

TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

ÜNİVERSİTE VE ÜZERİ SEVİYESİ SEVİYESİ FİKİR

KATEGORİSİ

TAKIM ADI

BioSpacEx

Proje Ekibi : Berfin Vapor, Ayşegül Şimal Ulaş, Dilara Sökmen,
Harun Ay

Danışman : Dr.Öğr.Üyesi Ali Adem Bahar (İleri Teknolojiler
Araştırma Merkezi, Dumlupınar Üniversitesi)

PROJE ADI

Biyoteknolojik Yöntemlerle Kozmik Radyasyondan Etkilenen
Astronotların Mikrobiyotalarının Korunması

BAŞVURU ID

#411164

İÇİNDEKİLER

1. Proje Özeti (Proje Tanımı)	3
2. Problem/Sorun	4
3. Çözüm	4
4. Yöntem	5
4.1. ATCC'den Alınan Bakterilerin Çoğaltılması ve Saklanması	5
4.2. Gen Klonlama Teknolojisi	6
4.3. Gen Klonlama İşlemi	6
4.4. DNA Dizin Analizi	6
4.4.1. PCR	7
4.5. Klonlama ile Gen İzolasyonu	7
4.6. PCR ile Gen İzolasyonu	8
4.7. Klonlama için Kullanılan Vektörler	8
4.8. <i>Deinococcus radiodurans</i> DNA Saflaştırılması	8
4.8.1. Plazmit DNA'sı Hazırlanması	8
4.9. DNA'yı Kesmek için Enzimler	9
4.10. Restriksiyon Enzimi Kesim Sonuçları Değerlendirme	10
4.11. Boyama Dezavantajı	11
4.12. DNA Moleküllerinin Büyüklüğünün Hesaplanması	11
4.13. DNA'dan Farklı Kesim Pozisyonlarını Haritalama	11
4.14. DNA Ligazın Etki Şekli	11
4.15. Ürünler	11
4.16. Transformasyon	12
4.17. Transforme Hücre Seçilmesi	12
4.18. Rekombinat Saptanması	13
5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü	13
6. Uygulanabilirlik	14
7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması	14
8. Proje Fikrinin Hedef Kitlesi	15
9. Riskler	15
Kaynakça	15

1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

Uzay araştırmaları, uzay teknolojisi kullanılarak uzayın keşfi ve incelenmesini içerir. **Geçmişten** günümüze kadar yapılmış **uzay** araştırmalarının hedefi bilimsel araştırmalarda ilerleme kaydetmek, Dünyadaki canlı hücre ve dokuların uzay ortamındaki davranışlarıyla ilgili bilgiler elde etmektir. Bu sayede insanlığın gelecekte hayatta kalma mücadelesi garantiye alınmış olur ve diğer ülkelere karşı askeri ve stratejik üstünlük sağlanır. Sağlık, bilim, endüstri gibi çeşitli alanlarda insanlığa yardımcı olabilecek her türlü bilimsel ve teknolojik gelişmenin nn açar. Uzayın fiziksel keşfi ve biyolojik uzay araştırmaları yapılırken insanlı uzay araçları kullanılır ayrıca uzaktan yönetilen robot uzay gemileri de kullanılabilir. Astronotların yer aldığı insanlı uzay araçları robotlu uzay gemilerine göre ciddi sağlık sorunları ve tehlikeler barındırır. Günümüzde bu araştırmalar için yetişmiş insan gücüne, aklına ve ileri teknolojik donanımlara ihtiyaç duyulur. Bu alışmalar için astronotlar görevlendirilir uzaya giden astronotların yaşam koşullarının elverişli hale getirilmesi gerekmektedir. Uzayda uzun süre geçirmek zorunda kalan astronotlarda başta uzay radyasyonu (kozmetik radyasyon) gibi iyonize radyasyon kaynağına maruz kalırlar. Kozmik radyasyon sindirim sistemi, mide ve kolona zarar vererek gelecekte koloni kurulması planlanan Marsta yaşam için ve ötesine yapılan derin uzay görevleri astronotlar için sorun yaratabilir.

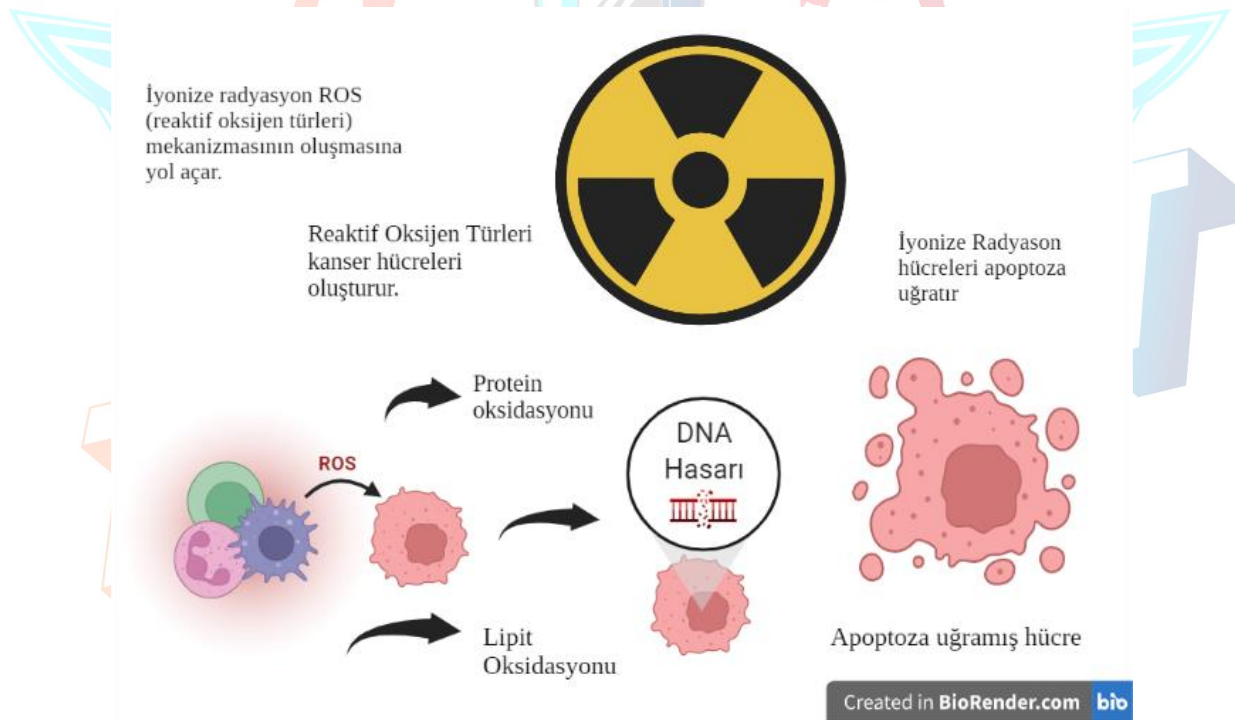
Astronotlar dünyaya döndüklerinde de çeşitli uzun vadeli sağlık sorunlarıyla karşı karşıya kalmaktadırlar. Uzayda haftalar veya aylar geçirmek, kas kaybına, bilişsel yetenek ve kemik oluşumunda bozulmaya ve hatta astronotlar için görme sorunlarına neden olabilir. Uzay radyasyonunun birçok sistem ve dokuya zarar verdiği bilinmektedir, fakat en çok tahrip ettiği alan bağırsak mikrobiyotasıdır (Kumagai vd., 2018). Vücudumuzun mikrobik bahçesini oluşturan bu doğal bakterilerin önemli bir kısmı bağırsaklarımızda yer almaktadır. Mikrobiyom eşitliliği vücudun depresyondan kansere kadar pek çok sorunla başa çıkmasında önemli role sahiptir (Altveş vd., 2020). Radyasyonun mikrobiyotaya verdiği zarar sadece uzayla sınırlı olmamakla beraber yeryüzünde de bağırsak mikrobiyotasına zarar vermektedir. Mikrobiyal floranın kaybedilmesi kanserleşmeye sebep olacak kadar kötü sonuçlar doğurabilir (Hullar vd., 2014). Diğer yandan bağırsak mikrobiyotası vücudumuzda patojenlere karşı korunma ve uygun bağışıklık yanıtlarını oluşturulmasında da görev alır (Belkaid & Hand, 2014). Bu nedenlerden dolayı, insanlık için çok büyük önem arzeden bilimsel uzay araştırmalarını gerçekleştiren astronotların sağlığı açısından bağırsak mikrobiyotalarının korunması oldukça önemlidir. Yeryüzünde yüksek radyasyona maruz kalan bölgelerde doğal olarak yaşayabilen ekstremofilik bakterilerin sahip oldukları biyoteknolojik özellikler rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak astronotların mikrobiyal floralarının radyasyona karşı daha korunaklı hale getirilmesi amaçlanmaktadır.

2. Problem/Sorun

Teknoloji ve çağın ilerlemesiyle Dünyanın her yerinde insanlar radyasyon ve türleriyle karşı karşıya kalırlar. En çok bilinen zararlı radyasyon türü olan iyonize radyasyon ve çeşitlerine maruz kalan insanlarda çeşitli sağlık sorunları ortaya çıkmaktadır. Bu sorunlar başlıca kas bozulması, kemik bozulması, görme kaybı, radyasyona maruz kalma, damarsal yaşlanma, sırt-boyun ağrısı, ve bağışıklık sisteminin zayıflaması gibi rahatsızlıklar olarak sıralanabilir (Tim Peake Bir Astronota Sorun: Uzayda Yaşam Rehberim). Radyasyon hcrelerimizdeki DNA'ya zarar verebilir. Yüksek dozda radyasyon, Akut Radyasyon Sendromuna (ARS) veya Deri Radyasyon Yaralanmalarına

(CRI) neden olabilir. Yüksek dozda radyasyon da yaşamın ilerleyen dönemlerinde kansere yol açabilir (Barabanova vd., 2019).

Dünyanın manyetik kalkanı sayesinde kozmik radyasyondan korunsak da bilimsel araştırmalar için uzayda haftalar, aylar yıllar geçirmek zorunda olan astronotlar için böyle bir kalkan koruması söz konusu değildir. Bu sebeple Uluslararası Uzay İstasyonlarında (ISS) insan gücüyle yapılan bilimsel ve deneysel çalışmalar uzaydaki olumsuz koşullar sebebiyle yeryüzünde olduğu gibi rahat ve etkili gerçekleştirilememektedir ve astronotlar uzay ortamında belli başlı sağlık sorunları ile karşılaşmaktadırlar. Aynı zamanda bağışıklığı da etkileyerek homeostazinin bozulmasına yol açmaktadır (Clapp vd., 2017). Radyasyon, DNA'nın doğru şekilde kopyalanmasını engeller. Radyasyon DNA'ya da zarar vererek apoptoza neden olur (Borrego-Soto vd., 2015). Kozmik uzay radyasyonu iyonize radyasyon grubudur. İyonlaştırıcı radyasyon (IR) tarafından indüklenen en tehlikeli DNA hasarı tipini oluşturur (Şekil 1). DNA kırılmalarını, özellikle de çift zincir kırıklarını indükleyerek DNA yapısını doğrudan etkiler (Willers vd., 2004). Radyasyon Dünya üzerinde çeşitli çevre kirliliklerine neden olur su yollarındaki radyasyon kirliliği balık ve sudaki organizmalarda birikir aynı zamanda toprakta da kontaminasyona neden olur içtiğimiz sudan yediğimiz besine kadar radyasyona maruz kalmış oluruz (Rodríguez Eugenio vd., 2018) Bu da ilerleyen dönemlerde doku hasarı kanserleşme ve ölüme kadar giden sorunlara neden olur.



Şekil 1. Hüresel seviyede radyasyon ile meydana gelen zararların şematik gösterimi.

Projemizdeki tüm şekiller ekibimiz tarafından tasarlanıp görsel hale getirilmiştir.

3. Çözüm

İnsan mikrobiyotayla ilk kez doğumda, doğum kanalının *Lactobacillus* açısından zengin mikrobiyal topluluğu ile yıkanır ve bağırsak mikrobiyotalarını annelerinden alarak olgunlaştırır (Milani vd., 2017). Milyonlarca bakteri bu mikoton denen ortak yaşam alanını paylaşır ve insanın her türlü vücut savunmasında görev alırlar. Fakat bu laktobasillerin görevleri yüksek radyasyona

karşı direnç sağlamaya yetmez. İnsan mikrobiyota topluluğunun cins ve tür bakımından bakteri toplulukları belirlenebildiği için konak bakteriyi mikrobiyota bakterilerinden seçmek mümkün olacaktır. Mikrobiyal floranın korunması ve vücudun radyasyona karşı direnç kazanması ile ilgili çalışmalar genom dizisi DNA hasarının önlenmesinde tam anlamıyla belirlenmiş *Deinococcus radiodurans* ekstremofilik bakterisi istenilen geni tam anlamıyla içermesi ve bilinen radyasyona en dirençli organizmalardan biri olduğu için seçilecektir. *D. radiodurans*, 1.5 ila 3.5 µm çapında oldukça büyük, küresel bir bakteridir. Dört hücre normalde birbirine yapışarak bir tetrad oluşturur.

Bakteriler kolayca kültürlenir ve insanlar üzerinde herhangi bir patojeniteye neden olmaz (Makarova, vd 2001). Bu bakteri DNA koruyucu protein tabaka, daha kalın hücre membranı ve reaktif oksijen türlerinin nötrleştirilmesi gibi radyasyondan kurtulmak için DNA düzenlemesi veya mutajenite faktörleri olmadan yüksek DNA hasarlarını onarmak için de etkili mekanizmalar kullanır (White vd 1999; Makarova vd., 2001). İlgili genetik kodlar, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI, ABD) gen bankasında mevcuttur. Gen bankasında AE000513 *Deinococcus radiodurans* R1 kromozom 1, tam dizi olarak verilir. Gen bankasında yine JN571419.1 *Deinococcus radiodurans* suşu ATCC BAA-816 tek sarmallı DNA bağlayıcı protein geni bulunur (Brooks and Murray,1981) İlgili DNA dizinleri kalıp olarak kullanılarak nükleik asit sentezi gerçekleştirilecektir. Daha sonra bu özellikler rekombinant DNA teknolojileri ile normal bağırsak florası bakterilerine aktarılacaktır. Probiyotikler normal mikrobiyal dengeyi yeniden sağlama yeteneğine sahiptir ve bu nedenle anksiyete ve depresyonun tedavisinde ve önlenmesinde potansiyel bir role sahiptir (Clapp et al., 2017). Probiyotik hap ve probiyotik besin takviyesi olarak da verebileceğimiz *Deinococcus radiodurans* soğukta, dehidrasyonda, vakumda ve asitte hayatta kalabilir ve bu nedenle poliektremofil olarak bilinir. Normal şartlarda iyonize radyasyondan ve türlerinden korunmak için kurşun, beton veya su bariyerleri, gama ışınlarına karşı koruma sağlar fakat insan bedenini beton ve su bariyerleriyle örtmek hem Dünya ortamında hem de yerçekiminin olmadığı bir ortamda mümkün olmayacaktır bu sebeple projemiz kapsamında yerli ve milli olarak üretilecek rekombinant DNA teknolojisiyle meydana gelecek ürün sonucunda hem Dünyadaki insanların hem astronotların radyasyona karşı geliştirilecek bakteri bariyeri sayesinde kanserleşmenin önüne geçilecek bilimsel araştırmalar için süreklilik sağlanmış olacaktır. Astronotların uzaydaki yaşam koşullarını elverişli hale getirerek yaşayacakları sağlık sorunlarını en aza indirgeyerek bilimsel çalışmalarını nitelikli ve uzun vadede sürdürülebilir hale getirmeyi amaçlamaktayız.

4. Yöntem

Radyasyona dayanıklı olduğu bilinen bakteri suşları genomları tanımlanmış güvenilir uluslararası bakteri stoklarından temin edilecektir. Daha sonra bu bakteriler laboratuvar ortamında çoğaltılarak radyasyona direnç sağlayan genlerin normal bağırsak florasını oluşturan bakterilere aktarılması planlanmaktadır. Tüm bu işlemler için gerekli detaylar aşağıda verilmiştir.

4.1. ATCC'den Alınan Bakterilerin Çoğaltılması ve Saklanması

Bir et suyu tüpü (5 ila 6 mL) kullanarak Pastör veya 1,0 mL pipetle yaklaşık 0,5 ila 1,0 mL çekilerek tüm pelet yeniden sulandırılır. Bu sıvı aseptik olarak et suyu tüpüne geri aktarılır İyice karıştırılır. Agar eğimli ve/veya plakayı aşlamak için birkaç damla süspansiyon kullanılır. Tüpler ve plaka 30°C'de 48 saat inkübe edilir.

4.2. Gen Klonlama Teknolojisi

Gen teknolojisi gen ifadesini anlama doğal geneti çeşitlilikten faydalanma genleri değiştirme ve genleri yeni konaklara aktarma ile ilgili bir dizi faaliyete verilen terimdir. Rekombinant DNA teknolojisi, temel olarak diğer iki teknolojiye, klonlama ve DNA dizilimine dayanmaktadır. Klonlama, belirli bir genin veya ilgili DNA dizisinin klonunu elde etmek için yapılır.

4.3. Gen Klonlama İşlemi

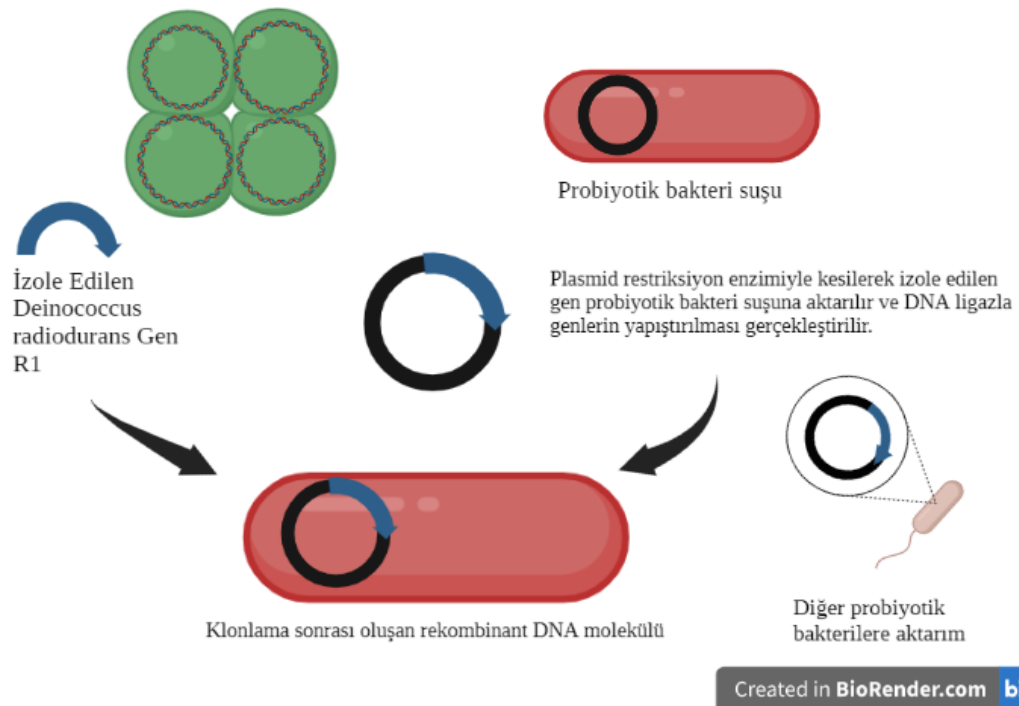
1) Klonlamak istenen geni içeren DNA fragmenti dairesel bir DNA molekülü içerisine yerleştirilir ve rekombinant DNA molekülü oluşturulur. Dairesel DNA molekülleri vektör olarak adlandırılır.

2) Vektör konakçı hücreye geni transfer eder. Konakçı hücre genellikle bir bakteridir. Ancak farklı tipte canlı hücrelerde bu amaç için kullanılabilir.

3) Konakçı hücre içinde vektör çoğalır pek çok özdeş kopyasını üretir. Bu aşamada sadece kendi değil, gen bölgesi de üretilir.

4) Konakçı hücre bölündüğü zaman rekombinant DNA moleküllerinin kopyaları yavru hücrelere geçer ve vektör replikasyonu burada da devam eder.

5) Pek çok hücre bölünmesinden sonra özel konakçı hücrelerin kolonisi veya klonu oluşturulur. Klondaki her hücre bir ya da daha fazla rekombinant DNA molekülünün kopyasını da içerir.



Şekil 2. Radyasyona dirençli bakteriden mikrobiyotik bakterisine direnç genlerinin aktarımı. Projemizdeki tüm şekiller ekibimiz tarafından tasarlanıp görsel hale getirilmiştir.

4.4. DNA Dizin Analizi

4.4.1. PCR

PCR karışımı dsDNA molekülünün iki ipliğini birarada tutan Hidrojen bağlarının kırılıp molekülün denatüre olmasına yol açan sıcaklık 94°C'ye kadar ısıtılır. Karışım 50-60 °C ye kadar soğutulur bu sıcaklıkta her molekülün iki ipliği tekrar bir araya gelebilir ancak çoğu birleşmez çünkü karışım bol miktarda spesifik pozisyonlarda DNA molekülü ile eşleşen bağlanan (anneal) kısa DNA molekülleri içerir bunlara oligonükleotit veya primer denir.

Sıcaklık 74 °C ye çıkarılır bu sıcaklık karışımında bulunan Taq DNA polimeraz enziminin optimal çalışma sıcaklığıdır. Taq DNA polimeraz her bir primerin ucuna bağlanarak kalıp DNA molekülüne komplementer yeni DNA ipliklerini sentezler. Başlangıçta 2 DNA ipliği yerine 4 DNA ipliği oluşur. Sıcaklık tekrar 94°C ye çıkarılır. dsDNA moleküller tekrar denatüre olur. Denatürasyon- annealing sentezinin ikinci döngüsü başlar. Döngü sonunda 8 tane DNA zinciri oluşur. 30 kez döngünün devam ettiği düşünülürse 130milyon üzeri yeni dsDNA molekülü elde edilir.

PCR bileşenleri deney tüpüne eklenmesi gereken kimyasallar ve enzimlerden oluşur bunlar:

dNTP'ler (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), forward ve reverse primerler, Taq DNA polimeraz enzimi, Mg⁺² solüsyonu, çoğaltılacak kalıp dsDNA olarak sıralandırılabilir. Gen klonlama ve pcrin öneminde hücredeki tüm diğer genlerden tek bir genin saf numunesini ayırt etmek yatar.

4.5. Klonlama ile Gen İzolasyonu

Elimizde her biri farklı gen ya da gen parçasını taşıyan fragmentlerin bir karışımı bulunur (örn; E.coli bünyesinde 4000 den fazla geni barındırır bu karmaşık gen dizilimleri geni izole ederken bazı seçim sorunlarını da beraberinde getirir. Klonlanacak DNA fragmentiyse bu karışımın içinde bulunur. Bu karışım bir organizmanın tüm genetik materyali olabilir. Bu fragmentlerin her biri ilgili geni taşıyan rekombinant DNA ailesi meydana getirmek için farklı bir vektör molekülüne yerleştirilir.

Genellikle yalnızca bir rekombinant DNA molekülü tek bir konak hücreye nakledilir. Klonların son safhasında pek çok farklı rekombinant DNA molekülü içermesine rağmen her özgün klon sadece bir molekülün çoklu kopyalarını içermiş olur. Gen klonlama deneyinin başarı veya başarısızlığı elde edilen pekçok farklı klondan ilgilenilen klonu saptama yeteneğidir. Bu aşamada gen artık orjinal karışımındaki tüm diğer genlerden ayrılmıştır. Bakteriler basit canlılardır insanlardan daha fazla gen içerirler. Bazı stratejiler klonlama deneyi sonrası istenilen genin doğru kopyasını elde etmek için kullanılabilir. Böylece istenen rekombinant klon kolayca seçilir.

4.6. PCR ile Gen İzolasyonu

PCR bir genin saf numunesini elde etmek için kullanılabilir. PCR sırasında kopyalanan başlangıç DNA molekülünün sınırlarının iki oligonükleotidin yapıştığı pozisyonlarla belirlenen kısım olmasından dolayıdır. Primerler ilgili genin her iki tarafına bağlanırsa genin pek çok kopyası sentezlenebilir. PCR deneyi birkaç saat içinde tamamlanırken klonlama deneyi haftalar alabilir.

Çoklu izolasyon için PCR yerine Klonlama tercih edilebilir. Primerin ilgili genin her iki tarafına doğru pozisyonlara bağlanması için bağlanma yerinin dizileri bilinmelidir. Önceden

belirlenen bir diziyle primer sentezlemek kolaydır. Uygun primer sentezi için bağlanma yerinin dizisini bilmemiz gerekir. PCR ile önceden çalışılmamış genleri izole etmek için kullanamayız.

PCR ile kopyalanan DNA dizisi uzunluğu sınırlıdır 5 kb kolay kopyalanırken 40 kb dan büyük kısımlar için özel teknikler gerekebilir. Uzun bir genin tam versiyonunu elde etmek için klonlama gerekecektir. PCR ile farklı organizmalarda eşdeğer genlere bakılarak primerler tasarlanabilir. Tüm dizisini bildiğimiz gen izolasyonu için PCR teknolojisinden yararlanır.

4.7. Klonlama için Kullanılan Vektörler

Bir vektör, klonlama veya rekombinant DNA tekniğinin bir parçası olarak belirli bir DNA segmentini bir konak hücreye taşımak için bir araç olarak kullanılan bir DNA molekülüdür. Vektör olarak genellikle plazmit veya virüsler kullanılır. Bir DNA molekülünün gen klonlaması için bir vektör olarak hareket edebilmesi için çeşitli özellikler göstermesi gerekir. En önemlisi rekombinant DNA molekülünün çok sayıda kopyasının üretilip yavru hücrelere aktarılması için konakçı hücre içinde kopyalanabilmesidir. Büyük moleküller saflaştırma sırasında parçalanma eğiliminde ve manipüle edilmesi zordur. Klonlama vektörü nispeten küçük olması gerekmektedir.

2 tür ekstrakromozomal DNA molekülü bakteri hücresinde bulunabilir.

1. Plazmit DNA'sı
2. Bakteriyofaj kromozomları

Plazmit DNA'sı bakteri genomunun haricindeki bağımsız DNA molekülleridir. Hemen hemen her zaman bir veya daha fazla gen taşırlar. Bu genler konakçı bakteri tarafından sergilenen faydalı bir özellikten sorumludur örneğin *Deinococcus radiodurans* bakterisinde olan radyasyon direnç genleri gibi. Moleküler biyoloji ve genomikteki son gelişmeler, *Deinococcus radiodurans*'ın tam genom dizisini ve iki kromozom, bir megaplazmit ve 45.7 kb'lik bir plazmitten oluşan bir genomu ortaya çıkarmıştır (Meima & Lidstrom, 2000).

4.8. *Deinococcus radiodurans* DNA Saflaştırılması

4.8.1. Plazmit DNA'sı Hazırlanması

Kromozomal DNAdan plazmit DNAsının saf olarak ayrılması gerekir. Plazmit ve bakteri DNAsı arasındaki temel fark fiziksel büyüklük farkıdır. Büyük DNA moleküllerini küçüklerinden ayırabilen tekniklerin plazmit DNAsını saflaştırması gerekir.

Plazmit ve bakteri kromozomları halka şeklindedir fakat hücre özütü hazırlanırken doğrusal DNA oluşumu için kırılır. Kromozomal DNA Büyüklük ve Konformasyona dayalı ayırma yöntemleriyle ayrılır.

Büyüklük esasına dayalı ayırma: Hücre liziz edilirse çok düşük miktarda kromozomal DNA kırılır. Elde edilen DNA parçaları çok büyük olacaktır. Bu parçalar, plazmitlerden çok büyük olacaktır. Bu plazmitlerden çok daha büyüktür ve santrifüjlemeyle hücre kalıntısıyla beraber uzaklaştırılabilir. Bakteri hücresi lizozim veya EDTA gibi hücre duvarı parçalayıcılarıyla parçalanır. Liziz işlemi yapılırken çok nazik olunmalıdır. Kromozomu tamamen kırmayız ve bir kısmı hücre debisiyle dibe çöker. Hücre duvarı parçalanmış bakterinin santrifüjüyle hücre özütü

elde edilir. Plazmit DNA küçük olduğu için yoğunluk farkı nedeniyle yukarıda kalır hücre kalıntısı aşağıya çöker.

Konformasyona dayalı ayırma: Süper kıvrımlı moleküler olarak bulunurlar. İki farklı metot kullanılır. Alkalın denatürasyon ve Etidyum bromür-Sezyum klorür yöntemi.

Alkalın denatürasyon: Plazmitler supercoiled halde bulunur. PH'ı 12-12,5 alkali koşullara getirirsek ssDNA'ya denatüre ederiz. PH' ı tekrar nötr hale getirirsek lineer DNAlar bir araya toplanır. Santrifüjlenerek lineer DNA peletinin aşağı çökmesi supercoiled plazmitin yukarıda kalması esasına dayanır.

Etidyum bromür- sezyum klorür yoğunluk kademeli santrifüjleme: Bu yöntem bir floresan özellik gösterdiği için DNA'yı görmek için kullanırız. İki bandı birbirinden ayırır. Denge tekniklerinin veya yoğunluk kademeli santrifüjlemenin özel bir versiyonu olmakla beraber yoğunluk kademesi çok yüksek bir hızda CsCl çözeltisinin santrifüjlemesiyle oluşturulur. Yüksek santrifüjleme kuvveti tüpün dibine Cs ve Cl iyonlarını çekeceği için kademe oluşur. EtBr dsDNA'nın açılmasına yol açar. DNA arasına interkale olur.

4.9. DNA'yı Kesmek için Enzimler

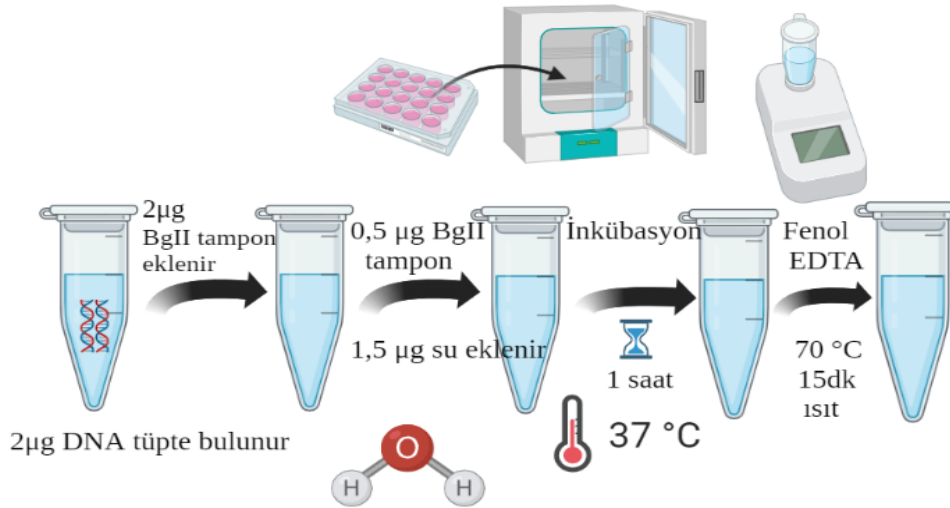
Kesme işlemi her bir vektör için özel bir diziden olmalı. Her bir vektör molekülü halkayı açmak için tek bir pozisyondan kesilmeli ki yeni DNA yerleşebilsin (Rastgele kesim tatmin edici değildir). Bir defadan fazla kesilen bir molekül iki ya da daha fazla fragmana ayrılırsa klonlama aracı olarak kullanışlı olmaz. Bu manipülasyon için özel nükleaz tipine ihtiyaç vardır. Klonlanacak DNA'yı da kesmek gerekir.

Tanıma Bölgesi (Kesim Bölgesi)

5' G A A T T C 3' Kesim bölgeleri palindromdur
3' C T T A A G 5'

Diğer restriksiyon endonükleaz DNA'yı farklı şekillerde keser. Bu enzimlerle iki DNA iplik aynı pozisyonda kesilmez. Kesimle 2-3 nükleotit karşı karşıya gelmez. Oluşan DNA fragmanları her bir uçta kısa tek iplikli yapışkan uçlara sahip olur.

- a) Kesimi yapılacak DNA test tüpüne konur.
- b) Reaksiyon karışımının hacminin ayarlanması için tampon ilave edilir (Restriksiyon endonükleaz için uygun tampon seçilir).
- c) Restriksiyon enzimleri ilave edilir.
- d) 37 °C'de inkübasyon sağlanır.
- e) Proteinlerin istenmeyen şekilde kesime devam etmesini önlemek için fenol özütleme sıcaklık uygulaması ve EDTA ilavesi (EDTA Şelatlaştırıcı Mg^{+2} iyonlarına bağlanır).
- f) DNA kesilmiş olur (Şekil 3).



Şekil 3. Laboratuvarında restriksiyon endonükleaz sindirimi gerçekleştirilmesi. Projemizdeki tüm şekiller ekibimiz tarafından tasarlanıp görsel hale getirilmiştir.

4.10. Restriksiyon Enzimi Kesim Sonuçları Değerlendirme

DNA molekülünün kesilip kesilmediğini anlamak için vizkozitesi saptanır. Büyük DNA molekülleri küçük olanlardan daha akışkan çözelti meydana getirirler. Vizkozite düşüşü kesilmeye ilgilidir. Elektroforez, iyon değişim kromatografisi gibi bir karışımda molekülleri ayırmak için elektrik yükü farkının kullanıldığı bir tekniktir. DNA molekülleri (-) yüke sahiptir. Elektrik alana konulursa (+) yüke hareket ederler. Molekülün hareket hızı şekline ve yük-kütle oranına bağlıdır. Çoğu DNA molekülü benzer yapıda ve benzer elektrik yüküne sahiptirler. Farklı büyüklükte parçalar elektroforez ile ayrılamaz. DNA molekül büyüklüğü elektroforez jelde gerçekleşirse bir faktör olabilir.

Jel elektroforezi büyüklüklerine göre DNA moleküllerini ayırabilir. DNA görüntülemenin diğer yolu EtBr agaroz ya da poliakrilamid jeldeki DNA boyaması için kullanılır. Büyük moleküller jelde daha yavaş yürürken küçükler daha hızlı yürür. Agaroz veya PAGE kullanılarak daha küçük parçaların ayrımı sağlanır. Jel elektroforezinin sonucu için DNA'yı görünür yapacak olan bir boya ile jel boyanır.

4.11. Boyamanın Dezavantajı

Hassasiyetinin bir sınırı vardır. Otoradyografi bir cevap sağlar. DNA molekülü elektroforez öncesi her moleküle radyoaktif etikette etiketlenir, jelin üzerine x ışınlarına duyarlı film konarak görüntülenir. Radyoaktif DNA bant kalıplarını ortaya çıkararak şekilde filme işler.

4.12. DNA Moleküllerinin Büyüklüğünün Hesaplanması

Bu işlem için aşırı hassaslık ve zaman gerekli değildir. Bilinen büyüklükte DNA fragmanlarından oluşan std restriksiyon sindirimi yürütülen jele ilave edilir.

4.13. DNA'dan Farklı Kesim Pozisyonlarını Haritalama

Çeşitli enzimlerin tanıma yerlerini, DNA molekülündeki pozisyonunu gösteren harita oluşturulur. Sadece bir restriksiyon haritası varsa belirli kesme işlemi için doğru enzimler seçilebilir. Genetik harita gen bölgesini restriksiyon haritası yapmak için bir seri restriksiyon sindirimi yapılmalı.

4.14. DNA Ligazın Etki Şekli

Rekombinant DNA molekülü oluşumunun son safhası vektör molekülü ve klonlanacak DNA molekülünü birbirine bağlamaktır. Bu işleme ligasyon bağlama denir ve reaksiyon katalizleyen enzime DNA ligaz denir. Daha önce yapılmış bir çalışmada *Deinococcus radiodurans* direnç genlerinin E.coli bakterisine aktarımı başarıyla gerçekleşmiş olup sonuç olarak E.coli başarıyla direnç genlerini almıştır ve yapılan çalışma somucunda radyasyona dirençli bakteriler elde edilmiştir (Glenn V. Dalrymple, Thomas J. Lynch ve James W. Hardin, 1989).

4.15. Ürünler

Vektörün içine istenen geni eklemiştir (istenen rekombinant DNA molekülleri). Vektör istenen gen bölgesini değil de istenmeyen gen bölgesini almıştır.

- Kendi kendine kapanan vektörler.
- Bağlanmamış DNA fragmenti
- Bağlanmamış vektör

Bağlanmamış moleküller nadiren probleme yol açar. Bakteri hücresi tarafından alınsalar da istisnai şekilde replike olacaklardır. Konak bakterideki enzimler DNA parçalarını yıkabilir. Kendi kendine bağlanan vektör molekülleri ve yanlış rekombinant moleküller istenen molekül kadar etkili replike olur.

- Bağlanmayan moleküller alınsa bile replike edilemez.
- Halkasal yapılar bakteri tarafından alınma eğilimindedir.
- Bakteri içine giren tüm halkasal moleküller replike olur.

Molekül saflaştırılması klonlama ile olur çünkü bir hücrenin birden fazla DNA molekülünü alması olağandır. Her hücre tek koloni verir, bu yüzden oluşan kolonilerin her biri aynı molekülü içeren hücrelerden oluşur. Farklı koloniler, farklı molekülleri içerir. Bazısı istenen rekombinant DNA molekülünü bazısı da farklı rekombinant Molekülleri ve bazısı da kendi kendine bağlanan vektörü içerir. Çıkabilecek problem: Doğru rekombinant plazmitleri içeren kolonileri saptama meselesi halini alır.

4.16. Transformasyon (bakteri hücresi tarafından DNA alınması)

Birçok bakteri türü, büyüdükleri ortamdan DNA moleküllerini alabilme yeteneğine sahip. Bazı bakteri türü DNA alımını eşit şekilde gerçekleştiremez (örneğin *E. coli*'yi içeren bakteri türlerinin çoğu sınırlı miktarda DNA alır.) Klonlamadan farklı bir yöntem olarak transformasyon kullanılabilir. Bu transformasyon için probiyotik bakterilerinden biri olan *Streptococcus thermophilus* kullanabiliriz.

Bu türleri etkili şekilde transforme edebilmek için bakterilerin DNA alma yeteneklerini arttıracak birtakım fiziksel/kimyasal muameleye maruz bırakılır. Muameleye maruz kalan hücreler kompetan hücrelerdir. $CaCl_2$ DNA'nın hücre dışına çökmesine neden olur veya tuz hücre duvarında DNA bağlanmasını arttırıcı değişmeden sorumludur. Kompetan hücrelere DNA'nın asıl

giriş sıcaklığı yavaşça 42° C yükseltilmesiyle uyarılır. Transforme halkasal yapıyı alan, klon ise istenen genin aktarıldığı koloni olarak tanımlanır.

4.17. Transforme Hücre Seçilmesi

Plazmiti alan hücreyi transforme olmayan hücrelerden ayırt etmek gerekir. Plazmitin alınmasını ve kararlı kalması, plazmit tarafından taşınan genlerin ifadesine bakmakla saptanır. İlk klonlama vektörü *Streptococcus thermophilus* plazmiti çiğ süttten elde edilen termofil tetrasiklin , eritromisin ve klindamisine, streptomisin ve neomisine direnç gösteren suşlar bulundu (Flórez and Mayo 2017). *Streptococcus thermophilus* tetrasiklin detoksifiye edici enzimleri kodlayan gen seti taşır. *Streptococcus thermophilus* transformasyon deneyinden sonra yalnız plazmit alan *Streptococcus thermophilus* hücreleri amp^R ve tet^R ' dir. Amp ve tet içeren agarda koloni oluşturabilirler. Transforme olmayanlar koloni üretmez. Böylece transforme olan ve olmayan gen seçilebilir. Örneğin *Streptococcus thermophilus* için hücrelerinin çeşitli plazmit DNA türleri ile genetik transformasyonu için hızlı ve uygun bir elektroporasyon prosedürü geliştirilmiştir. Dönüşüm frekansı, elektrik darbesi için seçilen kapasitans ve voltajdan, elektroporasyon ortamının pH'ından ve bileşiminden ve dönüştürücü DNA'nın moleküler kütesinden etkilenmiştir. Elektroporasyon, plazmit DNA'yı *S. thermophilus*'a sokmak için basit ve etkili bir tekniktir ve bu önemli endüstriyel mikroorganizma için rekombinant DNA teknolojisinin geliştirilmesinde faydalıdır (Somkuti and Steinberg 1988).

4.18. REKOMBİNAT SAPTANMASI

- 1) Seçici bir ortama ekim yapmak transforme olanlarla olmayanları ayırt etmeyi sağlar.
- 2) Transforme olan kolonilerin hangisi rekombinant DNA moleküllerini ve hangileri kendi kendine bağlanan vektörleri içerdiklerini saptarız.
- 3) Rekombinatlar inaktive edilen gen tarafından kodlanan özellik konak tarafından sergilenmediği için saptanabilir.

4.19. Rekombinant Seçimi Nasıl Yapılır?

Transformasyondan sonra hücreler amp içeren ortama ekilir. Koliniler görülünceye kadar inkübe edilir. Bu kolonilerin hepsi transforme olanlardır sadece birkaçı rec *Streptococcus thermophilus* içerir. Rekombinantları saptamak için koloniler tet^R içeren agar ortamına kopya ekim yapılır. İnkübasyondan sonra orijinal koloniler yeniden büyür diğerleri büyümmez. Büyüyenler yeni DNA fragmentleri içermeyen normal *Streptococcus thermophilus* ve bu yüzden işlevsel trt^R geni taşırlar. Tet^R agarda büyümeyenler rekombinanttır.

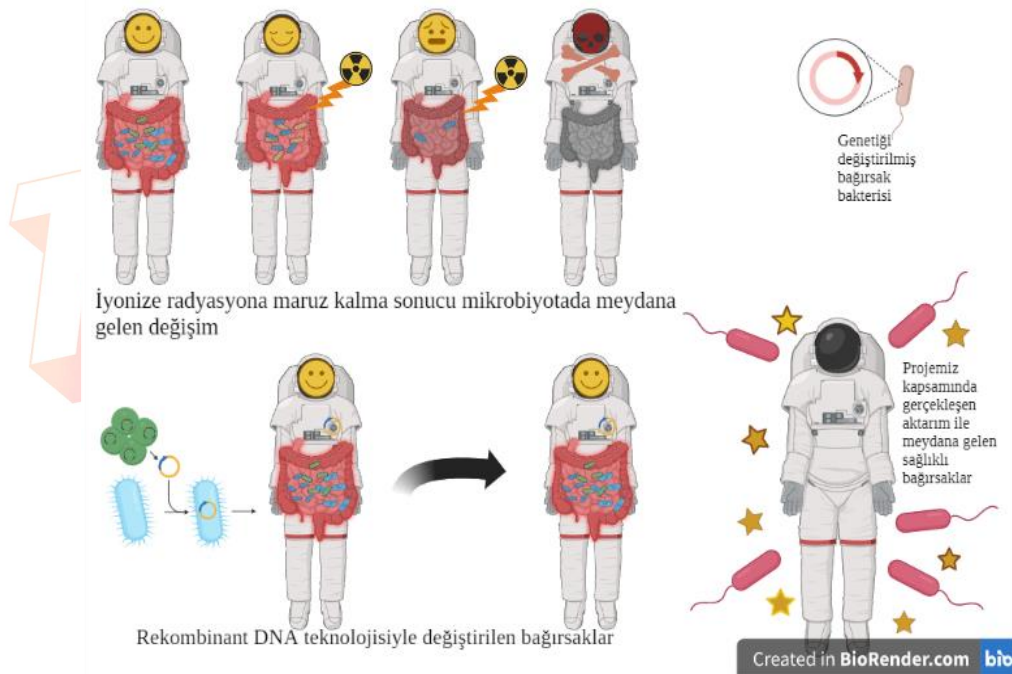
Bunların pozisyonları orijinal agar petrisiyle karşılaştırılır ve orijinal petride rekombinat koloniler belirlenir.

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

Uzay çalışmaları günümüzde rutin olarak kullandığımız ama nerden geldiğini bilmediğimiz birçok cihazın gelişmesine olanak sağlamıştır. İç organların görüntülenmesini sağlayan MRI cihazı, kulak termometreleri, mobil ultrason, kanser dedektörleri, uzay araştırmaları sayesinde keşfedilen cihazlardır. Bu çalışmalar uzaya gidip gelen astronot bilim insanları sayesinde gelişmeye açık teknolojiler haline gelmiştir. Ekstremofiller; biyoteknoloji, ilaç ve bazı toksik

bileşiklerin imhası konusunda gelecekteki ilerlemeler için güçlü etkilere sahiptir. Gelecek yıllarda, bu canlıların daha fazla kullanılması, radyasyon aracılı kanser gibi hastalıklar için tedaviler bulma ve diğer endüstriyel talepleri karşılama konusunda etkin rol oynayabilir. Astronotlar elverişli olmayan koşullarda çalıştıkları için yenilikçi bir yöntemle oksidatif strese karşı yüksek direnç, proteinlerin oksidatif strese karşı etkili bir şekilde korunması, bakterilerin probiyotik olarak kullanılmasını içeren proje fikrimiz sağlık alanında radyasyonun yıkıcı etkilerine karşı yenilikçi bir tedavi yöntemi ortaya koyar. Piyasada bilinen rutin kullanılan probiyotik takviyeleri yerine probiyotik bakterilerin dirençli hale getirilmesine yönelik olarak gerçekleştirilmesi açısından ilk olma özelliği taşır.

Bu projeye sadece astronotların değil radyasyon altında çalışmak zorunda kalan insanların ve sağlık çalışanlarının radyasyonun zararlı etkilerini gidermek açısından da daha önce yapılmamış bir çalışma olacaktır. Aynı zamanda aynı biyokimyasal mekanizmaları kullandığı bilinen yaşlılığın geciktirilmesi ve kanser tedavisi gibi önemli sorunların çözümüne katkı sağlayabilecektir. Bu çalışma, halk sağlığı açısından yerli ve milli yeni tedaviler ortaya koyulmasına olanak verir. Biyoteknolojik olarak geliştirilecek bağırsak florası bakterilerinin üreteceği radyasyona direnç sağlayan etkenlerin bir kısmı bağırsak epitelinden emilerek kan dolaşımına karışabilecektir. Bu sayede sadece bağırsak mikrobiyotasını değil, aynı zamanda vücut hücrelerini radyasyondan korunabilmesini sağlayacak yenilikçi bir yöntemin geliştirilmesine öncü olacaktır. Herhangi bir patojenitesi bulunmayan D.radioduran bakterisinin (Özbeý ve Asma, 2019) probiyotik bakterilerle birlikte astronotların beslenme rejimlerine eklenip eklenemeyeceği ile ilgili ön çalışmalar yapılabilecektir. Bu açıdan ekstremofilik bir bakterinin ilk kez probiyotik olarak değerlendirilmesine yönelik yenilikçi bir çalışma ortaya koyulacaktır (Şekil 4).



Şekil 4. Geliştirilmesi düşünülen rekombinant teknoloji ile bağırsak florasındaki doğal bakterilerin radyasyondan korunmasını şematik gösterimi. Projemizdeki tüm şekiller ekibimiz tarafından tasarlanıp görsel hale getirilmiştir.

6. Uygulanabilirlik

Rekombinant DNA teknolojisi 1970li yıllardan beri birçok alanda başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Bu alanda daha önceden bildirilen bir çalışmada rekombinant DNA teknolojisi ve prensipleriyle *Deinococcus radiodurans* DNA'sının genomik bir DNA kütüphanesi R1 geni , pBR322 plazmit vektörü kullanılarak hazırlanmış ve rekombinant plazmit, radyasyona daha duyarlı bir organizma olan *Escherichia coli* RR1'i dönüştürmek için kullanılmış bunun sonucunda elde edilen *Echerichia coli* RR1 radyasyona direnç kazandığı bildirilmiştir (Glenn V. Dalrymple, Thomas J. Lynch ve James W. Hardin, 1989). Bağırsak bakterilerinin bir tanesinin bile bu geni almaması durmunda milyonlarca bağırsak ve probiyotik bakteri olduğunu unutmamak gerekir. Bu durumda geni alma olasılığını arttırmış oluruz. Mevcut şartlar altında projemiz ticari bir ürüne dönüştürülebilir biyokimyasal deneme, hayvan denemeleri, toksisite denemeleri ve insanlar üzerindeki çalışmaları sonucu güvenlik testleri tamamlandıktan sonra piyasada bir ilaç niteliği taşıyabilir.

7. Tahmini Maliyet ve Zaman Planlaması

Proje bünyesinde kullanılması planlanan cam malzemeler, inkübatörler ve diğer cihazlar Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, İleri Teknolojiler Merkezi, Biyoteknoloji Laboratuvarı tarafından karşılanacaktır. Gerekli diğer bakteri suşlarının yaklaşık maliyetleri Tablo 1'de listelenmiştir.

Tablo 1. Proje kapsamında ihtiyaç duyulan bakteri suşları ve yaklaşık maliyetleri.

ATCC üzerinden temin edilecek bakteri	Fiyat	Kullanım amacı
<i>Deinococcus radiodurans</i> R1	525 Euro	Rekombinant uygulamalar, radyasyona direnç oluşumu sağlayan genler için kaynak organizma.
<i>Streptococcus thermophilus</i>	525 Euro	Rekombinant uygulamalarda kullanılacak doğal mikrobiyaya bakterisi
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	531 Euro	Rekombinant uygulamalarda kullanılacak doğal mikrobiyaya bakterisi
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>	525 Euro	Rekombinant uygulamalarda kullanılacak doğal mikrobiyaya bakterisi
<i>Bfidobacterium longum</i>	525 Euro	Rekombinant uygulamalarda kullanılacak doğal mikrobiyaya bakterisi
<i>Lactobacillus asidophilus</i>	525 Euro	Rekombinant uygulamalarda kullanılacak doğal mikrobiyaya bakterisi
İnülin prebiyotik lif	386,72 TL	Probiyotik bakterilerin yaşam alanı ve lif desteği

Tablo 2. İş paketleri ve süreleri

No	İş Paketi Adı	AYLAR																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	Deinococcus radiodurans ve diğer bakterilerin uluslararası bakteri stoklarından temini.																		
2	Radyasyona direnç genlerinin tespit edilmesi.																		
3	Seçilen direnç genlerine özel primerlerin dizayn edilmesi																		
4	Genomik DNA izolasyonu ve direnç genlerinin çoğaltılması																		
5	Çoğaltılan direnç genlerinin kalite kontrolünün yapılması																		
6	Radyasyona direnç genlerinin normal mikrobiyata bakterilerine aktarılması																		
7	Aktarılan genlerin kontrol edilmesi																		
8	Oluşturulan radyasyona dirençli rekombinant bakterilerin radyasyon altında test edilmesi																		

8. Proje Fikrinin Hedef Kitlesi

Bugün Dünyada ve Türkiyede birçok meslek radyasyona maruz kalmaktadır. Bunlardan bazıları , nükleer tıp teknisyenleri, tıbbi radyoloji teknisyenleri, uçak mürettebatı, radyum kadranlı aydınlatıcılar, yeraltı sert kaya madencileri, Çernobil ve Fukushima temizlik işçileri, nükleer silah testi katılımcıları ve nükleer endüstri çalışanları ve astronotlar en önemli radyasyon ajanlarına maruz kalmaktadır. Aynı zamanda gelişen teknolojiyle beraber her gün aldığımız radyasyon dozları artmaktadır bununla alakalı olarak harici kullanabileceğimiz probiyotik takviyesi olarak bu çalışmayı kullanabilmeyi hedeflemekteyiz.

9. Riskler

DNA izolasyon aşamasında EtBr metodunda bazı kanser faktörlü riskler bulunmaktadır. Bu çalışmayı yapanların son derece dikkatli olması gerekmektedir. Farklı metotlar da kullanılabilirdiğinden bu riskten korunma şansımız vardır. Bakterinin geni alıp almadığını kontrol ederken kullanacağımız metotlar çalışanlar için yüksek dozda radyasyon riskleri barındırabilir. Bu çalışmayı yaparken laboratuvar ortamında radyasyon korunaklı kıyafetler, gözlük, eldiven takılmalıdır. *Deinococcus radiodurans* ve diğer bakteriler için herhangi bir patojenite faktörü bulundurmadığı için klonlama için herhangi bir risk faktörü bulundurmaz.

Kaynaklar

1. Liou, G. Y., & Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research*, 44(5), 479–496.
2. Barabanova, A. V., Bushmanov, A. J., & Kotenko, K. V. (2019). Acute Radiation Sickness From Chernobyl. *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.12128-1>
3. Borrego-Soto, G., Ortiz-López, R., & Rojas-Martínez, A. (2015). Ionizing radiation-induced DNA injury and damage detection in patients with breast cancer. *Genetics and Molecular Biology*, 38(4), 420–432. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150019>
4. Clapp, M., Aurora, N., Herrera, L., Bhatia, M., Wilen, E., & Wakefield, S. (2017). Gut microbiota's effect on mental health: The gut-brain axis. *Clinics and Practice*, 7(4), 987. <https://doi.org/10.4081/CP.2017.987>
5. Earl, A. M., Rankin, S. K., Kim, K. P., Lamendola, O. N., & Battista, J. R. (2002). Genetic Evidence that the uvsE Gene Product of *Deinococcus radiodurans* R1 Is a UV Damage Endonuclease. *Journal of Bacteriology*, 184(4), 1003. <https://doi.org/10.1128/JB.184.4.1003-1009.2002>
6. Ithurbide, S., Coste, G., Lisboa, J., Eugénie, N., Bentchikou, E., de la Tour, C. B., Lig, D., Confalonieri, F., Sommer, S., Quevillon-Cheruel, S. C., & Servant, P. (2020). Natural Transformation in *Deinococcus radiodurans*: A Genetic Analysis Reveals the Major Roles of DprA, DdrB, RecA, RecF, and RecO Proteins. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1253.
7. Liou, G. Y., & Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research*, 44(5), 479–496. <https://doi.org/10.3109/10715761003667554>
8. Liu, Y., Zhou, J., Omelchenko, M. V., Beliaev, A. S., Venkateswaran, A., Stair, J., Wu, L., Thompson, D. K., Xu, D., Rogozin, I. B., Gaidamakova, E. K., Zhai, M., Makarova, K. S., Koonin, E. V., & Daly, M. J. (2003). Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 4191–4196. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0630387100>
9. Meima, R., & Lidstrom, M. E. (2000). Characterization of the Minimal Replicon of a Cryptic *Deinococcus radiodurans* SARK Plasmid and Development of Versatile *Escherichia coli* - *D. radiodurans* Shuttle Vectors. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3856. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.3856-3867.2000>
10. Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., Belzer, C., Delgado Palacio, S., Arbolea Montes, S., Mancabelli, L., Lugli, G. A., Rodriguez, J. M., Bode, L., de Vos, W., Gueimonde, M., Margolles, A., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2017).
11. PCR Cloning Method | NEB, n.d.) PCR Cloning Method | NEB. (n.d.). Retrieved May 9, 2022, from <https://international.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/pcr-cloning>
12. Rodríguez Eugenio, N., Michael McLaughlin, F., Bazza, Z., Ronald Vargas, F., Kohlschmid, E., Oxana Perminova, F., Elisabetta Tagliati, F., Khan, A., & Pennock, L. (2018). Hidden Soil Pollution a Reality Food and Agriculture Organization of the United Nations *Edition, Design*

& Publication. www.fao.org/

13. Slade, D., & Radman, M. (2011). Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : *MMBR*, 75(1), 133–191. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-10>
14. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81(4).
15. White, O., Eisen, J. A., Heidelberg, J. F., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Dodson, R. J., Haft, D. H., Gwinn, M. L., Nelson, W. C., Richardson, D. L., Moffat, K. S., Qin, H., Jiang, L., Pampile, W., Crosby, M., Shen, M., Vamathevan, J. J., Lam, P., McDonald, L., Fraser, C. M. (1999). Genome Sequence of the Radioresistant Bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science*, 286 (5444),1571–1577.
16. Altveş, S., Yildiz, H. K., & Vural, H. C. (2020). Interaction of the microbiota with the human body in health and diseases. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 39(2), 23–32. <https://doi.org/10.12938/BMFH.19-023>
17. Hullar, M. A. J., Burnett-Hartman, A. N., & Lampe, J. W. (2014). Gut Microbes, Diet, and Cancer. *Cancer Treatment and Research*, 159, 377–399. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38007-5_22

