoplazmada var olduğu ve bu formlarında farklı yapılar oluştuurmasıyla kirliliğe sebep olduğu düşünülmektedir. Bu durumun oluşmaması için gerekli iyileştirme çalışmaları düşünülmüş ve tartışılmıştır.

EK-26. hGH kodlayıcı gen dizili TtAC2 vektörlerini taşıyan *E. coli* ve *T. thermohpila* hücre stokları



Şekil EK-26.1. hGH gen kasetlerini içeren TtAC2 vektörlerini taşıyan *E. coli* hücre hatları stokları.

Tablo EK-26.1. hGH kodlayıcı gen dizili TtAC2 vektörlerini taşıyan *T. thermophila* CU428 hücre hatları.

- A.** ‘Sıvı Azot Hücre Stokları Mehmet ÇALISEKİ’ adlı, sıvı azot tankında mavi etiketli raflığın en alttan 5. rafında bulunan kutu içerisinde muhafaza edilen hücre stokları.
- B.** ‘Mehmet 2019 pTtAC2 hGH’ adlı, sıvı azot tankında mavi etiketli raflığın en alttan 6. rafında bulunan kutu içerisinde muhafaza edilen hücre stokları.

Hücre stokları hazırlanırken 1’er veya 2’şer fazla stok hazırlanmıştır ve her biri için tekrardan canlandırma protokolü gerçekleştirilip canlılıkları kontrol edilmiştir. İlk hazırlanan kutu yer kalmadığı için ikinci kutu hücre stoklarının muhafazası için kullanılmıştır.

A

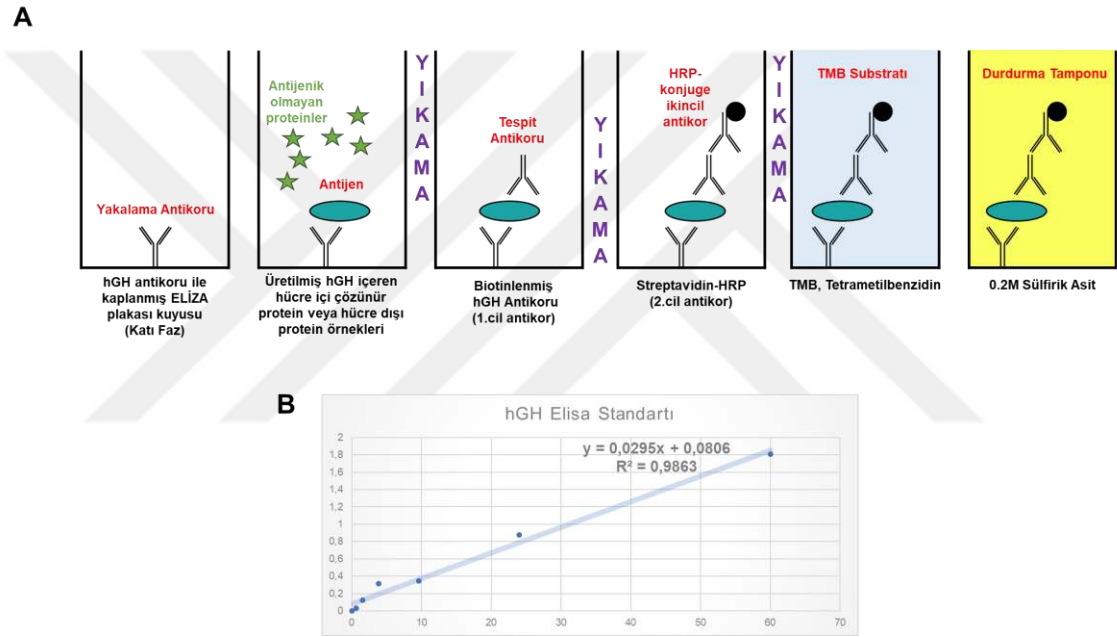
<i>T. thermophila</i> Cu428 ırkı transformant klon adı	Tarihi	Adet
pTtAC2-hGH-6xHis-GFP-hGH içeren D1 tek hücre klonu hattı	23.11.18	12
pTtAC2-hGH-6xHis-GFP-hGH içeren 2A1 tek hücre klonu hattı	30.11.18	12
pTtAC2-hGH-6xHis-GFP-hGH içeren 2C1 tek hücre klonu hattı	30.11.18	12
pTtAC2-hGH içeren A4 bulk hücre hattı	21.01.19	6
pTtAC2-6x-hGH içeren B11 bulk hücre hattı	21.01.19	6
pTtAC2-PLA-hGH içeren C6 bulk hattı	21.01.19	6
pTtAC2-PLA-6x- hGH içeren D5 bulk hattı	21.01.19	6
pTtAC2-hGH içeren A4.3 tek hücre klonu hattı	07.02.19	6
pTtAC2-hGH içeren A4.9 tek hücre klonu hattı	07.02.19	6
pTtAC2-6x-hGH içeren B11.2 tek hücre klonu hattı	08.02.19	6
pTtAC2-6x-hGH içeren B11.7 tek hücre klonu hattı	08.02.19	6
pTtAC2-PLA-hGH içeren C6.9 tek hücre klonu hattı	18.02.19	6
pTtAC2-PLA-hGH içeren C6.2 tek hücre klonu hattı	18.02.19	6
pTtAC2-PLA-6x-hGH içeren D5.3 tek hücre klonu hattı	19.02.19	4

B

<i>T. thermophila</i> Cu428 ırkı transformant klon adı	Tarihi	Adet
pTtAC2-PLA-hGH içeren C6.4 tek hücre klonu hattı	19.02.19	6
pTtAC2-PLA-6x-hGH içeren D5.3 tek hücre klonu hattı	19.02.19	2
pTtAC2-PLA-6x-hGH içeren D5.4 tek hücre klonu hattı	20.02.19	6
pTtAC2-PLA-6x-hGH içeren D5.10 tek hücre klonu hattı	20.02.19	6

EK-27. hGH ELİZA Protokolü ve Standart Grafiği

ThermoScientific hGH ELİZA kiti (Growth Hormone Human ELISA Kit, #EHGH1) kullanılarak 2.5-600 pg/mL değerleri arasında seri dilüsyonlar ile hGH standartları elde edildi ve sandviç ELİZA metodu ile deney gerçekleştirilerek 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik sonuçlar elde edildi. Elde edilen OD değerleri ile hGH standart grafiği oluşturuldu. Şekil EK-26.1’de görüldüğü üzere kullanılabilir R^2 değerine (0,9863) sahip standartın $y=0,295x + 0,0806$ formülü hGH’nin miktarsal analizleri için kullanılmıştır.



Şekil EK-26.1. hGH ELİZA kiti protokolü ve hGH standartı hazırlanması. A. hGH ELİZA kiti protokolü. Sandviç ELİZA protokolü gerçekleştirilmiştir. Kullanılan kimyasalların miktarları ve inkübasyon süreleri protokolde belirtildiği gibi uygulanmıştır (ThermoScientific, Growth Hormone Human ELISA Kit, #EHGH1). **B. hGH ELİZA standart grafiği.** R^2 değeri 0,9863 olup, $y=0,295x + 0,0806$ hGH standart formülüdür. Deney gruplarındaki hGH miktarları, burada belirtilen formül ile hesaplanmıştır.

EK-28. Tez Çalışmasında Kullanılan Kitler, Enzimler ve Cihazlar

Kullanılan Kitler:

GeneJet Plasmid Mini Saflaştırma Kiti (Thermo, #K0691), GeneJet Plasmid Midi Saflaştırma Kiti (Thermo, #K0691), GeneJet Jel Saflaştırma Kiti (Thermo, #K0691), Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, A1120)

Kullanılan Enzimler:

PrimeStar HS DNA Polimeraz (Takara, R010Q), Taq DNA Polimeraz (Fermantas, EP0401), T4 DNA Ligaz (NEB, M0202S)

Kullanılan Cihazlar:

PZR Cihazı (Biorad, iCycler thermal; Applied Biosystem, Veriti Thermal Cycler), Agaroz Jel Elektroforez Aparatı (Thermo EC Mini Cell EC320, Thermo EC Midi Cell Ec 330 ve BioRad Mini SubCell GT), Güç Kaynağı (Thermo Electrocorporation EC250-90), UV Jel Görüntüleme Kabini (Uvitec M02 4611), pH Metre (Crison, Basic 20), Vorteks (IKA MS2), Su banyosu (Memmert D-91126), Nanodrop (Metek ND-100), Spektrofotometre (UV- 2101 PC Shimadzu), Terazî (Ohaus pro AV812), Gene Pulser Xcell (BioRad, 165-2666), Manyetik Karıştırıcı (Schott, SLK6), Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System (Biorad, 165-2257), Etüv (Genhart, Thermo Shaker THO 220), Santrifüj (Thermo IEC Micromax, Beckman Coulter Microfuge 22R, ve Beckman Coulter Allegra 25R), Otoklav (Eastern Medical, Vertical Autoclave),

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mehmet ÇALISEKİ
Yabancı Dil : İngilizce
Doğum Yeri ve Yılı : Eskişehir / 1992
E-Posta : mcaliseki@gmail.com

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- 2011-2016, Lisans, Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, GNO: 3.72
 - 2014-2015 Güz ve Bahar Dönemi, Erasmus Öğrenci Öğrenim Hareketliliği, Adam Mickiewicz University, Faculty of Biology, Poznan, Polonya
 - 2014-2015 Yaz Dönemi, Erasmus Staj Hareketliliği, Adam Mickiewicz University, Faculty of Biology, Biochemistry Laboratory, Poznan, Polonya
- 2015-2016, Öğrenci İşçi, Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü
- 2016-2019, Tezli Yüksek Lisans, Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İleri Teknolojiler A.B.D., Biyoteknoloji Bilim Dalı, GNO: 3.79

Yayınları ve/veya Bilimsel/Sanatsal Faaliyetleri:

- Çalıseki M., Işık G. ve Leblebici S. (2016). Porsuk Nehri Suyunun *Cucumis sativus* L Tohumlarının Fide Gelişimi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi Anadolu Univ. J. Sci. Technol.-C 4, 77.
- Çalıseki M., Üstüntanır-Dede A.F., Arslanyolu M. (2016). Bio-mimicking of Tetrahymena Macronuclear rDNA Chromosome to Desing A New Type of Artificial Chromosome (TtAC-2) for *Tetrahymena thermophila*. Anadolu Üniversitesi 4. Tez Çalışması Poster Sunumu, 5 Mayıs 2016.
- Işık G. ve Çalıseki M. (2017). Ecophysiological effects of Porsuk River's water and boron mine wastewater on *Cucumis sativus* L. seeds. Acta Physica Polonica A, 132(3), 746–748.

- Çalışeki M., Dereli S., Arslanyolu M. (2018) Protein Terapötiği İnsan Büyüme Hormonu (hGH)'nın *Tetrahymena thermophila*'da Rekombinant Üretimi ve Karakterizasyonu, Eskişehir Teknik Üniversitesi Genel BAP, 1502F092.

Endüstriyel Faaliyetleri:

- Arslanyolu, M., Üstüntanır-Dede, A.F. ve Çalışeki M., (2019). *Tetrahymena Thermophila* Yapay Kromozomu 2 (TtAC2) ve Rekombinant Protein Üretiminde Kullanımı, Türk Patent ve Marka Kurumu Başvuru No: 2019/04291

Ödülleri:

- 2012-2016, 6 kez, Yüksek Onur Belgesi, Anadolu Üniversitesi
- 2016, Bölüm Birinciliği, Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji
- 2016, Fakülte Birinciliği, Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji